



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

การพัฒนาแผ่นปิดผิวหนังและเยื่อบุเพื่อใช้ในการนำส่งสารออกฤทธิ์ทาง
การแพทย์จากเศษวัสดุข้าวโพด

Development of transdermal and transmucosal patch for the
medical active ingredients delivery from corn waste

โดย

นางสาวชลทิพย์ ทิพย์แก้ว
รศ.ดร.จินตนาภรณ์ วัฒนธร
ผศ.ดร. สุภาพร มัชฌิมะปุระ
ผศ.พญ.ปณศพร วรรณานนท์
รศ.นพ.เทอดไทย ทองอ่อน
รศ.นพ.สมศักดิ์ เทียมเก่า
รศ.พญ.นวนันท์ ปิยะวัฒน์กุล
รศ.พญ.วราภรณ์ เชื้ออินทร์
รศ.ดร.ภญ.พาณี ศิริสะอาด
ดร.วิภาวี ทุคำมี
นายมนตรี คงแดง
นายประพนธ์ บุญจำพรรณ

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

2555

บทคัดย่อ

ปัจจุบันการนำส่งสารออกฤทธิ์ผ่านทางผิวหนังด้วยเส้นใยโพลิเมอร์ระดับนาโนได้รับความนิยมอย่างมากเนื่องจากลดขนาดของสารที่ให้ประสิทธิผลและลดอาการไม่พึงประสงค์ ดังนั้นผู้วิจัยจึงตั้งสมมุติฐานว่าเส้นใยโพลิเมอร์ระดับนาโนจะสามารถนำส่งสารสกัดชั่งข้าวโพดซึ่งมีสารเคอร์ซีตินอยู่ปริมาณสูงไปบริเวณที่ไขสันหลังบาดเจ็บเพื่อเร่งการหายของการบาดเจ็บของไขสันหลังได้อย่างมีประสิทธิภาพ ดังนั้นการวิจัยครั้งนี้จึงมุ่งพัฒนาและทดสอบผลของแผ่นปิดผิวหนังเส้นใยโพลิเมอร์ระดับนาโนผสมสารสกัดชั่งข้าวโพดมวงในการเร่งการฟื้นคืนสภาพของไขสันหลังจากภาวะบาดเจ็บ แผ่นปิดผิวหนังเส้นใยโพลิเมอร์ระดับนาโนผสมสารสกัดชั่งข้าวโพดมวงจะถูกพัฒนาขึ้นด้วยกระบวนการทางไฟฟ้าสถิตย์ เนื่องจากสารสกัดแอลกอฮอล์ 50% ของชั่งข้าวโพดมวงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงจึงนำมาใช้ในการพัฒนาเป็นแผ่นปิดผิวหนังเส้นใยโพลิเมอร์ระดับนาโนผสมสารสกัดชั่งข้าวโพดมวง ตัวทำละลายที่เหมาะสมคือเอทานอล สภาพของกระบวนการที่เหมาะสมได้แก่ ความต่างศักย์ไฟฟ้า 21 กิโลโวลต์ ระยะห่างระหว่างปลายเข็มกับแผ่นรองรับ 15 เซนติเมตร อัตราการไหลอยู่ในช่วง 0.05-0.01 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง แผ่นปิดผิวหนังเส้นใยโพลิเมอร์ระดับนาโนผสมสารสกัดชั่งข้าวโพดมวงที่พัฒนาขึ้นมาสามารถปลดปล่อยสารเคอร์ซีตินได้อย่างช้าๆและดำรงอยู่เป็นเวลานาน และมีสถานะคงตัวที่อุณหภูมิ 37 องศา ความชื้น 65% เป็นเวลาไม่น้อยกว่า 3 เดือน

ผู้วิจัยได้ทำการทดสอบฤทธิ์ของแผ่นปิดผิวหนังเส้นใยโพลิเมอร์ระดับนาโนผสมสารสกัดชั่งข้าวโพดมวงในการเร่งการฟื้นคืนสภาพจากภาวะบาดเจ็บของไขสันหลังในแบบจำลองการบาดเจ็บของไขสันหลัง โดยการนำหนูแรทพันธุ์ Wistar เพศผู้ น้ำหนักประมาณ 180-220 กรัม มาเหนี่ยวนำการบาดเจ็บของไขสันหลังระดับ T10 ด้วย aneurysm clip จากนั้นทำการประเมินการฟื้นคืนสภาพของการบาดเจ็บไขสันหลังโดยใช้ Basso, Beattie and Bresnahan (BBB) , gross motor score, hot plate test, von frey filament ในวันที่ 3, 7, 14, 21 และ 28 หลังได้รับการดูแลการบาดเจ็บของไขสันหลังด้วยแผ่นปิดผิวหนังเส้นใยโพลิเมอร์ระดับนาโนผสมสารสกัดชั่งข้าวโพดมวง ผลการทดลองพบว่าหนูที่มีการบาดเจ็บของไขสันหลังและได้รับการดูแลภาวะไขสันหลังบาดเจ็บด้วยแผ่นปิดผิวหนังเส้นใยโพลิเมอร์ระดับนาโนผสมสารสกัดชั่งข้าวโพดมวงขนาด 5% และ 10% มี BBB score และ gross motor score ดีขึ้น นอกจากนั้นหนูที่มีการบาดเจ็บของไขสันหลังและได้รับการดูแลภาวะไขสันหลังบาดเจ็บด้วยแผ่นปิดผิวหนังเส้นใยโพลิเมอร์ระดับนาโนผสมสารสกัดชั่งข้าวโพดมวงทั้ง 2 ขนาด มีการฟื้นคืนสภาพการรับรู้ความรู้สึกเร็วเรื่องอุณหภูมิดีขึ้น เมื่อสิ้นสุดการศึกษาผู้วิจัยได้ทำการประเมินความหนาแน่นของเซลล์ประสาทและความเครียดออกซิเดชันในไขสันหลัง ผลการทดลองพบว่าหนูที่มีการบาดเจ็บของไขสันหลังและได้รับการดูแลภาวะไขสันหลังบาดเจ็บด้วยแผ่นปิดผิวหนังเส้นใยโพลิเมอร์ระดับนาโนผสมสารสกัดชั่งข้าวโพดมวง ลดการตายของเซลล์ประสาทในไขสันหลัง ทำให้ระดับ malondialdehyde (MDA) ในไขสันหลังลดลงและเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ catalase (CAT) ผู้วิจัยยังได้ประเมินแผ่นปิดผิวหนังเส้นใยโพลิเมอร์ระดับนาโนผสมสารสกัดชั่งข้าวโพดมวงต่อการทำงานของเอนไซม์ cyclo-oxygenase-2 (COX-2), GABA Transaminase (GABA-T), Nerve growth factor (NGF) และ Nitric oxide synthase (NOS) พบว่าหนูที่มีการบาดเจ็บของไขสันหลังและได้รับการดูแลภาวะไขสันหลังบาดเจ็บด้วยแผ่นปิดผิวหนังเส้นใยโพลิเมอร์ระดับนาโนผสมสารสกัดชั่งข้าวโพดมวงมีการทำงานของ COX-2 และ GABA-T ลดลง แต่เพิ่มการทำงานของ NGF อย่างไรก็ตามไม่พบการเปลี่ยนแปลงของ NOS

จากข้อมูลทั้งหมดจะเห็นว่าแผ่นปิดผิวหนังเส้นใยโพลิเมอร์ระดับนาโนผสมสารสกัดชั่งข้าวโพดมวงมีศักยภาพในการเร่งการฟื้นคืนสภาพของไขสันหลังหลังจากได้รับบาดเจ็บ โดยกลไกการออกฤทธิ์นั้นน่าจะผ่านการเพิ่มการสร้าง

Growth factor และผ่านการลดการอักเสบและความเครียดออกซิเดชันในไขสันหลัง และการใช้แผ่นปิดผิวหนังเส้นใย โพลีเมอร์ระดับนาโนผสมสารสกัดซึ่งข้าวโพดม่วงมีผลลดการทำงานของ GABAergic system ในไขสันหลังน้อย จึงมี โอกาสทำให้เกิดภาวะ neuropathic pain ลดลง ดังนั้นซึ่งข้าวโพดม่วงสามารถนำมาเพิ่มมูลค่าเป็นผลิตภัณฑ์สุขภาพ ในการเร่งการฟื้นคืนสภาพของไขสันหลังจากการบาดเจ็บได้เป็นอย่างดี อย่างไรก็ตามจำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติม ถึงสารสำคัญในการออกฤทธิ์ และความปลอดภัยในการใช้งานต่อไป ก่อนนำไปศึกษาใน clinical trial phase

Abstract

At present, transdermal delivery system via polymer based nanofiber has gained much attention due to the reduction of effective dose and adverse effects. Therefore, we hypothesized that polymer based nanofiber could deliver the extract of purple corn cob which contained abundant quercetin to the site of injury of spinal cord and effectively facilitate the recovery of spinal cord injury. Therefore, this study aimed to develop and to test the effect of polymer based nanofiber transdermal patch loaded with purple corn cob extract on the recovery of spinal cord following traumatic injury. The polymer based nanofiber transdermal patch loaded with purple corn cob extract was developed by electrospinning process. Since 50% alcohol extract of purple corn cob exhibited high antioxidant effect, it was used for developing the polymer based nanofiber transdermal patch loaded with purple corn cob extract. Ethanol was an appropriate solvent. The other suitable processing conditions were the voltage at 21 volt, the distance between needle and collection plate at 15 centimeters length and the flow rate between 0.005-0.01 milliliters/hour. The developed polymer based nanofiber transdermal patch loaded with purple corn cob extract could release quercetin from the patch slowly and sustained the release for a long time. The stability of the transdermal patch at temperature of 37°C and humidity 65% was not less than 3 months.

We also determined the facilitatory effect of polymer based nanofiber transdermal patch loaded with purple corn cob extract on the recovery of spinal cord injury in animal model of traumatic spinal cord injury. Male Wistar rats, weighing 180-220 g, were induced injury at spinal cord level of T10 by aneurysm clip. The assessments of spinal cord recovery were performed by using Basso, Beattie and Bresnahan (BBB), gross motor score, hot plate test, and von Frey filament tests at 3, 7, 14, 21 and 28 days of treatment with polymer based nanofiber transdermal patch loaded with purple corn cob extract. The results showed that rats with spinal cord injury which received polymer based nanofiber transdermal patch loaded with purple corn cob extract at concentrations of 5% and 10% improved BBB score and gross motor score. In addition, the improved thermal sensation was also observed in rats with spinal cord injury which received polymer based nanofiber transdermal patch loaded with purple corn cob extract at both concentrations. At the end of study, we also determined the density of survival neurons and oxidative stress in spinal cord. The increased density of survival neuron and catalase (CAT) activity but decreased malondialdehyde (MDA) level were observed in spinal cord injury rats which received polymer based nanofiber transdermal patch loaded with purple corn cob extract. We also determined the effect of polymer based nanofiber transdermal patch loaded with purple corn cob extract on the activities of cyclo-oxygenase -2 (COX-2), GABA Transaminase (GABA-T), nerve growth factor (NGF) and nitric oxide synthase (NOS) in spinal cord. The results showed that spinal

cord injury rats which received polymer based nanofiber transdermal patch loaded with purple corn cob extract showed the reduction of COX-2 and GABA-T but increased NGF. However, no change of NOS was observed.

Based on all pieces of information, polymer based nanofiber transdermal patch loaded with purple corn cob extract has the potential to facilitate spinal cord recovery after injury. The possible underlying mechanisms may occur via the elevation of nerve growth factor and via the decreased inflammation and oxidative stress in spinal cord. In addition, the polymer based nanofiber transdermal patch loaded with purple corn cob extract also decreased GABA-T activity so the opportunity to develop neuropathic pain was decreased. Therefore, purple corn cob can be increased its value as health product to facilitate the recovery of spinal cord following injury. However, further investigations concerning active ingredient and application safety are required before moving forward to clinical application.

บทที่1

บทนำ

1. ความสำคัญ และที่มาของปัญหา

ข้าวโพด หรือ Corn หรือ Maize มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Zea mays* Linn เป็นพืชตระกูลหญ้า Gramineae จัดเป็นธัญพืชที่มีความสำคัญเป็นอันดับสามของโลก รองมาจากแป้งสาลีและข้าว และจัดเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งของประเทศไทยพื้นที่ปลูกข้าวโพดในประเทศไทยมีมากถึง 6.6 ล้านไร่¹พื้นที่ที่ปลูกข้าวโพดมากในประเทศไทยได้แก่ ภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคกลาง ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือนั้นจะปลูกมากแถบ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือมี นครราชสีมา ศรีสะเกษ อุบลราชธานีขอนแก่น และชัยภูมิข้าวโพดไม่เพียงถูกปลูกเพื่อบริโภคในครัวเรือนแต่ยังถูกนำมาใช้ในแง่อุตสาหกรรมทั้งในรูปอุตสาหกรรมข้าวโพดหวานและอุตสาหกรรมข้าวโพดเลี้ยงสัตว์

ในอุตสาหกรรมข้าวโพดและการขายข้าวโพดฝักเพื่อบริโภคนั้นจะเกิดวัสดุที่ไม่ได้ใช้ได้แก่ เศษวัสดุ ทั้งเปลือกข้าว ฝักที่ไม่ได้มาตรฐาน โหม และซังข้าวโพด ซึ่งไม่ค่อยก่อรายได้หรือก่อรายได้้น้อยมาก ดังนั้นจากการสอบถามความต้องการของกลุ่มผู้ประกอบการด้านอุตสาหกรรมข้าวโพดได้แก่บริษัทแปซิฟิคเมลิตพันธุ์จำกัด และกลุ่มเกษตรกรข้าวโพดหวานผ่านทางไร่สุวรรณ และบริเวณบ้านฝางจังหวัดขอนแก่นพบว่ามีความต้องการที่จะเพิ่มมูลค่าของเศษวัสดุของข้าวโพดให้มีมูลค่าเพิ่มขึ้น ปัจจุบันถึงจะมีการนำเศษวัสดุเหล่านี้ไปเพิ่มมูลค่าในรูปแบบต่างๆ เช่น การนำซังข้าวโพดไปเป็นถ่าน ส่วนโหมข้าวโพดนั้นมีการนำไปพัฒนาเป็นเครื่องต้มชาขงบ้าง อย่างไรก็ตามการนำเศษวัสดุของข้าวโพดไปใช้ประโยชน์ในปัจจุบันยังไม่เต็มศักยภาพ ทั้งนี้เนื่องจากทั้งซังข้าวโพดและโหมข้าวโพดนั้นมีสรรพคุณในการที่จะนำไปใช้ในการสร้างเสริมสุขภาพได้มีรายงานการศึกษาว่าทั้งโหมข้าวโพดและซังข้าวโพดมีสรรพคุณทางการแพทย์หลายด้าน เช่น ซังข้าวโพด มีสรรพคุณลดการบวม ขับปัสสาวะ ท้องเสีย เหน็บชา และรักษาแผล ในขณะที่โหมข้าวโพดนั้นมีสรรพคุณลดบวม แก้เหน็บชา แก้เบาหวาน ลดอาการเครียด วิดก กังวล ความคิดสับสน ในผู้สูงอายุและผู้ที่อยู่ใกล้ภัยพริ้งพริ้วประจำเดือน รักษาอาการความจำเสื่อม และบำรุงกำลัง² อย่างไรก็ตามในปัจจุบันนี้ยังมีการใช้ประโยชน์จากเศษวัสดุนี้น้อย และไม่มีหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ที่จะสนับสนุนการใช้งานดังกล่าว

สินค้าและผลิตภัณฑ์ทางธรรมชาตินั้น กำลังเป็นที่นิยมค่อนข้างสูงในหมู่ผู้บริโภค ทั้งในแถบเอเชีย และโดยเฉพาะอย่างยิ่งในแถบตลาดยุโรป ทั้งนี้เนื่องมาจากผู้บริโภคต่างหันมาให้ความสนใจกับสุขภาพร่างกายกันมากขึ้น จึงหันมาบริโภคอาหารและผลิตภัณฑ์ทางธรรมชาติซึ่งไม่เป็นพิษต่อร่างกาย

ดังนั้นจะเห็นว่าการเพิ่มมูลค่าของเศษวัสดุจากอุตสาหกรรมข้าวโพดในรูปผลิตภัณฑ์สุขภาพและเครื่องสำอาง จึงเป็นช่องทางหนึ่งที่น่าจะมีศักยภาพในการสร้างรายได้ได้อย่างดี และยังมีอัตราการเติบโตค่อนข้างสูง เนื่องจากผลิตภัณฑ์สุขภาพยังคงเป็นที่ต้องการในท้องตลาด การทำโหมมูลค่าของวัสดุที่ไม่ได้ใช้เกิดประโยชน์ในรูปของผลิตภัณฑ์สุขภาพนั้นนอกจากจะเป็นการเพิ่มศักยภาพการแข่งขันในอุตสาหกรรมข้าวโพดในรูปผลิตภัณฑ์ใหม่ ซึ่งเกิดประโยชน์ทั้งกับผู้ประกอบการด้านอุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์สุขภาพและเครื่องสำอาง และเกษตรกรที่ปลูกข้าวโพดทั้งข้าวโพดเลี้ยงสัตว์และข้าวโพดหวาน ที่มีไม่น้อยกว่า 313,886 ราย และมีพื้นที่ประมาณ 6.6 ล้านไร่ ทำให้มีรายได้เพิ่มขึ้นไม่น้อยกว่า 90% เนื่องจากเศษวัสดุนั้นไม่ค่อยก่อให้เกิดรายได้ ราคาซังข้าวโพดที่ขายได้ในปัจจุบันมีเพียงราคา ตัน (1000 กิโลกรัม) ละ 100-200 บาท หรือกิโลกรัมละ 0.1-0.2 บาทและมีผลผลิตประมาณ 500 กิโลกรัมต่อไร่³ และราคาของต้นข้าวโพดซึ่งมีผลผลิตประมาณ 5,000 กก./ไร่ประมาณ ราคา กิโลกรัมละ 0.80 บาทเปลือกและโหมข้าวโพดซึ่งมีผลผลิตประมาณ 1,300 กก./ไร่และราคา กิโลกรัมละ 0.80 บาท⁴ ดังนั้นหากขายเศษวัสดุนี้นี้

ของประเทศได้ทั้งหมดจะมีมูลค่าจะประมาณ 332,706 ล้านบาท และหากนำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สุขภาพมูลค่าเหล่านี้ จะเพิ่มขึ้นไม่น้อยกว่า 90% หรือเพิ่มขึ้นประมาณ 299,435.4 ล้านบาท

ปัจจุบันจะมีแผ่นปิดผิวหนังและผลิตภัณฑ์คล้ายแผ่นปิดผิวหนังอยู่เป็นจำนวนมากไม่ว่าจะเป็นแผ่นแปะที่ใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ เช่น แผ่นแปะที่บรรจุยาเพื่อลดความดัน ยาคุมกำเนิด ยาแก้ปวด ยาเพิ่มความจำ ยารักษาโรคพาร์กินสัน แผ่นแปะบรรจุฮอร์โมน ตลอดจนแผ่นแปะที่ใช้ในเรื่องเวชสำอางลดริ้วรอย ข้อมูลจากการรายงานสภาพแนวโน้มการตลาดของผลิตภัณฑ์แผ่นปิดผิวหนังเมื่อปี 2009 พบว่ามีมูลค่าสูงถึง 5.6 พันล้านบาทและยังมีแนวโน้มการเจริญเติบโตเนื่องจากรูปแบบการนำส่งประเภทนี้จะสามารถลด first pass effect ทำให้สามารถเห็นประสิทธิผลในขนาดที่ต่ำกว่ารูปแบบการกิน และมีโอกาสในการเกิดอาการไม่พึงประสงค์ลดลง

แผ่นแปะผิวหนังและผลิตภัณฑ์คล้ายแผ่นปิดผิวหนังโดยเฉพาะเยื่อปัจจุบันส่วนใหญ่จะพัฒนาขึ้นมาโดยใช้สารโพลิเมอร์และเส้นใยนาโนเป็นตัวนำส่งสารออกฤทธิ์ และแนวโน้มความต้องการของวัสดุประเภทนี้ทั้งในปัจจุบันและอนาคตจะให้ความสำคัญกับวัสดุที่ย่อยสลายได้ตามธรรมชาติและสามารถนำกลับมาใช้ได้มากขึ้น⁵ ดังนั้นการพัฒนาผลิตภัณฑ์แผ่นแปะผิวหนังและผลิตภัณฑ์คล้ายแผ่นปิดผิวหนังจากโพลิเมอร์ที่มีในธรรมชาติ ที่พบในเศษวัสดุข้าวโพด จึงน่าจะเป็นทางเลือกที่มีศักยภาพในการเพิ่มมูลค่าเศษวัสดุและตอบสนองต่อความต้องการในปัจจุบันและแนวโน้มความต้องการในอนาคตเป็นอย่างดี

2. วัตถุประสงค์หลัก

เพื่อพัฒนาและทดสอบแผ่นปิดผิวหนังในโครงการฟื้นคืนสภาพจากภาวะบาดเจ็บของไขสันหลัง โดยมีวัตถุประสงค์ย่อยดังนี้

ปีที่ 1

- 2.1 พัฒนาแผ่นปิดผิวหนังเส้นใยโพลิเมอร์ระดับนาโนผสมสารสกัดชั่งข้าวโพดม่วง
- 2.2 ทดสอบ physical property, การปลดปล่อยสาร และ biological property ของแผ่นปิดผิวหนังเส้นใยโพลิเมอร์ระดับนาโนผสมสารสกัดชั่งข้าวโพดม่วง
- 2.3 ทดสอบฤทธิ์ของแผ่นปิดผิวหนังเส้นใยโพลิเมอร์ระดับนาโนผสมสารสกัดชั่งข้าวโพดม่วงในโครงการฟื้นคืนสภาพจากภาวะบาดเจ็บของไขสันหลังจากเศษวัสดุข้าวโพดในสัตว์ทดลอง

ปีที่ 2

- 2.4 ทดสอบความปลอดภัยในสัตว์ทดลอง

ปีที่ 3

- 2.5 ทดสอบความปลอดภัยในอาสาสมัคร

การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

การควบคุมยาหรือสารออกฤทธิ์ให้ปลดปล่อยยาหรือสารออกฤทธิ์ให้ปลดปล่อยยาในอัตราและปริมาณที่กำหนดและสามารถนำไปยังอวัยวะหรือบริเวณเป้าหมายในร่างกายได้ตามต้องการเพื่อทำให้เกิดผลสูงสุดในการรักษาและลดผลข้างเคียงจัดเป็นเป้าหมายที่สำคัญอย่างหนึ่ง ดังนั้นปัจจุบันจึงมีการพัฒนาการนำส่งยาหรือสารออกฤทธิ์ด้วยรูปแบบต่างๆกัน รวมทั้งการใช้โพลิเมอร์และเส้นใยนาโนมาช่วยในการนำส่งยาหรือสารออกฤทธิ์โดยเน้นการทำหน้าที่ในด้าน ควบคุมการปลดปล่อยสารออกฤทธิ์ให้เกิดซ้ำๆ และคงที่ในปริมาณที่ต้องการเป็นตัวช่วยป้องกันและนำส่งสารออกฤทธิ์ไปยังบริเวณเป้าหมายในร่างกายโดยไม่ทำให้สารดังกล่าวเกิดการปลดปล่อยหรือถูกทำลายไปก่อน

ปัจจุบัน plant based polymer จะได้รับความสนใจอย่างมากเนื่องจากประหยัด ใช้งานง่าย สามารถถูกทำลายหรือย่อยสลายได้ทางชีวภาพ และไม่เป็นพิษต่อร่างกาย และเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม⁶ โพรตีนและคาร์โบไฮเดรตที่พบในพืชสามารถนำมาใช้ในทางเภสัชมากสามารถพัฒนานำส่งยาหรือสารออกฤทธิ์ได้เป็นอย่างดี¹⁰ อย่างไรก็ตามพอลิเมอร์นั้นสามารถเกิดการออกซิเดชันได้ทุกขั้นตอน¹¹

ข้าวโพด หรือ Corn หรือ Maize มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Zea mays* Linn เป็นพืชตระกูลหญ้า Gramineae จัดเป็นธัญพืชที่มีความสำคัญเป็นอันดับสามของโลก รองมาจากแป้งสาลีและข้าว และจัดเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งของประเทศไทยพื้นที่ปลูกข้าวโพดในประเทศไทยมีมากถึง 6.6 ล้านไร่¹ พื้นที่ที่ปลูกข้าวโพดมากในประเทศไทยได้แก่ ภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคกลาง ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือนั้นจะปลูกมากแถบ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือมี นครราชสีมา ศรีสะเกษ อุบลราชธานีขอนแก่น และชัยภูมิข้าวโพดไม่เพียงถูกปลูกเพื่อบริโภคในครัวเรือนแต่ยังถูกนำมาใช้ในแง่อุตสาหกรรมทั้งในรูปอุตสาหกรรมข้าวโพดหวานและอุตสาหกรรมข้าวโพดเลี้ยงสัตว์

ในอุตสาหกรรมข้าวโพดและการขายข้าวโพดฝักเพื่อบริโภคนั้นจะเกิดวัสดุที่ไม่ได้ใช้ได้แก่ เศษวัสดุ ทั้งเปลือกข้าว ฝักที่ไม่ได้มาตรฐาน ใหม่ และซังข้าวโพด ซึ่งไม่ค่อยก่อรายได้หรือก่อรายได้้น้อยมาก ดังนั้นจากการสอบถามความต้องการของกลุ่มผู้ประกอบการด้านอุตสาหกรรมข้าวโพดได้แก่บริษัทแปซิฟิกเมล็ดพันธุ์จำกัด และกลุ่มเกษตรกรข้าวโพดหวานผ่านทางไร่สุวรรณ และบริเวณบ้านฝางจังหวัดขอนแก่นพบว่ามีความต้องการที่จะเพิ่มมูลค่าของเศษวัสดุของข้าวโพดให้มีมูลค่าเพิ่มขึ้น ปัจจุบันถึงจะมีการนำเศษวัสดุเหล่านี้ไปเพิ่มมูลค่าในรูปแบบต่างๆ เช่น การนำซังข้าวโพดไปเป็นถ่าน ส่วนไหมข้าวโพดนั้นมีการนำไปพัฒนาเป็นเครื่องต้มชาขงบ้าง อย่างไรก็ตามการนำเศษวัสดุของข้าวโพดไปใช้ประโยชน์ในปัจจุบันยังไม่เต็มศักยภาพ ทั้งนี้เนื่องจากทั้งซังข้าวโพดและไหมข้าวโพดนั้นมีสรรพคุณในการที่จะนำไปใช้ในการสร้างเสริมสุขภาพได้มีรายงานการศึกษาว่าทั้งไหมข้าวโพดและซังข้าวโพดมีสรรพคุณทางการแพทย์หลายด้าน เช่น ซังข้าวโพด มีสรรพคุณลดการบวม ขับปัสสาวะ ท้องเสีย เหน็บชา และรักษาแผล ในขณะที่ไหมข้าวโพดนั้นมีสรรพคุณลดบวม แก้เหน็บชา แก้เบาหวาน ลดอาการเครียด วิตก กังวล ความคิดสับสน ในผู้สูงอายุและผู้ที่อยู่ใกล้ภัยอันตรายประจำเดือน รักษาอาการความจำเสื่อม และบำรุงกำลัง²

นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าเศษวัสดุของข้าวโพดจะมีปริมาณโปรตีนสูงซังข้าวโพดที่เหลือทิ้งจากโรงงานผลิตซังข้าวโพดซึ่งจะมีส่วนของเมล็ดติดหลงเหลืออยู่มีโปรตีนประมาณ 7-8% เยื่อใยหยาบ 23.5% แคลเซียมต่ำ 0.04-0.11% นอกจากนี้ ยังมีเศษเหลือพวกยอดและช่อดอกตัวผู้ของข้าวโพดหวานที่ต้องตัดออกก่อนช่อดอกจะบาน หรือ 7-10 วันก่อนเก็บเกี่ยวฝักเพื่อเร่งให้ฝักโตเร็วขึ้น และลดการแย่งอาหารซึ่งส่วนนี้จะมีคุณค่าทางอาหารสูงมีโปรตีนประมาณ 11% เยื่อใยหยาบ 21% นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าซังข้าวโพดยังมี เซลลูโลส 40-60% เฮมิเซลลูโลส 20-

30% และกลีนิ 15-30% ดังนั้นจะเห็นว่าเศษวัสดุจากอุตสาหกรรมข้าวโพดจะมีสารที่จะสามารถนำไปพัฒนาเป็นโพลิเมอร์นำส่งสารออกฤทธิ์ได้ไม่น้อยทีเดียว¹²

สภาพการดำรงชีวิตในปัจจุบันมีผลทำให้อัตราการเกิดอุบัติเหตุต่างๆเพิ่มขึ้น อุบัติเหตุที่เกิดขึ้นนั้นพบว่าร้อยละ 3 ของผู้ป่วยที่มาด้วยอุบัติเหตุทางท้องถนนจะมีปัญหาการบาดเจ็บของไขสันหลัง เมื่อเกิดการบาดเจ็บของไขสันหลังขึ้นแพทย์จำเป็นต้องให้การรักษาโดยการผ่าตัดเพื่อลดปัญหาการกดทับไขสันหลังอย่างเร่งด่วนเนื่องจากถือเป็นภาวะทางฉุกเฉินทางศัลยกรรมประสาท ภาวะนี้สามารถส่งผลกระทบทำให้เกิดการตายหรือทุพพลภาพจนต้องเกิดภาวะพึ่งพาขึ้น

การบาดเจ็บของไขสันหลังมักมีปัญหาการฟื้นตัวค่อนข้างลำบากเนื่องจากปัญหาเรื่องการสูญเสียเซลล์ประสาทที่ทำหน้าที่สั่งการและการไม่สามารถงอกปลายประสาท (axon regeneration) ไปควบคุมสั่งการอวัยวะเป้าหมายเพื่อสร้างจุดประสาน (synapse) ได้อย่างถูกต้อง เนื่องจากมักจะพบว่ามีปัญหาเรื่องเซลล์ค้ำจุนหรือ glial cell สร้างแผลเป็น (scar) ขึ้นมาขัดขวางการงอกของปลายประสาทยิ่งไปกว่านั้นในการผ่าตัดเพื่อรักษาภาวะดังกล่าวมักเกิดภาวะแทรกซ้อนที่เรียกว่า epidural fibrosis เนื่องจากการซ่อมแซมร่างกายเมื่อเกิดการบาดเจ็บจะมีการสร้างเนื้อเยื่อเกี่ยวพันเพื่อทดแทนเนื้อเยื่อเดิมเกิดเป็นพังผืดหรือ fibrosis ขึ้นที่เยื่อหุ้ม dura ซึ่งเป็นเยื่อหุ้มไขสันหลังทำให้เกิดการกดทับหรือดึงรั้งรากประสาทที่อยู่ใกล้เคียงทำให้ผู้ป่วยต้องที่เกิดภาวะดังกล่าวต้องได้รับความทุกข์ทรมานจากความเจ็บปวดที่ตามมา หรือที่เรียกว่า failed back syndrome¹³ ภาวะดังกล่าวและการเร่งการฟื้นคืนสภาพของไขสันหลังจึงถือเป็นภาวะที่ยังจัดเป็นปัญหาท้าทายที่พบในปัจจุบัน

ข้อมูลจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าเคออสตินซึ่งเป็นสารพลาโวนอยด์ที่พบมากในผักผลไม้ไม่สามารถที่จะเร่งการฟื้นคืนสภาพของไขสันหลังที่ได้รับบาดเจ็บ มีรายงานว่าหนูขาวที่ได้รับการเหนี่ยวนำให้เกิดการบาดเจ็บของไขสันหลังและได้รับการฉีดสารเคออสตินเข้าทางช่องท้องในขนาด 25 ไมโครกรัม ต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว วันละ 2 ครั้งเป็นเวลา 3-10 วันจะมีการฟื้นคืนสภาพการทำงานของไขสันหลังจนกระทั่งสามารถเดินได้ถึงร้อยละ 50¹⁴ นอกจากนั้นยังพบว่าหนูกลุ่มที่ได้รับสารเคออสตินจะมีดัชนีแสดงความรุนแรงของการบาดเจ็บทางระบบประสาทส่วนกลางในซีรัมหรือระดับ S-100 เพิ่มขึ้น แสดงถึงการมี neuroprotection effect ทำให้ความรุนแรงของการบาดเจ็บของระบบประสาทส่วนกลางหรือไขสันหลังลดลงและมีการ regeneration ดีขึ้น¹⁵ ยิ่งไปกว่านั้นการทดลองเบื้องต้นของคณะผู้วิจัยเองพบว่าสัตว์ทดลองที่ได้รับการป้อนสารเคออสตินขนาด 300 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัววันละครั้ง หรือได้รับเคออสตินผ่านแผ่นปิดผิวหนังเส้นใยโพลิเมอร์ระดับนาโนผสมสารเคออสติน 1% สามารถเร่งการฟื้นคืนสภาพของเส้นประสาทได้อย่างดี โดยเฉพาะขนาดของสารที่ให้ผลในการรักษาที่ใช้ในกรณีที่ใช้เส้นใยนาโนเป็นตัวนำส่งนั้นจะมีขนาดลดลงเป็น 100 เท่า

ข้อมูลจากงานวิจัยเมื่อเร็วๆนี้พบว่าชั่ง โคม ข้าวโพดซึ่งเป็นวัสดุเหลือใช้ จะมีสารเคออสตินอยู่^{16,17} ดังนั้นการนำเศษวัสดุเหล่านี้มาพัฒนาเป็นแผ่นปิดแผลนาโนเพื่อเร่งการหายและลดภาวะการเกิดพังผืดในภาวะไขสันหลังบาดเจ็บ

บทที่ 3

ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การเตรียมสารสกัดข้าวโพดม่วง

นำซังข้าวโพดม่วงมาล้างน้ำให้สะอาด ผึ่งไว้ให้สะเด็ดน้ำ หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ นำไปอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส หลังจากแห้งนำไปป่นด้วยเครื่องบดจนละเอียด นำไปสกัดด้วยตัวทำละลาย ได้แก่ แอลกอฮอล์ 50 % หรือ 95% โดยซังซังข้าวโพดม่วงแห้งต่อตัวทำละลายในอัตราส่วน 1:10 (กรัม:มิลลิลิตร) หลังจากนั้นกรองเอาส่วนสารสกัดด้วยผ้าขาวบาง และกระดาษกรอง ตามลำดับ ระเหยตัวทำละลาย ด้วยเครื่องระเหยแบบหมุนเหวี่ยง (rotatory evaporator) จนหมด นำสารสกัดที่ได้ไปใส่บรรจุภัณฑ์ที่กันแสง เก็บที่อุณหภูมิ 0-4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ทดลอง จากนั้นนำสารสกัดไปทำ finger print และตรวจประเมินระดับ total phenolic compounds, flavonoidsฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), Ferric reducing ability of plasma (FRAP)

3.2 การเตรียมแผ่นปิดผิวหนังเส้นใยโพลิเมอร์ระดับนาโน (polymer based nanofiber transdermal patch)

นำสารสกัดซังข้าวโพดม่วงที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 50 % มาเตรียมเป็นแผ่นปิดผิวหนังเส้นใยโพลิเมอร์ระดับนาโนสำหรับปิดผิวหนังด้วยวิธี การปั่นเส้นใยด้วยไฟฟ้า (Electrospinning) โดยนำสารละลายที่เตรียมได้ มาฉีดผ่านปลายเข็มโลหะเบอร์ 22 ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.7 มิลลิเมตร และต่อกับแหล่งกำเนิดไฟฟ้าที่จ่ายความต่างศักย์ 21 กิโลโวลต์ ระยะห่างระหว่างปลายเข็มกับแผ่นรองรับซึ่งต่อกับสายดินของแหล่งกำเนิดไฟฟ้าคือ 15 เซนติเมตร โดยจะปรับเปลี่ยนปัจจัยต่างที่มีผลต่อการขึ้นรูปของเส้นใยนาโนดังแสดงในตารางที่ 2-1

ตารางที่ 2-1 แสดงสภาวะของปัจจัยต่างๆที่ใช้ในการเตรียม

Electrospun	Zein	สารสกัดข้าวโพด สีม่วง 5%	สารสกัดข้าวโพด สีม่วง 10%
Total of mix solution for injection	5ml	5ml	5ml
Zein base (g)	1.35	1.2825	1.215
Additive substance(Zeamays) (mg)	0	0. 0675	0.135
Solvent 70Eth (ml)	5	5	5
Initial Flow rate (ml/hr)	0.1	0.05	0.05
Electric potential (KV)	20	20	20
Distance from nozzle to collector (cm)	15	15	15
Collector angle (°)	85	85	85
Preparation time of solution (hr)	8hr	8hr	8hr
Spinning time of solution (hr)	6hr	6hr	6hr
Temperature (°C)	22-28°C	22-28°C	22-28°C
%Humidity	50-60%	50-60%	50-60%



รูปที่ 2-1 เครื่อง Electrospinning

3.3 ประเมินคุณสมบัติแผ่นปิดผิวหนังเส้นใยโพลิเมอร์ระดับนาโน

ประเมิน morphology ของแผ่นปิดผิวหนังเส้นใยโพลิเมอร์ระดับนาโนด้วย scanning electron microscope (SEM) ประเมิน biological property และ stability ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และเก็บไว้ที่อุณหภูมิแบบสภาวะเร่ง คือ อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมงและอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง สลับกัน จำนวน 3 รอบ

3.4 ประเมินทดสอบฤทธิ์ของแผ่นปิดผิวหนังเส้นใยโพลิเมอร์ระดับนาโนต่อการฟื้นคืนสภาพจากภาวะบาดเจ็บของไขสันหลัง และการเกิด fibrosis

เหนี่ยวนำหนูแรท สายพันธุ์ wistar rat น้ำหนัก 180-250 กรัม ให้เกิดภาวะบาดเจ็บทางไขสันหลัง ดังนี้

กลุ่มที่ 1 คือ กลุ่ม sham operation ซึ่งทำการผ่าตัดหลอกและไม่ได้รับการรักษาใดๆ

จำนวนสัตว์ทดลอง 8 ตัว

กลุ่มที่ 2 คือ กลุ่ม spinal cord injury คือกลุ่มที่ได้รับกลุ่มได้รับการเหนี่ยวนำให้เกิดการบาดเจ็บของ

ไขสันหลังและได้รับการทาแผลด้วยด้วยเบตาดีนวันละ 1 ครั้ง ได้รับการปิดด้วยพลาสติก neoplast ขนาด 1.3X1.3 เซนติเมตรบริเวณที่ผ่าตัดวันละ 1 ครั้ง ทำการเปลี่ยนทุกวันวันละ 1 ครั้งติดต่อกัน 30 วันจำนวนสัตว์ทดลอง 8 ตัว

กลุ่มที่ 3 คือ กลุ่ม positive control คือกลุ่มที่ได้รับกลุ่มได้รับการเหนี่ยวนำให้เกิดการบาดเจ็บของ

ไขสันหลังได้รับการทาแผลด้วยด้วยเบตาดีนวันละ 1 ครั้ง ปิดด้วยพลาสติก neoplast ขนาด 1.3X1.3 เซนติเมตรทำการเปลี่ยนทุกวันวันละ 1 ครั้งติดต่อกัน 30 วัน และได้รับ Dexamatazone 40 mg/kg/day (Jiunn et al.1999) ทำการป้อนสารทุกวันวันละ 1 ครั้งติดต่อกัน 3 วัน จำนวนสัตว์ทดลอง 8 ตัว

กลุ่มที่ 4 คือ กลุ่ม Zein คือกลุ่มที่ได้รับกลุ่มได้รับการเหนี่ยวนำให้เกิดการบาดเจ็บของไขสันหลังและ

รับแผ่นปิดผิวหนังเส้นใยโพลิเมอร์ระดับนาโนจาก Zein ขนาด 1.3X1.3 เซนติเมตรทำการเปลี่ยนทุกวันวันละ 1 ครั้งติดต่อกัน 30 วัน จำนวนสัตว์ทดลอง 8 ตัว

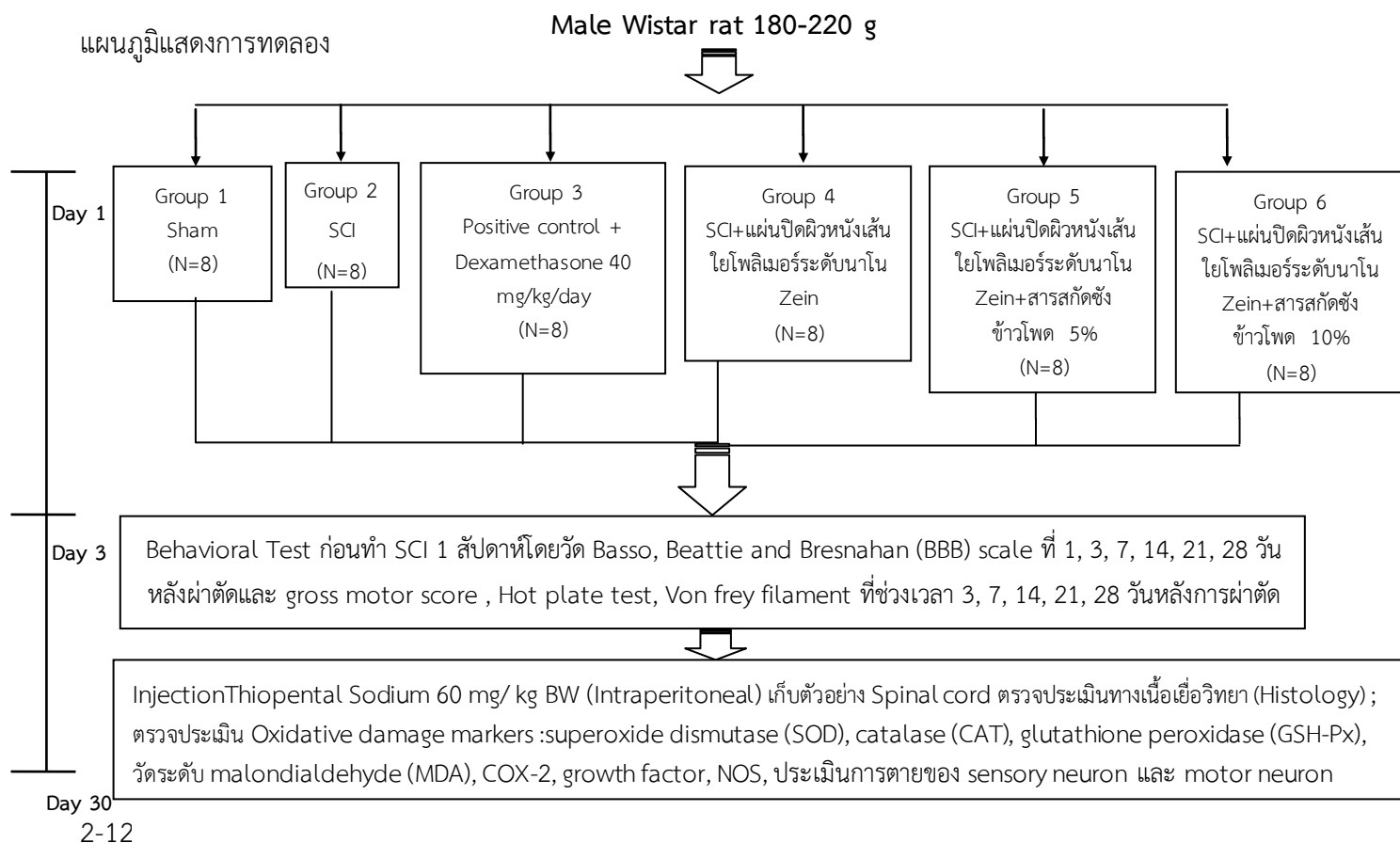
กลุ่มที่ 5 คือกลุ่ม Zein plus สารสกัดข้าวโพดม่วง 5% คือกลุ่มที่ได้รับกลุ่มได้รับการเหนี่ยวนำให้เกิด

การบาดเจ็บของไขสันหลังและได้รับแผ่นปิดผิวหนังเส้นใยโพลิเมอร์ระดับนาโนจาก zein ผสมสารสกัดข้าวโพดม่วง 5% ขนาด 1.3X1.3 เซนติเมตรทำการเปลี่ยนทุกวันวันละ 1 ครั้งติดต่อกัน 30 วัน จำนวนสัตว์ทดลอง 8 ตัว

กลุ่มที่ 6 คือกลุ่ม Zein plus สารสกัดข้าวโพดม่วง 10% คือกลุ่มที่ได้รับกลุ่มได้รับการเหนี่ยวนำให้เกิดการบาดเจ็บของไขสันหลังและกลุ่มที่ได้รับแผ่นปิดผิวหนังเส้นใยโพลิเมอร์ระดับนาโนจาก zein ผสมสารสกัดข้าวโพดม่วง 10 % ขนาด 1.3X1.3 เซนติเมตรทำการเปลี่ยนทุกวันวันละ 1 ครั้งติดต่อกัน 30 วัน จำนวนสัตว์ทดลอง 8 ตัว

ประเมินการฟื้นคืนสภาพของการบาดเจ็บไขสันหลังโดย การทำ Open field behavior test วิเคราะห์ก่อน 1 สัปดาห์และที่ 3, 7, 14, 21, 28 วัน หลังผ่าตัดโดยใช้ Basso, Beattie and Bresnahan (BBB) scale โดยสัตว์จะถูกวางในกล่องพลาสติกสี่เหลี่ยม 80X80 เซนติเมตร บันทึกภาพด้วยกล้องบันทึกภาพ 3 ทิศทาง ให้คะแนนตามฟังก์ชันการเคลื่อนที่คะแนนจาก 0 ไม่เคลื่อนไหว จนถึง 21 เคลื่อนไหวได้ตามปกติ และทำการประเมินการรับรู้ความรู้สึกด้วย hot plate test, von frey filament และประเมินการที่ช่วงเวลา 3, 7, 14, 21, 28 วัน

เมื่อสิ้นสุดการทดลองนำไขสันหลังมาตรวจประเมินการเปลี่ยนแปลงของ oxidative damage markers ได้แก่ superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GSH-Px) และดูระดับ malondialdehyde (MDA), nitric oxide, COX-2, growth factor ซึ่งเป็นปัจจัยที่สำคัญต่อการฟื้นคืนสภาพของเส้นประสาทและการ regeneration และการประเมินการทำงานของ GABA transaminase (GABA-T) ซึ่งระบบประสาทที่ใช้ GABA เป็นสารสื่อประสาทซึ่งมีบทบาทสำคัญต่อการเกิด neuropathic pain ซึ่งมักเกิดตามหลังการบาดเจ็บของระบบประสาทส่วนกลาง ในช่วงที่พบการเปลี่ยนแปลงของพฤติกรรมที่กล่าวข้างต้น และทำการประเมินการตายของเซลล์ประสาทรับความรู้สึก (sensory neuron) และ เซลล์ประสาทสั่งการ (motor neuron)



รายงานสมบูรณ์

การเพิ่มมูลค่าวัสดุจากอุตสาหกรรมข้าวโพดในรูปของผลิตภัณฑ์สุขภาพ ปีงบประมาณ 2555

การเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะบาดเจ็บของไขสันหลัง

ในการศึกษาครั้งนี้สัตว์ทดลองจะได้รับการเหนี่ยวนำให้เกิดการบาดเจ็บของเส้นประสาทไขสันหลังโดยวิธีการ Spinal cord injury model Aneurysm clip การเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะบาดเจ็บของไขสันหลัง บริเวณ T10 ในสัตว์ทดลองประเภทหนูแรท สายพันธุ์ wistar เพศผู้ อายุ 8 สัปดาห์น้ำหนัก 180-220 กรัม²⁰⁻²¹

1. น้ำหนักตัวถูกวัดและถูกเปรียบเทียบทุกวันก่อนและหลังการผ่าตัด^{20, 23}
2. สัตว์ทดลองจะได้รับการทำให้สลบโดย โดย Thiopental sodium (60 mg/kg BW) ผ่านทาง Intraperitoneal และ Isoflurane 5% mg/kg BW Inhaled (IACUC Guideline) เมื่อทดสอบทาง pain reflex แล้วพบว่าสัตว์ทดลองไม่มีความรู้สึกต่อความเจ็บปวดแล้วจึงทำการโกนขนบริเวณด้านหลังจากระดับ T9-T11 และทำความสะอาดบริเวณผ่าตัดด้วยแอลกอฮอล์ 70% และ ทาเบตาตินจากนั้นใช้ผ้าสีเหลืองเจาะกลาง sterile คลุม ก่อนทำการผ่าตัด ทำการผ่าตัดที่บริเวณ T9-T11 โดยผ่าตัดตามแนวยาวด้านซ้ายจาก midline ของ cord ยาวประมาณ 2 เซนติเมตร
3. ทำการ Laminectomy โดยตัดกระดูกสันหลังระดับ T9-T10 ออกโดยใช้ iris scissors และการกำจัดเนื้อเยื่อโดยการคีบออกอย่างระมัดระวัง²¹
4. เปิดกระดูกออก (hemi section) เพื่อทำการหนีไขสันหลัง (Spinal cord) ระดับ T10 โดยใช้ Aneurysm clip แรงหนีบ 2 กรัม หนีบเป็นเวลา 15 วินาที²⁴⁻²⁷



Fig. 1. Intraoperative photograph showing spinal cord compression at T10 by application of an aneurysm clip. This figure is available in colour at www.science-direct.com.

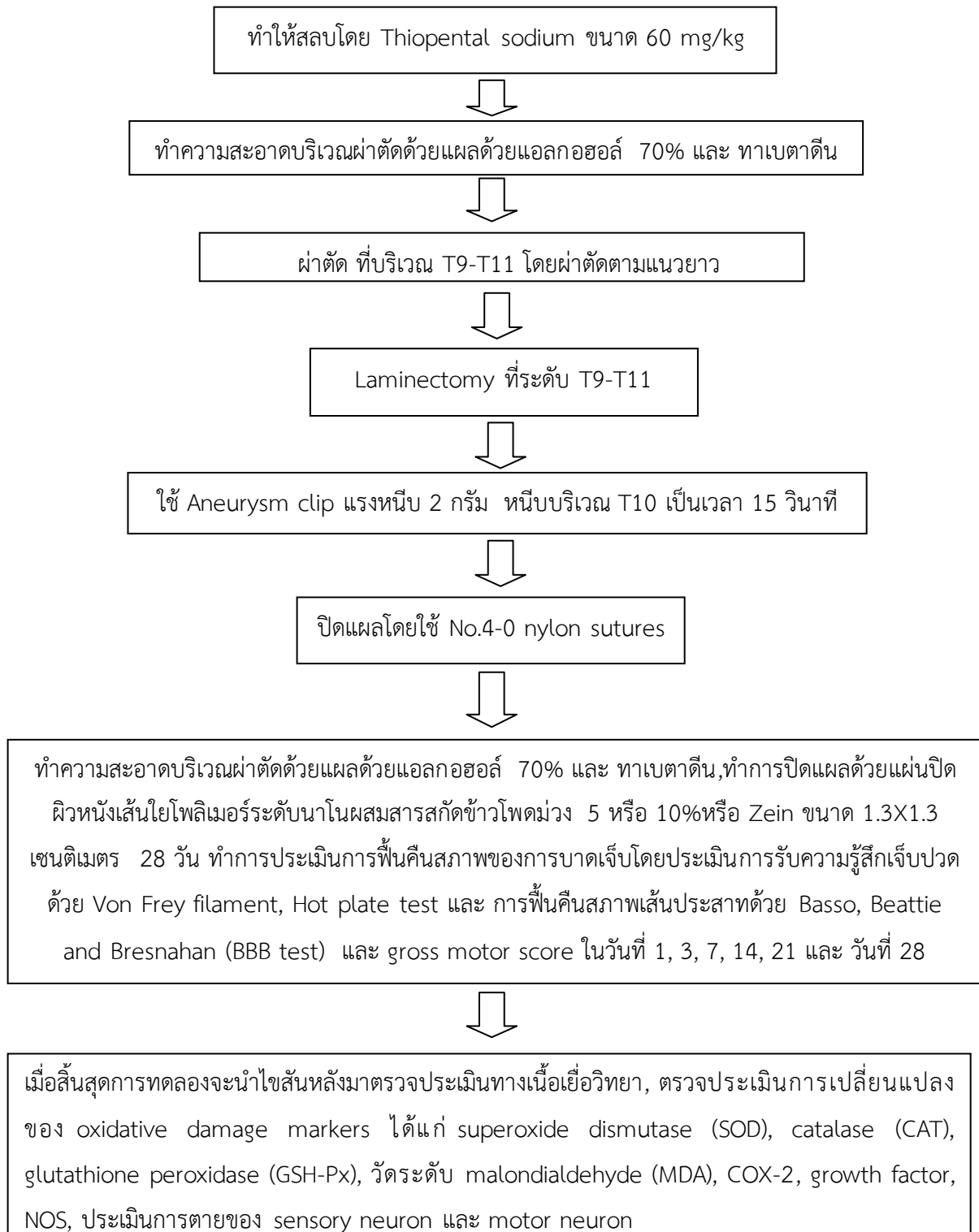
รูปที่ 2-2 แสดงการผ่าตัดโดยใช้ Aneurysm clip²⁶ หนีบไขสันหลัง

5. หลังจากนั้นทำการปิดแผลโดยใช้ No.4-0 nylon sutures เมื่อปิดแผลเรียบร้อยแล้วทำความสะอาดรอบแผลด้วยแอลกอฮอล์ 70% และ ทาเบตาตินเพื่อป้องกันการอักเสบ
6. ในระหว่างการกู้คืน จากการระงับความรู้สึกสัตว์ทดลองจะถูกวางบน warm heating pad จนกระทั่งสัตว์ทดลองฟื้น ¹⁸⁻²⁰ การผ่าตัดนี้จะดำเนินการภายใต้เงื่อนไขที่ผ่านการฆ่าเชื้อ
7. สัตว์ทดลองจะได้รับยาแก้ปวด Tramadol oral route (1.5–12 mg/kg, ทุก 12 ชั่วโมง 3 วัน และ ยาปฏิชีวนะใช้รักษาการติดเชื้อ Tetracycline 50 mg/kg oral route (Morris et al.1994) ทุก 12 ชั่วโมง 3 วัน
8. สัตว์ทดลองหลังการบาดเจ็บของไขสันหลังระดับ T10 จะไม่สามารถกลืนปัสสาวะหรืออุจจาระเองได้ ซึ่งสัตว์ทดลองจะถูกนวดกระเพาะปัสสาวะเพื่อให้ปัสสาวะ 2 ครั้ง/วัน จนกว่าสัตว์ทดลองจะสามารถปัสสาวะได้เองเป็นปริมาณ 2 ml ในตอนเช้า ซึ่งระยะเวลาประมาณ 10 วัน หลังการผ่าตัดให้อาหารอ่อนและน้ำอัตรากปกติ และควบคุมน้ำหนักทุกวัน โดยหากน้ำหนักลดลงทำการป้อนsaline-glucose 5% ทางปากปริมาณ1 ml/1 กรัม น้ำหนักที่ลดลง ตั้งแต่ 1-20 mL/วัน ¹⁸⁻¹⁹ เมื่อครบ 7 วัน จะทำการตัดไหม
9. หากพบว่าสัตว์ทดลองแสดงอาการเจ็บปวด มีการบาดเจ็บมากเกินไปหรือได้รับการทรมานอย่างเช่น ไม่สามารถดื่มน้ำและรับประทานอาหารได้เอง ส่งเสียงร้องตลอดเวลา หลังจากนั้นหากพบว่าสัตว์ทดลองไม่ดีขึ้นจะได้รับการแยกกรงและคัดออก เพื่อได้รับดูแลตลอด 24 ชั่วโมง และหากไม่ดีขึ้น จะได้รับการคัดออกและทำการ Terminate เพื่อลดความทรมานในสัตว์ทดลอง

ตารางที่ 2-2 ภาวะแทรกซ้อนจากการเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะบาดเจ็บของไขสันหลังที่ระดับ T10

Side effect aneurysm clip at T10	Postoperative Care
Weight loss	สัตว์ทดลองได้รับการชั่งน้ำหนักทุกวัน ถ้าน้ำหนักลดลงสัตว์ทดลองจะได้รับการป้อน saline-glucose 5% ตามน้ำหนักที่ลดลงในอัตราส่วน1 ml/1 กรัม โดยปริมาณ saline-glucose 5% ไม่เกิน 20 mL/วัน ¹⁸⁻¹⁹
Rats were paralyzed in both hind limbs and also had urinary and fecal incontinence	สัตว์ทดลองจะถูกนวดกระเพาะปัสสาวะเพื่อให้ปัสสาวะ 2 ครั้ง/วันจนกว่าสัตว์ทดลองจะสามารถปัสสาวะได้เองปริมาณ 2 ml ในตอนเช้า ^{18,21}

แผนภูมิแสดงขั้นตอนการผ่าตัดใน Spinal cord injury model Aneurysm clip in rat



3.5 การตรวจวัดระดับ total phenolic compounds โดยวิธี Folin-Ciocalteu method ดังนี้

การเตรียม Standard curve

ใช้ Gallic acid เป็นสารละลายมาตรฐาน ความเข้มข้นระหว่าง 0-10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและเติม Folin reagent 20 ไมโครลิตร จากนั้นเติม 20% sodium carbonate solution ผสมให้เข้ากันและตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 ชั่วโมง นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ 765 นาโนเมตร จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงไป plot กับความเข้มข้นของ Gallic acid และหาค่าความสัมพันธ์ของความเข้มข้น (r^2) จะต้องไม่ต่ำกว่า 0.99

การหา Total phenolic compound

ละลายแผ่นปิดผิวหนังเส้นใยโพลิเอสเตอร์ระดับนาโนให้มีความเข้มข้น 1 ตารางเซนติเมตร/มิลลิลิตร จากนั้นนำไปปั่นที่ 3000 rpm เติม Folin reagent 20 ไมโครลิตร จากนั้นเติม 20% sodium carbonate solution ผสมให้เข้ากันและตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 ชั่วโมง นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ 765 นาโนเมตร คำนวณหาค่าเฉลี่ย OD/มิลลิลิตร จากนั้นคำนวณหา total phenolic โดยเทียบกับ slope ของ standard curve และแสดงค่า total phenolic เป็น Gallic equivalent ในหน่วย mg of GAE /cm² ของแผ่นปิดผิวหนังเส้นใยโพลิเอสเตอร์ระดับนาโน ทำซ้ำสามครั้ง

3.6 การประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

3.6.1 Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)

เป็นการวัดความสามารถในการต้านออกซิเดชัน โดยใช้ reagent คือ DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) เป็น stable radical เมื่ออยู่ในรูปสารละลายใน absolute ethanol จะมีสีม่วง ซึ่งสามารถวิเคราะห์ปริมาณได้โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm และเมื่อ DPPH รับ electron หรือ hydrogen radical จะทำให้มีสีจางลง ดังนั้นถ้าสารที่นำมาทดสอบ ทำให้สีของ DPPH จางลง แสดงว่าสารนั้นมีฤทธิ์ antioxidant

เตรียมสารละลาย DPPH (2,2 – diphenyl – picryl hydrazine) ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ใน methanol โดยชั่ง DPPH 3.943 มิลลิกรัม และปรับปริมาตรให้ครบ 10 มิลลิลิตร ใน volumetric flask สีชา เก็บใน vial สีชา ป้องกันแสง

เตรียมแผ่นปิดผิวหนังเส้นใยโพลิเอสเตอร์ระดับนาโน ให้มีความเข้มข้น 1 ตารางเซนติเมตร/มิลลิลิตร เติมสารละลาย DPPH ในปริมาตร 200 ไมโครลิตร คงที่ทุกหลอด และใส่สารทดสอบ 2,800 ไมโครลิตร เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมในการฟอกจางสี (bleaching) สารละลาย DPPH ที่ใช้เพียงพอในการทำปฏิกิริยากับสารทดสอบที่ความเข้มข้นที่ใช้ ภายหลังเติมสารละลาย DPPH ลงในสารทดสอบทุกหลอดทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร เพื่อหาปริมาณ DPPH ที่เหลืออยู่เทียบกับหลอด control ที่มีเฉพาะ DPPH 200 ไมโครลิตร โดยไม่ได้ใส่สารทดสอบ และคำนวณหาค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถจับอนุมูลอิสระได้ 50% (IC₅₀) เปรียบเทียบกับค่า IC₅₀ ของสารมาตรฐานวิตามินซีด้วยวิธีทดสอบเดียวกัน

การคำนวณและแปลผลทำการหากราฟระหว่างค่าความเข้มข้น (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) กับค่า %inhibition

$$\%inhibition = ([OD_{Control} - OD_{sample}] / OD_{control}) \times 100$$

คำนวณค่า IC₅₀ คือความเข้มข้นของสารทดสอบที่สามารถจับอนุมูลอิสระ DPPH ได้ 50%

3.6.2 The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP)

เป็นการวัดความสามารถในการรีดิวซ์ของสารที่มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ โดยการรีดิวซ์ Ferric ion (Fe^{3+}) ซึ่งอยู่ในรูปของสารประกอบเชิงซ้อนของ Fe^{3+} - TPTZ (Ferric tripyridyl triazine) ให้เป็นสารประกอบเชิงซ้อน Fe^{2+} - TPTZ (Ferric tripyridyl triazine) ที่มีสีน้ำเงิน และสามารถตรวจสอบได้ที่ความยาวคลื่น 593 nm ภายใต้ภาวะที่มีความเป็นกรด-ด่างต่ำ (pH~ 3.6)

การเตรียม FRAP reagent เตรียม Acetate Buffer solution ที่ความเข้มข้น 300 mM, เตรียม Ferric chloride solution 20 mM เตรียม TPTZ (2,4,6- tri[2-pyridyl]-s-triazine) 10 mM นำสารละลายทั้งหมดมาผสมกันในอัตราส่วนดังต่อไปนี้ Acetate Buffer 200 ml: TPTZ solution 20 ml: $FeCl_3$ solution 20 ml

เตรียม Stock solution ของสารมาตรฐาน Ascorbic acid ที่ความเข้มข้น 1000 μ M แล้วทำการ dilute ให้อยู่ในช่วงความเข้มข้น 50- 1000 μ M นำสารมาตรฐานและสารสกัดข้าวโพดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 nm

ทำการ plot graph ระหว่างความสัมพันธ์ของค่าการดูดกลืนแสง กับความเข้มข้น ให้ได้สมการเส้นตรง $y = ax + b$ ของสารมาตรฐานทั้งหมด

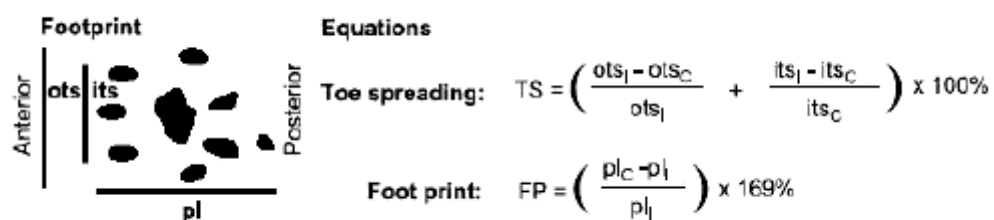
คำนวณหาค่า FRAP value โดยนำค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างมาแทนค่า y ในสมการเส้นตรงของสารมาตรฐาน รายงานผลเป็นค่า FRAP value ในหน่วย μ g ascorbic acid / cm^2

3.7 การประเมิน Reflex foot withdrawal

จะประเมินการชักอุ้งเท้าของสัตว์ทดลองหนีเมื่อกระตุ้นด้วยความร้อนผ่าน hot plate test หลังจากนำสัตว์ทดลองมาสร้างความคุ้นเคยกับเครื่องมือประมาณ 10 นาที จะกระตุ้นบริเวณอุ้งเท้าของสัตว์ทดลองด้วย hot plate อุณหภูมิประมาณ 50 องศา และจะบันทึกเวลาที่สัตว์ทดลองเริ่มเลียอุ้งเท้าหรือกระโดดออกจาก hot plate

3.8 การประเมินการฟื้นคืนสภาพการทำงานของเส้นประสาท sciatic nerve ผ่าน Deminacelli

ในการประเมิน motor function นั้นจะประเมินด้วยวิธี De Medinaceli Method โดยใช้ sciatic nerve function index เป็นดัชนีชี้วัด ดังแสดงในสมการด้านล่าง



รูปที่ 2-3 แสดงภาพรอยเท้าของสัตว์ทดลองและวิธีการคำนวณ sciatic nerve index

3.9. การประเมิน Basso, Beattie, Bresnahan (BBB)

นำหนูวางบนกล่องขนาดใส 80x80x30 cm³ ทำการจับภาพด้วยกล้องวิดีโอและทำการประเมินค่าคะแนนโดยผู้ที่ประเมินไม่ทราบว่ายี่ห้อสัตว์ทดลองอยู่กลุ่มใด แบ่งค่าคะแนนตาม Basso, Beattie, Bresnahan functional scale (de Barros Filho & Molina, 2008)

3.10 การประเมิน Gross motor score

นำหนูวางบนกล่องขนาดใส 80x80x30 cm³ ทำการจับภาพด้วยกล้องวิดีโอและทำการประเมินค่าคะแนนโดยผู้ที่ประเมินไม่ทราบว่ายี่ห้อสัตว์ทดลองอยู่กลุ่มใดแบ่งค่าคะแนนดังตาราง (Anand et al., 2011)

ตาราง ที่ 2-3 ค่าคะแนน Gross motor

For gross motor score	
Score	Behavior
0 points	No movement in hind limb, no weight bearing
2 points	Mild movement in hind limb, no weight bearing
4 points	Frequent and/ or vigorous movement of hind limb, no weight bearing
6 points	Hind limb can support weight partially and weak attempt in walk
8 points	Walking with only mild deficit
10 points	Normal walking (near normal)

3.11 การตรวจวัดปริมาณ malondialdehyde (MDA) และการทำงานของ scavenger enzymes

- ตรวจวัดปริมาณ malondialdehyde (MDA)²⁸

ตรวจวัดปริมาณ malondialdehyde (MDA) ซึ่งเป็นดัชนีแสดง lipid peroxidation ด้วย 2-thiobarbituric acid-reactive substances หรือ TBARS method โดยจะนำ sample ใส่หลอดแก้ว เติม 10% TCA (Trichloroacetic Acid) จำนวน 125 ไมโครลิตร, 8% SDS (Sodium dodecyl sulfate) 200 ไมโครลิตร, 5Mm EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid), โดยมี TEP (1, 1, 3, 3-tetramethoxy propane) ใช้เตรียม standard ผสมให้เข้ากันทิ้งไว้ 10 นาที เติม 0.6% TBA (thiobarbituric acid). นำไปต้มนาน ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 30 นาทีทิ้งไว้ให้เย็นนำไปปั่นปล่อยให้เย็นแล้วเติมน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตรความเร็ว 4,000xg นาน 10 นาที นำส่วนใสไปวัดที่ ความยาวแสง 532 นาโนเมตร

- ตรวจวัดการทำงานของเอนไซม์ catalase (CAT)²⁹

นำ sample มาทำปฏิกิริยากับ hydrogen peroxide 50 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ 1 นาที จากนั้นใส่กรดซัลฟูริก 25 ไมโครลิตรใส่ โพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนต 100 ไมโครลิตร ทำการวัด ที่ 515 นาโนเมตร

- ตรวจวัดการทำงานของเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD)³⁰

นำ sample มาทำปฏิกิริยากับ xanthine oxidase โดยจะนำ sample นำมาผสมกันดังนี้ 50

mM potassium phosphate, 0.1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 0.01 mM cytochrome C, 0.05 mM xanthine ใส่ใน plate 200 μ l ใส่ xanthine oxidase 20 ไมโครลิตร นำไปวัดที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร

- ตรวจวัดการทำงานของเอนไซม์ glutathione peroxidase³¹

นำ sample ใส่ใน plate จากนั้นใส่สารประกอบด้วย 48 mM sodium phosphate, 0.38 mM EDTA, 0.12 mM β -NADPH, 0.95 mM sodium azide, 3.2 units of glutathione reductase, 1 mM glutathione (GSH), 0.02 mM DL-dithiothreitol, 0.0007% H_2O_2 จำนวน 200 μ l นำไปวัดที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร

3.12 ตรวจ endothelial nitric oxide (eNOS)³²

ตัดชิ้นหลัง ใส่ lysis buffer 300 μ l นำไปปั่นที่ 10,000 g นาน 15 นาที จากนั้นนำส่วนใสมาใช้ในการทดสอบ eNOS ด้วย elisa methods โดยนำตัวอย่างทำปฏิกิริยากับ Biotin-antibody และ HRP-avidin พักไว้ 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 37°C. เติม TMB Substrate ทิ้งไว้ 15-30 นาที ที่ 37°C เติม Stop Solution นำไปวัดค่าที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ด้วย microplate readers from the readings at 450 nm.

3.13 การทำงานของเอนไซม์ Cyclooxygenase-2 (COX-2)

นำชิ้นหลังมาทดสอบหา COX-2 โดยดัดแปลงวิธีของ Smith et al (1998) โดยการทำปฏิกิริยาของ 0.1 M Tris-HCl buffer pH 8.0, Heme, COX-2, Arachidonic acid, 0.1 M Potassium hydroxide, TMPD เทียบกับ Idomethacin (20, 40, 60, 80 และ 100 μ M) แสดงค่าเป็น nmol/min/ml

3.14 การทำงานของเอนไซม์ GABA Transaminase (GABA-T)

นำชิ้นหลังมาบดใน buffer ที่ประกอบด้วย Triton X-100, 0.5%; dithiothreitol 5 mM; pyridoxal phosphate 1 mM and sodium phosphate buffer 10 mM, pH 7.0 จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง 2000 g เวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส แล้วใช้เฉพาะส่วน supernatant มาทำปฏิกิริยากับ GABA-T buffer ประกอบด้วย GABA (20 mM), α -ketoglutarate (10 mM) จากนั้นเติม NAD (0.5 mM ใน sodium phosphate buffer 0.05 M, pH 8.0) วัดการดูดกลืนแสงที่ 310 นาโนเมตร

3.15 การทำงานของเอนไซม์ Nerve growth factor (NGF)

วัดด้วย elisa kit จาก sigma Singapore

3.16 สถิติวิเคราะห์

จะเปรียบเทียบผลของแผ่นปิดผิวหนังเส้นใยโพลิเมอร์ระดับนาโนและกลุ่มควบคุมใช้ ANOVA การเปลี่ยนแปลงที่ถือว่ามีความสำคัญทางสถิติคือตั้งแต่ p-value < 0.05

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การเตรียมสารสกัดข้าวโพดม่วง

เนื่องจากผลการศึกษาเบื้องต้นพบว่าสารสกัดซึ่งข้าวโพดม่วงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงน่าจะเป็นประโยชน์ในการลดปัญหา secondary injury ของภาวะไขสันหลังบาดเจ็บได้ดี ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงนำสารสกัดซึ่งข้าวโพดม่วงมาพัฒนาขึ้นรูปเป็นแผ่นปิดผิวหนังเส้นใยโพลิเมอร์ระดับนาโนผสมสารสกัดซึ่งข้าวโพดม่วง โดยนำซึ่งข้าวโพดม่วงมาสกัดด้วย 50% และ 95% แอลกอฮอล์ด้วยวิธี maceration ซึ่งจะแช่ซึ่งข้าวโพดม่วงในตัวทำละลายคือแอลกอฮอล์ 50% และ 95% เป็นเวลา 72 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการกรองด้วยกระดาษเบอร์ 1 แล้วทำให้แห้ง พบว่าสารสกัดที่ได้มี %yield 2.45 และ 2.55 ตามลำดับ จากนั้นทำการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ FRAP

ตารางที่ 2-4 แสดงค่า total phenolic compound, การยับยั้ง 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) และ ค่า The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) ของสารสกัดซึ่งข้าวโพดม่วง ในตัวทำละลายคือแอลกอฮอล์ 50% และ 95%

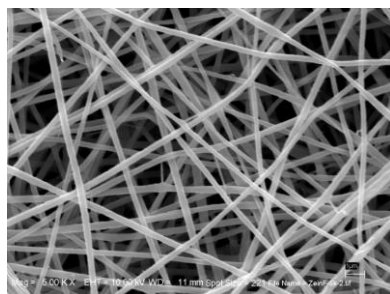
Parameter	สารสกัด 50% แอลกอฮอล์ ซึ่งข้าวโพดม่วง	สารสกัด 95% แอลกอฮอล์ ซึ่งข้าวโพดม่วง
Total phenolic compound (mg of GAE /100 g of extract)	997.5 $\pm$ 41.75	811.43 $\pm$ 21.99
DPPH (IC50 (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	28.52 $\pm$ 0.22	1433.06 $\pm$ 1.38
FRAP (IC50 (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	21.24 $\pm$ 0.43	3.11 $\pm$ 0.07

4.2 การเตรียมแผ่นปิดผิวหนังเส้นใยโพลิเมอร์ระดับนาโน polymer based nanofiber transdermal patch

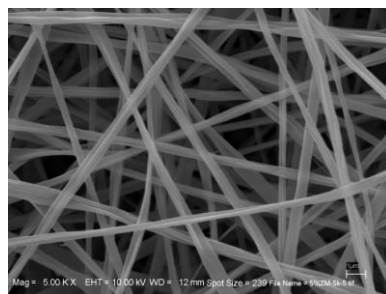
หลังจากนั้นนำสารสกัดแอลกอฮอล์ 50% ของซึ่งข้าวโพดสีม่วงมาเตรียมเป็นแผ่นปิดผิวหนังเส้นใยโพลิเมอร์ระดับนาโนผสมสารสกัดซึ่งข้าวโพดม่วงสำหรับปิดผิวหนังด้วยเทคนิคอิเล็กโตรสปินนิง (electrospinning) โดยนำสารละลายที่เตรียมได้ มาฉีดผ่านปลายเข็มโลหะเบอร์ 22 ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.7 มิลลิเมตร และต่อกับแหล่งกำเนิดไฟฟ้าที่จ่ายความต่างศักย์ 21 กิโลโวลต์ ระยะห่างระหว่างปลายเข็มกับแผ่นรองรับซึ่งต่อกับสายดินของแหล่งกำเนิดไฟฟ้าคือ 15 เซนติเมตร โดยจะปรับเปลี่ยนปัจจัยต่างที่มีผลต่อการขึ้นรูปของเส้นใยนาโนดังแสดงในตารางที่ 2-5

ตารางที่ 2-5 แสดงสภาวะของปัจจัยต่างๆที่ใช้ในการเตรียมของแผ่นปิดผิวหนังเส้นใยโพลิเมอร์ระดับนาโน

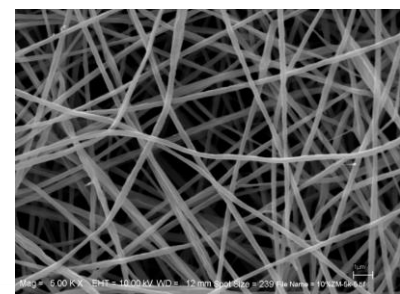
Electrospun	Zein	สารสกัดข้าวโพด สีม่วง 5%	สารสกัดข้าวโพด สีม่วง 10%
Total of mix solution for injection	5ml	5ml	5ml
Zein base (g)	1.35	1.2825	1.215
Additive substance(<i>Zeamays</i>) (mg)	0	0. 0675	0.135
Solvent 70Eth (ml)	5	5	5
Initial Flow rate (ml/hr)	0.1	0.05	0.05
Electric potential (KV)	20	20	20
Distance from nozzle to collector (cm)	15	15	15
Collector angle (°)	85	85	85
Preparation time of solution (hr)	8hr	8hr	8hr
Spinning time of solution (hr)	6hr	6hr	6hr
Temperature (°c)	22-28°C	22-28°C	22-28°C
%Humidity	50-60%	50-60%	50-60%



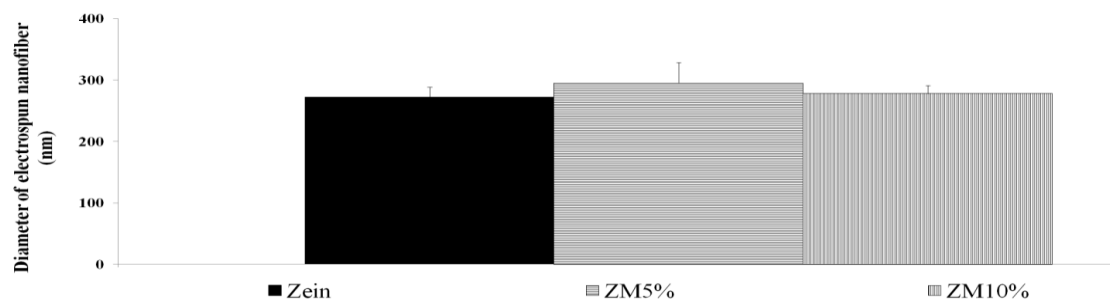
Zein



สารสกัดข้าวโพดสีม่วง 5%



สารสกัดข้าวโพดสีม่วง 10%



รูปที่ 2-4 ภาพแสดงขนาดของ zein based nanofiber, 5% quercetin loaded zein based nanofiber และ 10% quercetin loaded zein based nanofiber

4.3 ประเมินคุณสมบัติของแผ่นปิดผิวหนังเส้นใยโพลิเมอร์ระดับนาโน (polymer based nanofiber transdermal patch)

นำแผ่นปิดผิวหนังเส้นใยโพลิเมอร์ระดับนาโนผสมสารสกัดข้าวโพดม่วง 5% และ 10% มาวัดปริมาณ total phenolic compound และ total anthocyanin ผลการทดสอบพบว่าแผ่นปิดผิวหนังเส้นใยโพลิเมอร์ระดับนาโนผสมสารสกัดข้าวโพดม่วง 5% มีปริมาณ total phenolic compound 181.05 ± 3.12 mg of GAE /cm² มีปริมาณ total anthocyanin 215.74 ± 3.25 mg/l /cm² แผ่นปิดผิวหนังเส้นใยโพลิเมอร์ระดับนาโนผสมสารสกัดข้าวโพดม่วง 10% มีปริมาณ total phenolic compound 193.27 ± 12.08 mg of GAE /cm² มีปริมาณ total anthocyanin 236.32 ± 2.06 mg/l /cm² ดังแสดงในตารางที่ 2-6

ตารางที่ 2-6 แสดงค่าระดับ total phenolic compound และ anthocyanin ของแผ่นปิดผิวหนังเส้นใยโพลิเมอร์ระดับนาโนผสมสารสกัดข้าวโพดม่วงค่าที่แสดงเป็น mean $\pm$ SEM *p-value<0.05 เปรียบเทียบกับกลุ่ม SCI + 5%PPCE nanofiber patch

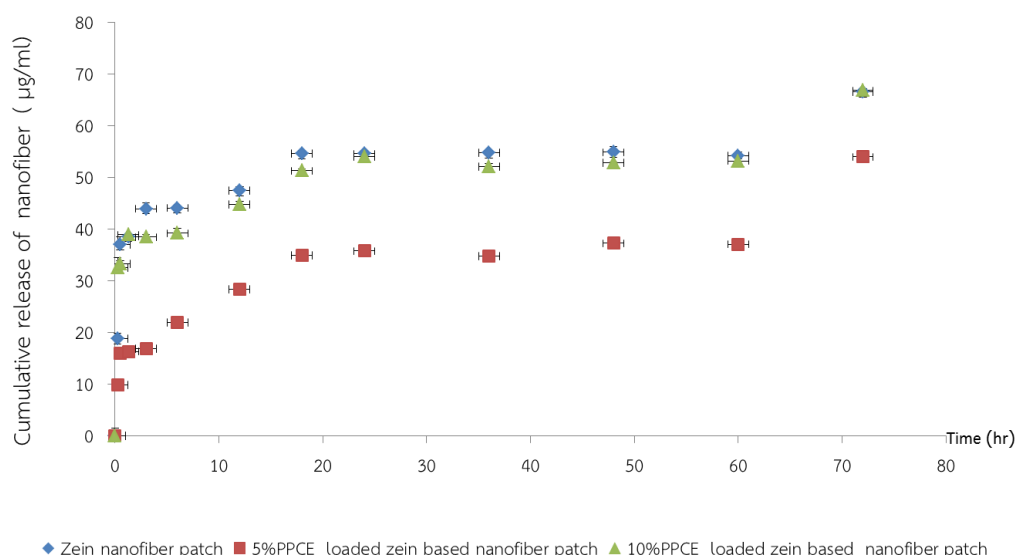
Parameter	SCI + 5%PPCE polymer based nanofiber transdermal patch	SCI + 10%PPCE polymer based nanofiber transdermal patch
Total phenolic compound (mg of GAE /cm ²)	181.05 ± 3.12	193.27 ± 12.08
Total anthocyanin (mg/l /cm ²)	215.74 ± 3.25	$236.32 \pm 2.06^*$

เมื่อนำแผ่นปิดผิวหนังเส้นใยโพลิเมอร์ระดับนาโนผสมสารสกัดข้าวโพดม่วง 5% และ 10% มาวัดการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ปริมาณ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) และ Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) ผลการทดสอบพบว่าแผ่นปิดผิวหนังเส้นใยโพลิเมอร์ระดับนาโนผสมสารสกัดข้าวโพดม่วง 5% มีปริมาณค่ายับยั้ง DPPH 54.55 ± 0.75 % มีปริมาณค่า FRAP activity 71.33 ± 9.15 ug ascorbic acid /cm² แผ่นปิดผิวหนังเส้นใยโพลิเมอร์ระดับนาโนผสมสารสกัดข้าวโพดม่วง 10% มีปริมาณค่ายับยั้ง DPPH 57.58 ± 1.09 % มีปริมาณค่า FRAP activity 129.67 ± 2.44 ug ascorbic acid /cm² ดังแสดงในตารางที่ 2-7

ตารางที่ 2-7 แสดงค่าการยับยั้ง 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) และ ค่า Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) ของแผ่นปิดผิวหนังเส้นใยโพลิเมอร์ระดับนาโนผสมสารสกัดชั่งข้าวโพดม่วง**p-value<0.01 เปรียบเทียบกับกลุ่ม SCI + 5%PPCE nanofiber patch

Parameter	SCI+5%PPCE polymer based nanofiber transdermal patch	SCI+10%PPCE polymer based nanofiber transdermal patch
DPPH (%inhibition)	54.55±0.75	57.58±1.09**
FRAP (ug ascorbic acid /cm ²)	71.33±9.15	129.67±2.44**

รูปที่ 2-5 กราฟแสดงการการปลดปล่อยของแผ่นปิดผิวหนังเส้นใยโพลิเมอร์ระดับนาโนผสมสารสกัดแอลกอฮอล์ 50%ชั่งข้าวโพดม่วง



เพื่อประเมินค่าคงตัวของแผ่นปิดผิวหนังเส้นใยโพลิเมอร์ระดับนาโนผสมสารสกัดชั่งข้าวโพดม่วง 5% และ 10% โดยวัดค่า total phenolic compound ของแผ่นปิดผิวหนังเส้นใยโพลิเมอร์ระดับนาโนผสมสารสกัดชั่งข้าวโพดม่วงที่เวลา 0, 1, 3, 6 เดือน แผ่นปิดผิวหนังเส้นใยโพลิเมอร์ระดับนาโนผสมสารสกัดชั่งข้าวโพดม่วงที่พัฒนาขึ้นมาสามารถปลดปล่อยสารเคอร์ซีตินได้อย่างช้าๆและดำรงอยู่เป็นเวลานาน และมีสภาวะคงตัวที่อุณหภูมิ 37 องศา ความชื้น 65% เป็นเวลาไม่น้อยกว่า 3 เดือน ดังแสดงในตารางที่ 2-8

ตารางที่ 2-8 แสดงค่าระดับ total phenolic compound ของแผ่นปิดผิวหนังเส้นใยโพลิเมอร์ระดับนาโนผสมสารสกัดขี้ข้าวโพดม่วงที่เวลา 0, 1, 3, 6 เดือนเก็บที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความชื้น 65%

Total phenolic compound (mg of GAE /100 g of extract)	SCI + 5%PPCE polymer based nanofiber transdermal patch	SCI + 10%PPCE polymer based nanofiber transdermal patch
เวลาเริ่มต้น	181.05±3.12	193.27±12.08
1 เดือน	143.66±0.95	159.85±0.38
3 เดือน	136.15±5.16	159.71±0.81
6 เดือน	68.59±0.56	76.83±1.53

เมื่อทำการคำนวณค่าของแผ่นปิดผิวหนังเส้นใยโพลิเมอร์ระดับนาโนผสมสารสกัดขี้ข้าวโพดม่วง 5% และ 10% โดยวัดค่า total phenolic compound ของแผ่นปิดผิวหนังเส้นใยโพลิเมอร์ระดับนาโนผสมสารสกัดขี้ข้าวโพดม่วงที่อัตราเร่งโดยผ่านอุณหภูมิที่ 40 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมงและอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง จำนวน 3 รอบ พบว่าแผ่นปิดผิวหนังเส้นใยโพลิเมอร์ระดับนาโนผสมสารสกัดขี้ข้าวโพดม่วง 5% มี total phenolic compound ลดลงร้อยละ 33.39 และแผ่นปิดผิวหนังเส้นใยโพลิเมอร์ระดับนาโนผสมสารสกัดขี้ข้าวโพดม่วง 10% มี total phenolic compound ลดลงร้อยละ 41.37

ตารางที่ 2-9 แสดงค่าระดับ total phenolic compound ของแผ่นปิดผิวหนังเส้นใยโพลิเมอร์ระดับนาโนผสมสารสกัดขี้ข้าวโพดม่วงที่อัตราเร่งโดยผ่านอุณหภูมิที่ 45 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมงและอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง จำนวน 3 รอบ

Total phenolic compound (mg of GAE /100 g of extract)	SCI + 5%PPCE polymer based nanofiber transdermal patch	SCI + 10%PPCE polymer based nanofiber transdermal patch
เวลาเริ่มต้น	181.05±3.12	193.27±12.08
ผ่านอัตราเร่ง	60.45±0.95	79.85±0.49

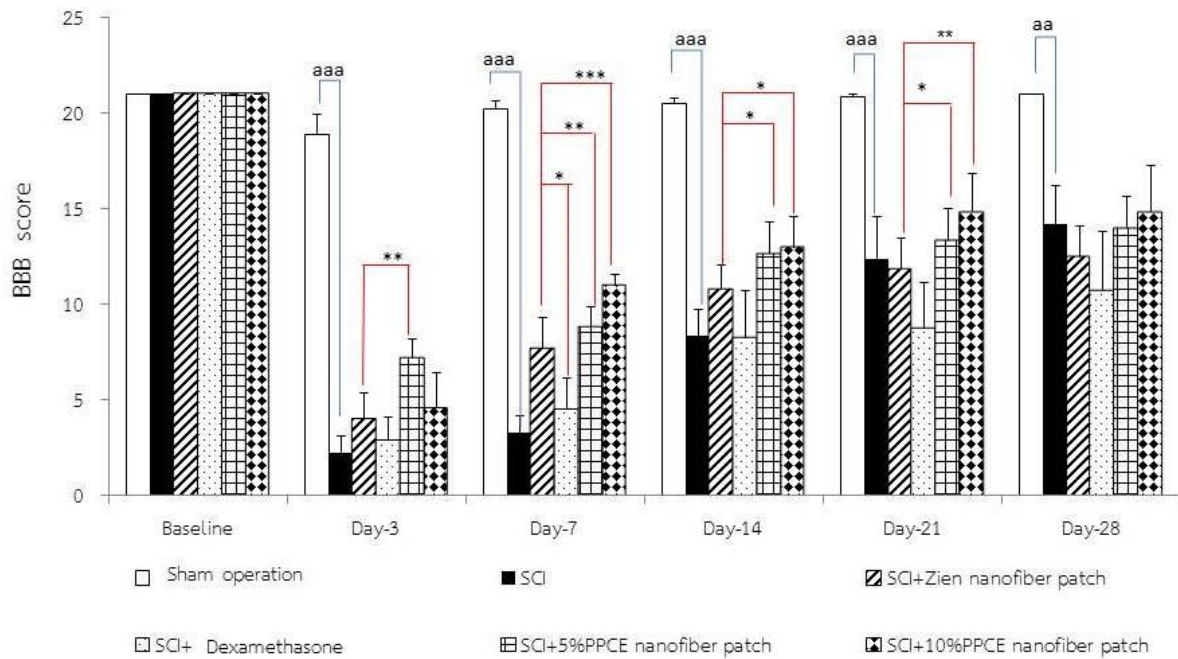
4.4 ประเมินทดสอบฤทธิ์ของแผ่นปิดผิวหนังเส้นใยโพลิเมอร์ระดับนาโนผสมสารสกัดขี้ข้าวโพดม่วงต่อการฟื้นคืนสภาพจากภาวะบาดเจ็บของไขสันหลัง

จากผลการทดลองวัดค่าพื้นฐานของสัตว์ทดลองก่อนเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะบาดเจ็บของไขสันหลัง พบว่าค่ารับรู้ความรู้สึกทดสอบด้วย foot withdrawal reflex และการประเมินการฟื้นคืนสภาพของการบาดเจ็บโดยประเมินการเดินด้วย De Medinacelli method นั้นไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติดังแสดงในตารางที่ 2-10

ตารางที่ 2-10 แสดงค่า baseline การรับรู้อุณหภูมิโดยเฉพาะความร้อนที่ประเมินโดย foot withdrawal reflex time และ การประเมินการฟื้นคืนสภาพของการบาดเจ็บโดยประเมินการเดินด้วย De Medinacelli method ค่าที่แสดงเป็น mean+SEM

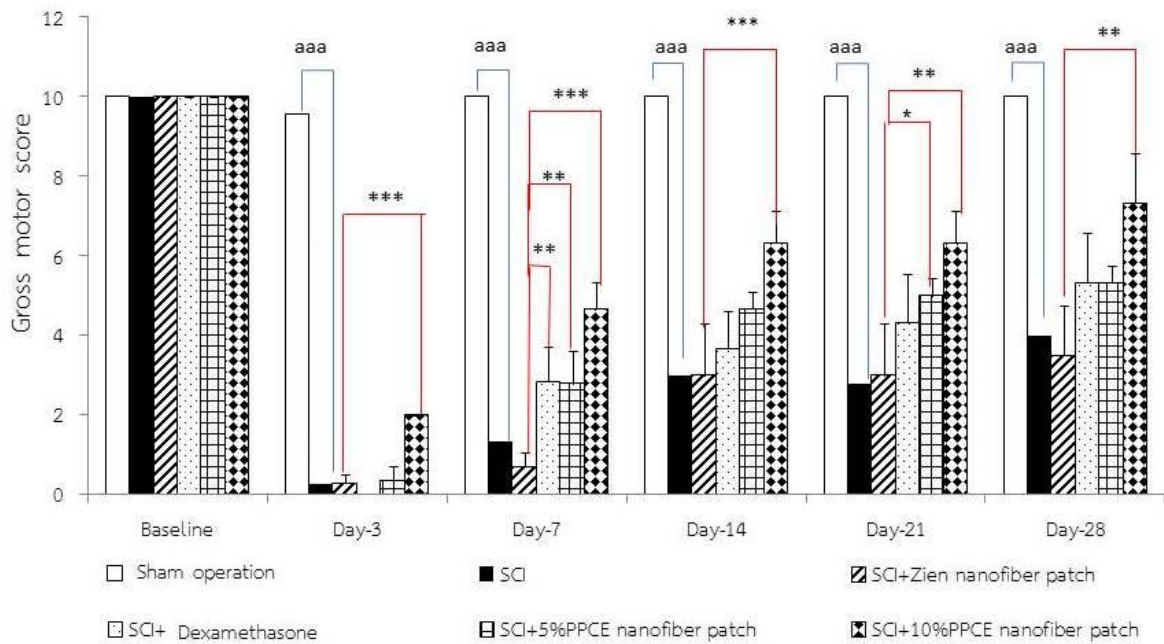
กลุ่ม	foot withdrawal reflex time	De Medinacelli method (SFI)
Sham operation	2.87±0.28	-9.53±0.30
SCI	2.33±0.10	-5.52±3.37
Positive control + SCI	2.97±0.26	2.20±4.3
SCI + Zein polymer based nanofiber transdermal patch	2.40±0.09	-5.55±4.01
SCI + 5%PPCE polymer based nanofiber transdermal patch	2.17±0.06	-6.35±3.2
SCI + 10%PPCE polymer based nanofiber transdermal patch	2.17±0.04	-5.53±2.4

หลังจากเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะบาดเจ็บของไขสันหลังและทำการประเมินการฟื้นคืนสภาพของการบาดเจ็บไขสันหลังโดยใช้ Basso, Beattie Bresnahan (BBB) ผลการทดลองพบว่าหนูกลุ่มที่ได้รับการเหนี่ยวนำภาวะบาดเจ็บของไขสันหลังและได้รับการดูแลการบาดเจ็บของไขสันหลังด้วยแผ่นปิดผิวหนังเส้นใยโพลิเมอร์ระดับนาโนที่มีส่วนผสม zein อย่างเดียวมีค่า BBB score ลดลงอย่างมีนัยสำคัญตลอดการทดลอง (p-value< 0.001 ทั้งหมดเปรียบเทียบกับกลุ่ม sham operation) หนูกลุ่มที่ได้รับการป้อนยา Dexamatazone มีการฟื้นคืนสภาพของการบาดเจ็บไขสันหลังอย่างมีนัยสำคัญวันที่ 3 และ 7 (p-value< 0.01 และ 0.05 ตามลำดับเปรียบเทียบกับกลุ่ม SCI+Zein nanofiber patch) หนูกลุ่มที่รับการดูแลการบาดเจ็บของไขสันหลังด้วยแผ่นปิดผิวหนังเส้นใยโพลิเมอร์ระดับนาโนผสมสารสกัดชั่งข้าวโพดม่วง 5% และ 10% มีการฟื้นคืนสภาพของการบาดเจ็บไขสันหลังอย่างมีนัยสำคัญวันที่ 3, 7, 14 และ 21 (p-value< 0.001; 0.001; 0.05 และ 0.05 ตามลำดับเปรียบเทียบกับกลุ่ม SCI+ Zein nanofiber patch)

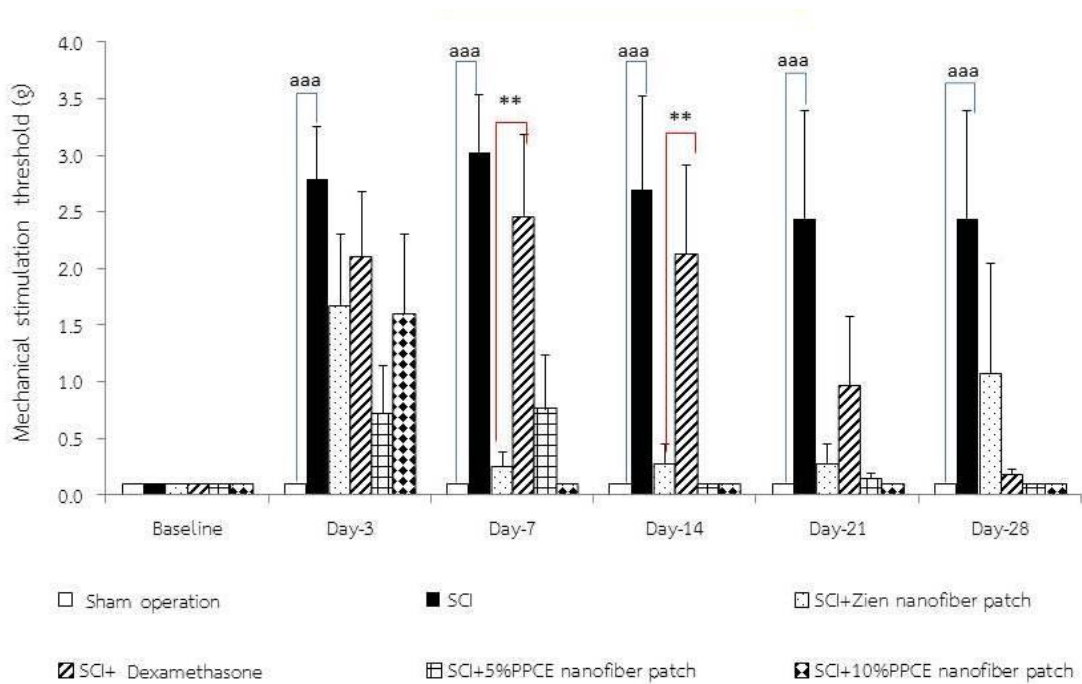


รูปที่ 2-6 แสดงฤทธิ์แผ่นปิดผิวหนังเส้นใยโพลิเมอร์ระดับนาโนผสมสารสกัดซังข้าวโพดม่วงต่อ BBB score ในหนูที่เหนี่ยวนำให้เกิดภาวะ spinal cord injury ค่าที่แสดงเป็น mean±SEM
 ,*p-value<0.01 และ 0.001ตามลำดับเปรียบเทียบกับกลุ่ม SCI+ Zein nanofiber patch
 aa,aaa p-value<0.01 และ 0.001ตามลำดับเปรียบเทียบกับกลุ่ม sham operation

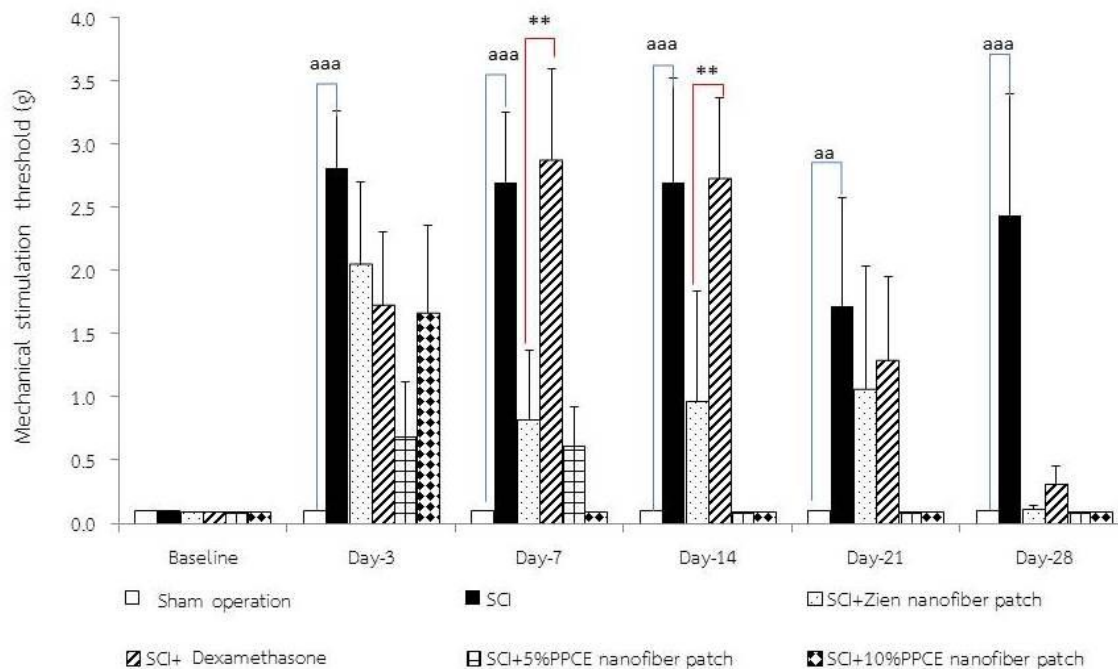
ทำการประเมินการฟื้นคืนสภาพของการบาดเจ็บไขสันหลังโดยใช้ gross motor score ผลการทดลองพบว่าหนูกลุ่มที่ได้รับการเหนี่ยวนำภาวะบาดเจ็บของไขสันหลังและได้รับการปิดแผ่นปิดผิวหนังเส้นใยโพลิเมอร์ระดับนาโนที่มีส่วนผสม zein อย่างเดียวมีการค่า gross motor score ลดลงอย่างมีนัยสำคัญตลอดการทดลอง (p-value< 0.001 ทั้งหมดเปรียบเทียบกับกลุ่ม sham operation) หนูกลุ่มที่ได้รับการป้อนยา dexamethasone มีการฟื้นคืนสภาพของการบาดเจ็บไขสันหลังอย่างมีนัยสำคัญวันที่ 7 (p-value< 0.01 เปรียบเทียบกับกลุ่ม SCI+ Zein nanofiber patch) หนูกลุ่มที่รับการปิดแผ่นปิดผิวหนังเส้นใยโพลิเมอร์ระดับนาโนผสมสารสกัดข้าวโพดม่วง 5% มีการฟื้นคืนสภาพของการบาดเจ็บไขสันหลังอย่างมีนัยสำคัญวันที่ 7 และ 21 (p-value< 0.01 และ 0.05 ตามลำดับเปรียบเทียบกับกลุ่ม SCI+ Zein nanofiber patch) หนูกลุ่มที่รับการปิดแผ่นปิดผิวหนังเส้นใยโพลิเมอร์ระดับนาโนผสมสารสกัดข้าวโพดม่วง 10% มีการฟื้นคืนสภาพของการบาดเจ็บไขสันหลังอย่างมีนัยสำคัญวันที่ 3, 7, 14, 21 และ 28 (p-value< 0.001; 0.001; 0.001; 0.01 และ 0.05 ตามลำดับเปรียบเทียบกับกลุ่ม SCI+ Zein nanofiber patch) ดังแสดงในรูปที่ 2-7



รูปที่ 2-7 แสดงฤทธิ์แผ่นปิดผิวหนังเส้นใยโพลิเมอร์ระดับนาโนผสมสารสกัดข้าวโพดม่วงต่อ gross motor score ในหนูที่เหนี่ยวนำให้เกิดภาวะ spinal cord injury ค่าที่แสดงเป็น mean±SEM
 ,*p-value<0.01 และ 0.01ตามลำดับเปรียบเทียบกับกลุ่ม SCI+ Zein nanofiber patch
 aa,aaa p-value<0.01 และ 0.001เมื่อเทียบกับกลุ่ม sham operation



A.



B.

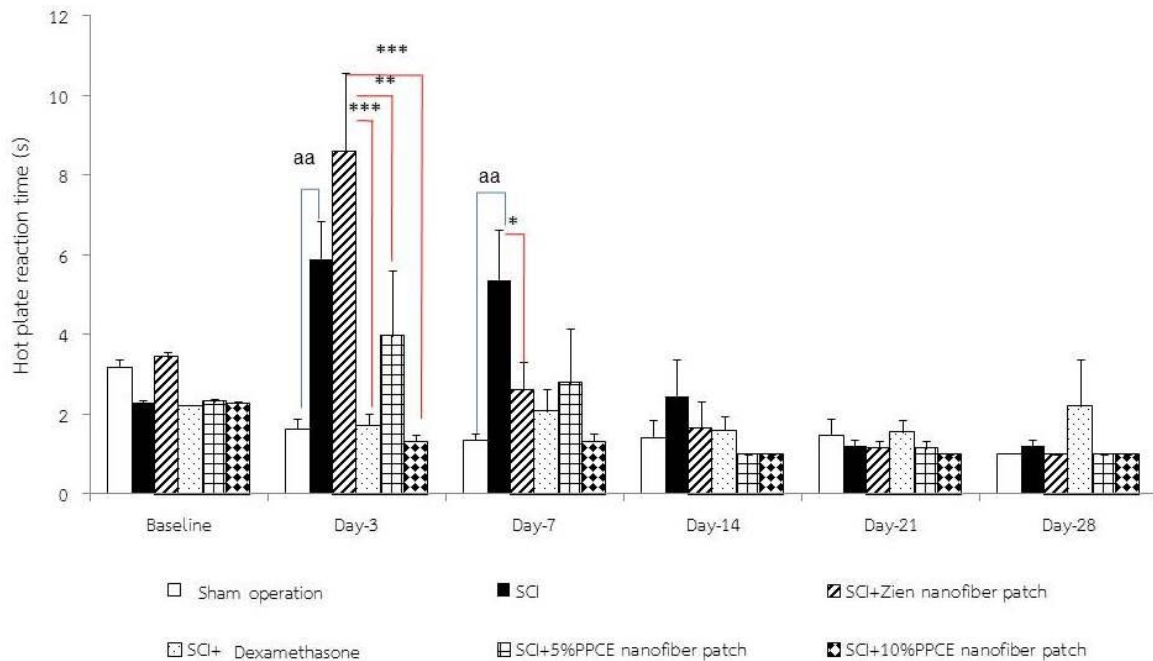
รูปที่ 2-8 แสดงฤทธิ์แผ่นปิดผิวหนังเส้นใยโพลิเมอร์ระดับนาโนผสมสารสกัดชั่งข้าวโพดม่วงต่อ

mechanical stimulation threshold (A) เท้าด้านซ้าย (B) เท้าด้านขวา ในหนูที่เหนี่ยวนำให้เกิดภาวะ spinal cord injury ค่าที่แสดงเป็น mean±SEM

**p-value<0.01 เปรียบเทียบกับกลุ่ม SCI+ Zein nanofiber patch

aa,aaa p-value<0.01 และ 0.001เมื่อเทียบกับกลุ่ม sham operation

เมื่อทำการประเมินการรับรู้ความรู้สึกโดยวัด hot plate test ผลการทดลองพบว่าหนูกลุ่มที่ได้รับการเหนี่ยวนำภาวะบาดเจ็บของไขสันหลังและได้รับการปิดแผ่นปิดผิวหนังเส้นใยโพลิเมอร์ระดับนาโนที่มีส่วนผสม zein อย่างเดียวมีการรับรู้ความรู้สึกช้าลงโดยมีค่า reaction time เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในวันที่ 3 (p-value< 0.001 เปรียบเทียบกับกลุ่ม sham operation) หนูกลุ่มที่ได้รับการป้อนยา dexamethasone ได้รับการปิดแผ่นปิดผิวหนังเส้นใยโพลิเมอร์ระดับนาโนผสมสารสกัดข้าวโพดม่วง 5% และ 10% มีการรับรู้ความรู้สึกเร็วขึ้นโดยมีค่า reaction time ลดลงอย่างมีนัยสำคัญในวันที่ 3 (p-value< 0.001; 0.01 และ 0.001เปรียบเทียบกับกลุ่ม SCI+ Zein nanofiber patch)

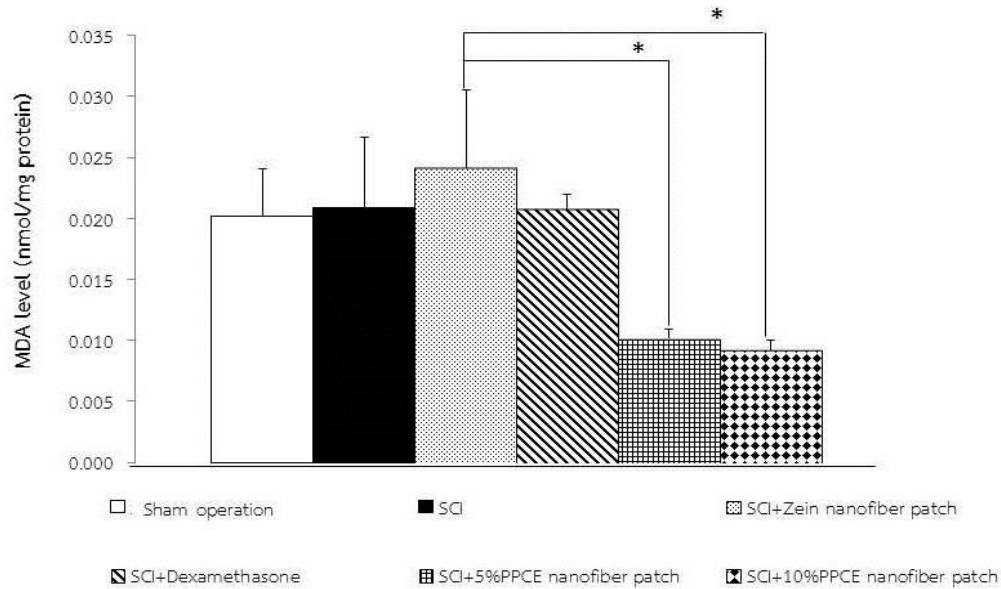


รูปที่ 2-9 แสดงฤทธิ์แผ่นปิดผิวหนังเส้นใยโพลิเมอร์ระดับนาโนผสมสารสกัดข้าวโพดม่วงต่อ withdrawal threshold ในหนูที่เหนี่ยวนำให้เกิดภาวะ spinal cord injury ค่าที่แสดงเป็น mean±SEM

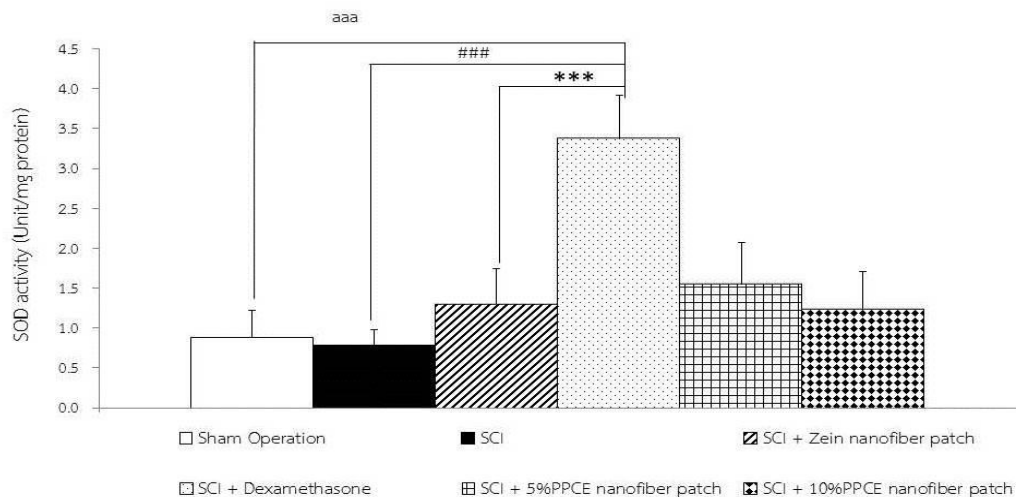
***, p-value<0.01 และ 0.001เปรียบเทียบกับกลุ่ม SCI+ Zein nanofiber patch

aaa p-value< 0.001เมื่อเทียบกับกลุ่ม sham operation

เมื่อสิ้นสุดการทดลองได้ทำการศึกษาฤทธิ์แผ่นปิดผิวหนังเส้นใยโพลิเมอร์ระดับนาโนผสมสารสกัดข้าวโพดม่วง ต่อการทำงานของเอนไซม์ oxidative damage markers ได้แก่ superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GSH-Px) และ ระดับ malondialdehyde (MDA) ในไขสันหลัง ผลการทดลองพบว่า หนูที่ได้รับแผ่นปิดผิวหนังเส้นใยโพลิเมอร์ระดับนาโนผสมสารสกัดข้าวโพดม่วง 5 และ 10% ลดระดับของ MDA (p-value<0.05 ทั้งหมดเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ SCI+Zein polymer based nanofiber transdermal patch) และพบว่าแผ่นปิดผิวหนังเส้นใยโพลิเมอร์ระดับนาโนผสมสารสกัดข้าวโพดม่วง 10% เพิ่มการทำงานของ CAT (p-value<0.05 เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ SCI+Zein polymer based nanofiber transdermal patch) แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงการทำงานของ SOD และ GSH-Px.

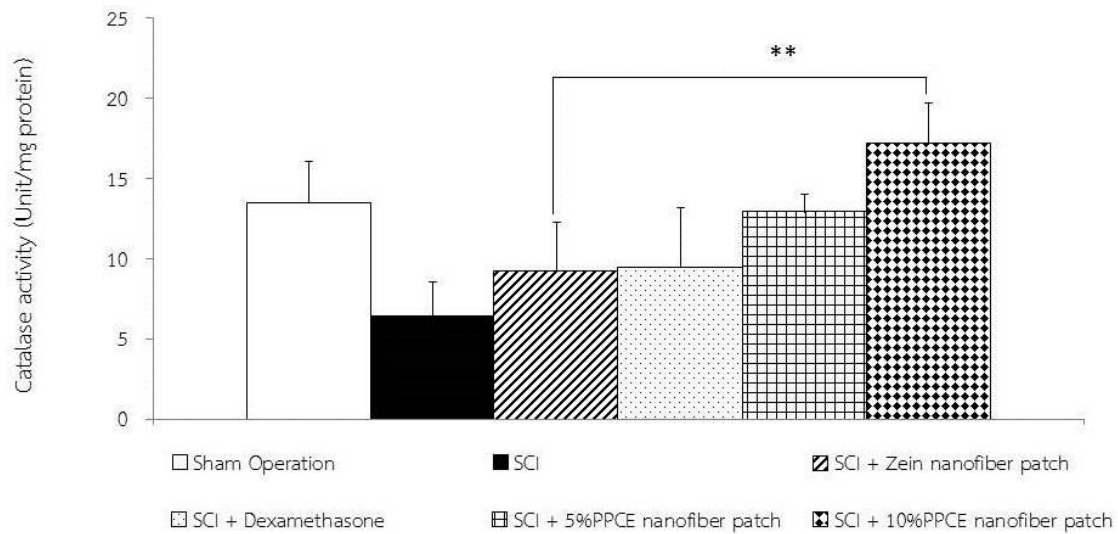


รูปที่ 2-10 แสดงฤทธิ์แผ่นปิดผิวหนังเส้นใยโพลิเมอร์ระดับนาโนผสมสารสกัดชั่งข้าวโพดม่วงต่อการทำงานของ malondialdehyde (MDA) ในไขสันหลังของหนูที่เหนี่ยวนำให้เกิดภาวะ spinal cord injury ค่าที่แสดงเป็น mean±SEM *p-value<0.05 เปรียบเทียบกับกลุ่ม SCI+Zein nanofiber patch

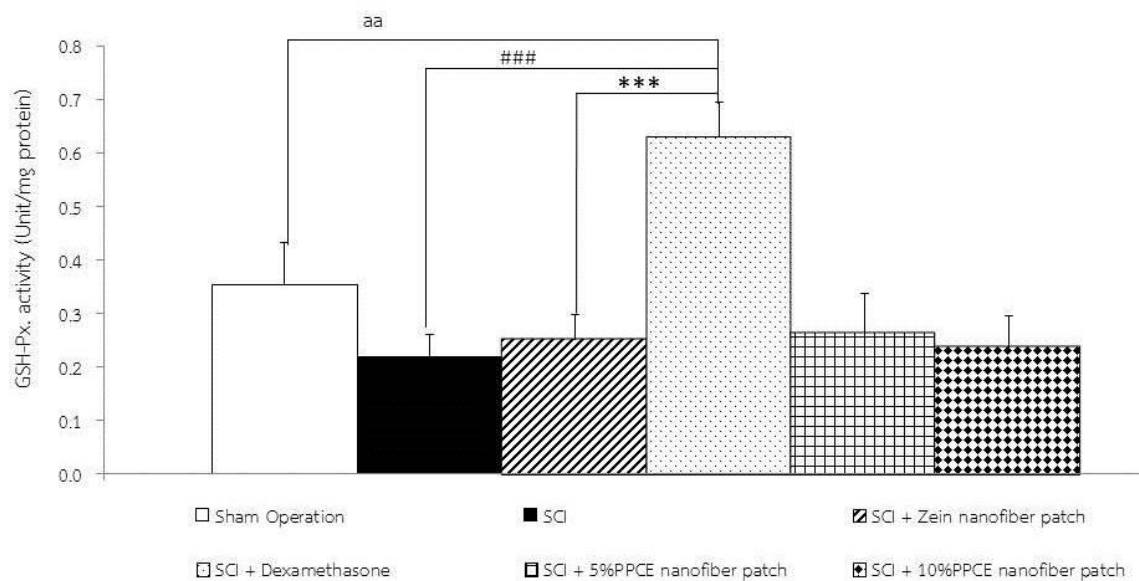


รูปที่ 2-11 ฤทธิ์แผ่นปิดผิวหนังเส้นใยโพลิเมอร์ระดับนาโนผสมสารสกัดชั่งข้าวโพดม่วงต่อการทำงานของ เอนไซม์superoxide dismutase (SOD) ในไขสันหลังของหนูที่เหนี่ยวนำให้เกิดภาวะ spinal cord injury ค่าที่แสดงเป็น mean±SEM

***p-value<0.001 เปรียบเทียบกับกลุ่ม SCI+ Zein nanofiber patch; ###p-value< 0.001 เมื่อเทียบกับกลุ่ม SCI; ^{aaa}p-value< 0.001 เมื่อเทียบกับกลุ่ม sham operation

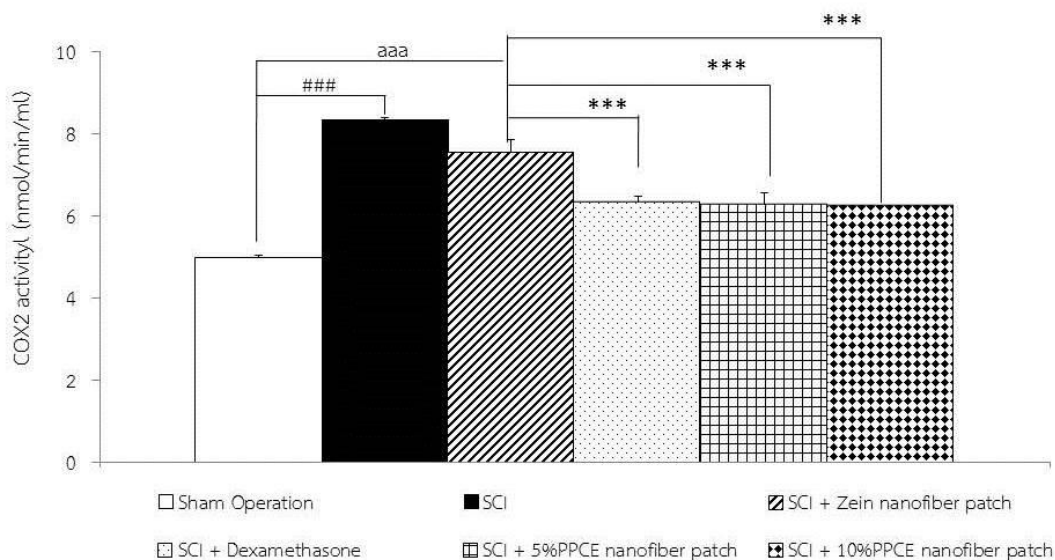


รูปที่ 2-12 ภาพที่แสดงระดับของเอนไซม์ catalase (CAT) ในไขสันหลังของหนูที่เหนี่ยวนำให้เกิดภาวะ spinal cord injury ค่าที่แสดงเป็น mean $\pm$ SEM **p-value<0.01 เปรียบเทียบกับกลุ่ม SCI+Zein nanofiber patch

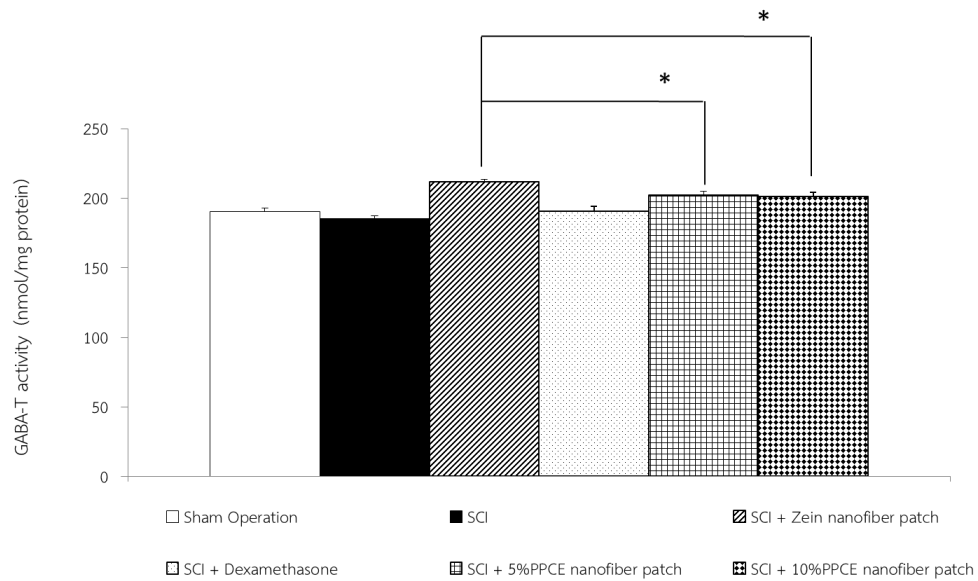


รูปที่ 2-13 ภาพที่แสดงระดับของเอนไซม์ glutathione peroxidase (GSH-Px) ในไขสันหลังของหนูที่เหนี่ยวนำให้เกิดภาวะ spinal cord injury ***p-value<0.001 เปรียบเทียบกับกลุ่ม SCI+ Zein nanofiber patch; ###p-value< 0.001 เมื่อเทียบกับกลุ่ม SCI; aa p-value< 0.01 เมื่อเทียบกับกลุ่ม sham operation

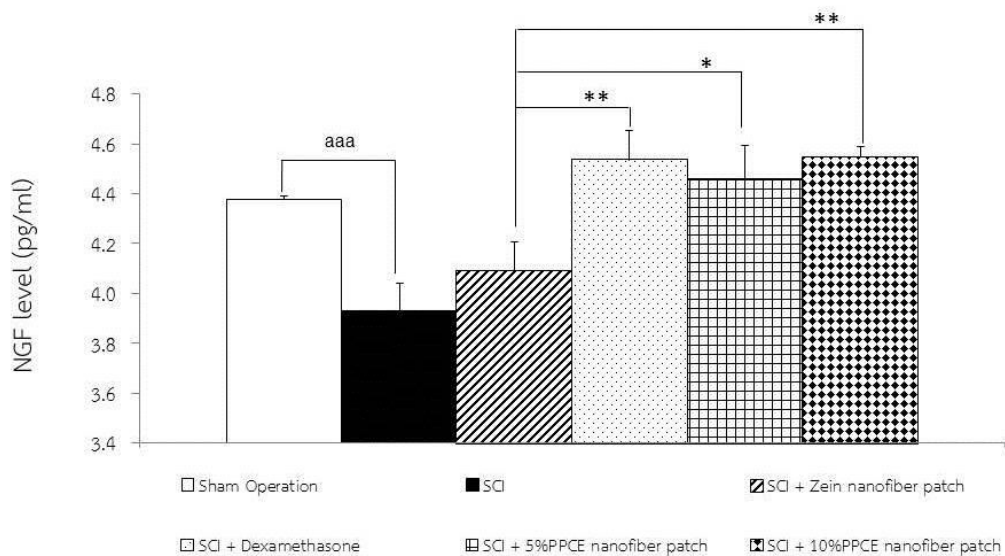
ทำการศึกษาฤทธิ์แผ่นปิดผิวหนังเส้นใยโพลิเมอร์ระดับนาโนผสมสารสกัดขี้ข้าวโพดม่วงต่อการทำงานของเอนไซม์ Cyclooxygenase-2 (COX-2) และ GABA Transaminase (GABA-T) พบว่าหนูที่ได้รับการเหนี่ยวนำให้เกิดการบาดเจ็บของไขสันหลัง เพิ่มการทำงานของ COX-2 และ GABA-T อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p -value <0.001 ทั้งหมดเปรียบเทียบกับกลุ่ม sham operation) กลุ่มที่ได้รับการป้อนยา dexamethasone และแผ่นปิดผิวหนังเส้นใยโพลิเมอร์ระดับนาโนผสมสารสกัดขี้ข้าวโพดม่วง 5% และ 10% สามารถลดการทำงานของ COX-2 (p -value <0.001 ทั้งหมดเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ SCI+Zein polymer based nanofiber transdermal patch) และ GABA-T อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p -value <0.001 ; 0.05 และ 0.05 ตามลำดับเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ SCI+Zein polymer based nanofiber transdermal patch) ดังแสดงในรูปที่ (2-14) - (2-15) เช่นเดียวกับการประเมิน nerve growth factor (NGF) พบว่าหนูที่ได้รับการป้อนยา dexamethasone และแผ่นปิดผิวหนังเส้นใยโพลิเมอร์ระดับนาโนผสมสารสกัดขี้ข้าวโพดม่วง 5% และ 10% สามารถเพิ่ม NGF อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p -value <0.05 ; 0.01 และ 0.01 ตามลำดับเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ SCI+Zein polymer based nanofiber transdermal patch) ดังแสดงในรูปที่ 2-16 แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของ nitic oxide synthase



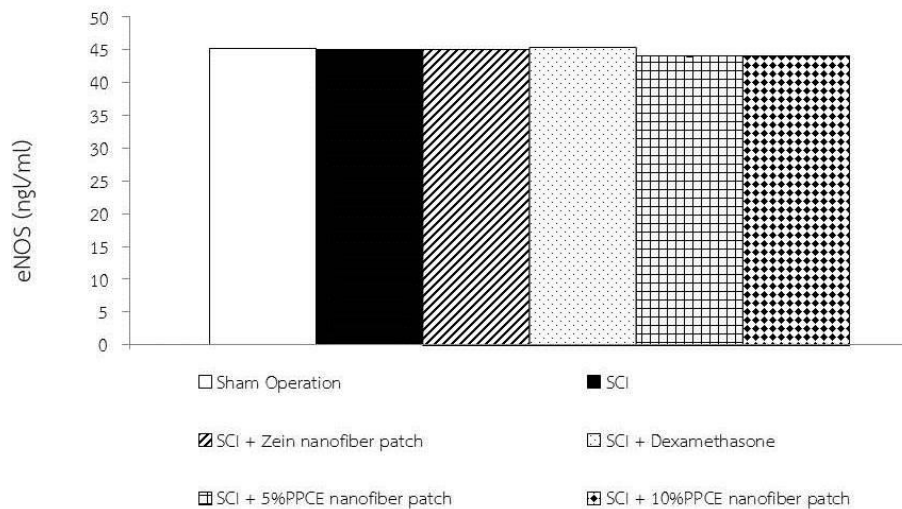
รูปที่ 2-14 ฤทธิ์แผ่นปิดผิวหนังเส้นใยโพลิเมอร์ระดับนาโนผสมสารสกัดขี้ข้าวโพดม่วงต่อการทำงานของเอนไซม์ Cyclooxygenase-2 (COX-2) ในไขสันหลังของหนูที่เหนี่ยวนำให้เกิดภาวะ spinal cord Injury *** p -value <0.001 เปรียบเทียบกับกลุ่ม SCI+ Zein nanofiber patch; ### p -value <0.001 เมื่อเทียบกับกลุ่ม SCI; aaa p -value <0.001 เมื่อเทียบกับกลุ่ม sham operation



รูปที่ 2-15 ฤทธิ์แผ่นปิดผิวหนังเส้นใยโพลิเมอร์ระดับนาโนผสมสารสกัดซังข้าวโพดม่วงต่อการทำงานของ เอนไซม์ GABA Transaminase (GABA-T) ในไขสันหลังของหนูที่เหนี่ยวนำให้เกิดภาวะ spinal Cord Injury *p-value<0.05 ทั้งหมดเปรียบเทียบกับกลุ่ม SCI+ Zein

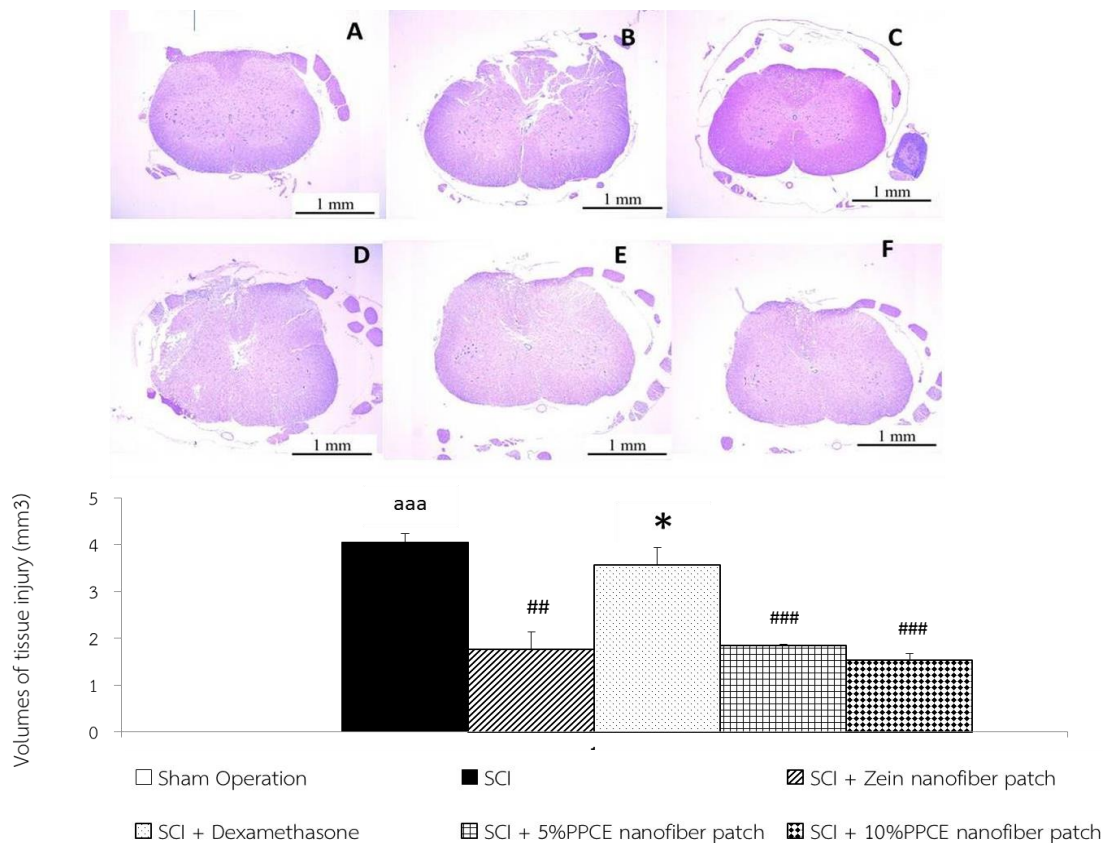


รูปที่ 2-16 ฤทธิ์แผ่นปิดผิวหนังเส้นใยโพลิเมอร์ระดับนาโนผสมสารสกัดซังข้าวโพดม่วงต่อการทำงานของ Nerve growth factor (NGF) ในไขสันหลังของหนูที่เหนี่ยวนำให้เกิดภาวะspinal cord Injury **p-value<0.01ทั้งหมดเปรียบเทียบกับกลุ่ม SCI+ Zein nanofiber patch; ^{aaa}p-value< 0.001 เมื่อเทียบกับกลุ่ม sham operation



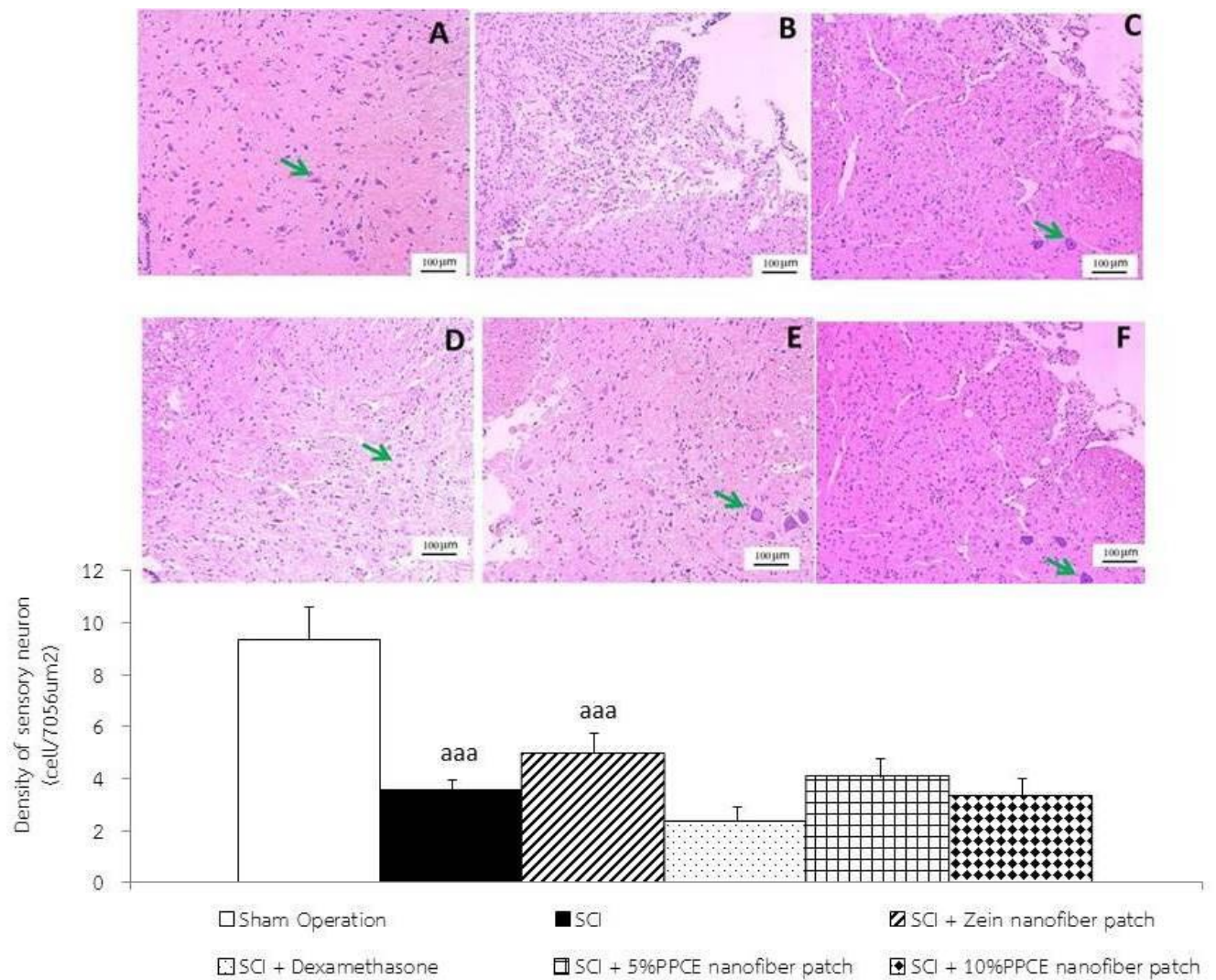
รูปที่ 2-17 แสดงฤทธิ์แผ่นปิดผิวหนังเส้นใยโพลิเมอร์ระดับนาโนผสมสารสกัดข้าวโพดม่วง ต่อการทำงานของ เอนไซม์ Nitric oxide synthase ในไขสันหลังของหนูที่เหนี่ยวนำให้เกิดภาวะspinal cord Injury

หนูที่ได้รับบาดเจ็บของไขสันหลังและได้รับแผ่นปิดผิวหนังเส้นใยโพลิเมอร์ระดับนาโนผสมสารสกัด ข้าวโพดม่วง ทั้งขนาด 5% และ 10% มีปริมาณของเนื้อเยื่อส่วนบริเวณ dorsal column ที่ถูกทำลายลดลง และกลับมาสู่ภาวะที่ใกล้เคียงกับปกติ ($p\text{-value} < 0.001$ ทั้งหมดเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ SCI)

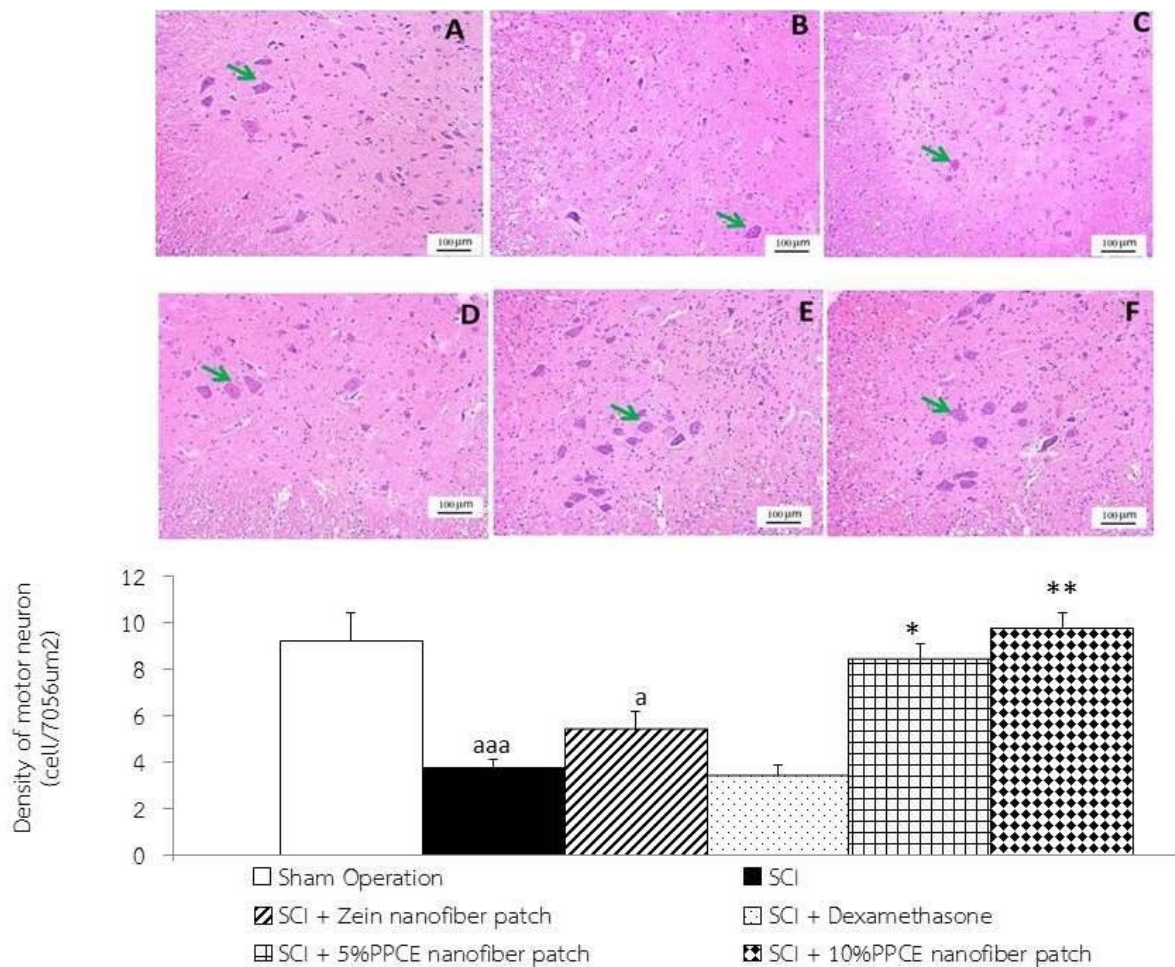


รูปที่ 2-18 ภาพถ่ายได้กล้องจุลทรรศน์ แสดงการเปลี่ยนแปลงปริมาตรเนื้อเยื่อที่ถูกทำลายในไขสันหลังของหนูแรทเพศผู้ที่เหนี่ยวนำให้เกิดภาวะ spinal cord Injury กำลังขยาย 4X
 (A) Sham operation (B) SCI (C) SCI+Zein polymer based nanofiber transdermal patch (D) SCI+Dexamethasone (E) SCI+5%PPCEpolymebased nanofibertransdermal patch (F) SCI+10%PPCE polymer based nanofiber transdermal patch
 *p-value<0.05 เปรียบเทียบกับกลุ่ม SCI+ Zein nanofiber patch; ^{aaa}p-value< 0.001 เมื่อเทียบกับกลุ่ม sham operation; ^{##,###}p-value<0.01 และ 0.001 เปรียบเทียบกับกลุ่ม SCI

เมื่อประเมินเซลล์ประสาทในไขสันหลังในหนูที่ได้รับบาดเจ็บของไขสันหลังและได้รับแผ่นปิดผิวหนังเส้นใยโพลิเมอร์ระดับนาโนผสมสารสกัดข้าวโพดม่วง ทั้งขนาด 5% และ 10% พบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงเซลล์ประสาทชนิดรับความรู้สึก (sensory neurons) แต่พบว่าการรอดของ เซลล์ประสาทสั่งการ (motor neurons) มากกว่ากลุ่มที่ได้รับ zein (p-value<0.05 และ 0.01 ตามลำดับเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ SCI+Zein polymer based nanofiber transdermal patch) ดังแสดงในรูปที่ (2-19) - (2-20)



รูปที่ 2-19 ภาพถ่ายไตกล้องจุลทรรศน์ แสดงการเปลี่ยนแปลงความหนาแน่นของเซลล์ประสาท sensory ในไขสันหลังของหนูแรทเพศผู้ที่เหนี่ยวนำให้เกิดภาวะ spinal cord Injury กำลังขยาย 20X (A) Sham operation (B) SCI (C) SCI+Zein polymer based nanofiber transdermal patch (D) SCI+Dexamethasone (E) SCI+5%PPCE polymer based nanofiber transdermal patch (F) SCI+10%PPCE polymer based nanofiber transdermal patch



รูปที่ 2-20 ภาพถ่ายได้กล้องจุลทรรศน์ แสดงการเปลี่ยนแปลงความหนาแน่นของเซลล์ประสาท motor ในไขสันหลังของหนูแรทเพศผู้ที่เหนี่ยวนำให้เกิดภาวะ spinal cord Injury กำลังขยาย 20X (A) Sham operation (B) SCI (C) SCI+Zein polymer based nanofiber transdermal patch (D) SCI+Dexamethasone (E) SCI+5%PPCE polymer based nanofiber transdermal patch (F) SCI+10%PPCE polymer based nanofiber transdermal patch

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

ภาวะ traumatic spinal cord injury นั้นจะทำให้เกิดพยาธิสภาพต่อไขสันหลังทั้งจากการทำลายปฐมภูมิ (primary damage) และทุติยภูมิ (secondary damage) เมื่อไขสันหลังได้รับบาดเจ็บจากการกระแทกหรือกดทับทำให้เกิดการทำลายปฐมภูมิ (primary injury) ซึ่งการทำลายของไขสันหลังที่เกิดขึ้นจะเป็นผลจากปัจจัยด้านเชิงกลการกดทับหรือการกระแทก หลังจากนั้นจะเกิดการเหนี่ยวนำให้เกิดการทำลายแบบทุติยภูมิโดยการเหนี่ยวนำให้เกิดการรบกวนการทำงานของหลอดเลือด (vascular perturbation) ความล้มเหลวของเมแทบอลิซึม (metabolic failure) ความผิดปกติในการควบคุมสารมีประจุ (ionic dysregulation) และความเป็นพิษจากการกระตุ้นระดับเซลล์ (cellular excitotoxicity) และปัจจัยเหล่านี้ก็จะทำให้เกิดการเพิ่ม permeability ของ blood-brain-barrier, การบวมของเนื้อเยื่อ (tissue edema), การสร้างอนุมูลอิสระ (free radicals formation), การเกิดกระบวนการ peroxidation ของเยื่อเซลล์ (peroxidation of membrane), การกระตุ้นการคัดหลั่งของสาร cytokine และการอักเสบ (inflammation)³³⁻³⁵ ในกระบวนการต่างๆที่กล่าวมานั้นพบว่าความเครียดออกซิเดชันจัดเป็นปัจจัยที่สำคัญในการทำให้เกิดการบาดเจ็บแบบทุติยภูมิ (secondary injury) ของการบาดเจ็บของไขสันหลัง มีรายงานว่าเมื่อไขสันหลังได้รับบาดเจ็บจะมี superoxide anion (O_2^-), hydrogen peroxide (H_2O_2), และ hydroxyl radicals ($OH^\cdot$) เกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว³⁶⁻³⁷ จากหลายกระบวนการ เช่น จากการที่ arachidonic ถูกเปลี่ยนเป็น prostaglandin หรือจากการทำงานของเอนไซม์ monoamine oxidase (MAO) จาก auto-oxidation ของสารสื่อประสาทกลุ่ม amine transmitters, จาก mitochondrial leak, จากการทำงานของ xanthine oxidase, oxidation ของ hemoglobin และจากการทำงานของ neutrophil และ macrophage

ข้อมูลจากการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าสารกลุ่ม glucocorticoids หรือ dexamethasone ซึ่งใช้ในการลดภาวะการอักเสบของไขสันหลังหลังได้รับบาดเจ็บโดยสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ cyclooxygenase type 2 (COX 2) ในไขสันหลัง สอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมา³⁸⁻³⁹ ที่น่าสนใจมากคือแผ่นปิดผิวหนังเส้นใยโพลิเมอร์ระดับนาโนผสมสารสกัดชั่งข้าวโพดม่วงทั้งขนาด 5% และ 10% สามารถยับยั้งการอักเสบผ่านการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ COX2 และเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ catalase (CAT) ทำให้มีความเครียดออกซิเดชันซึ่งทำให้เกิดการตายของเซลล์ประสาทยนต์ (motor neuron) ในไขสันหลัง⁴⁰ ลดลง ทำให้ลดการทำลายของเซลล์ประสาทยนต์ในไขสันหลังลดลงทำให้พบว่าค่า BBB score และ gross motor score ของหนูที่ได้รับบาดเจ็บของไขสันหลังและได้รับแผ่นปิดผิวหนังเส้นใยโพลิเมอร์ระดับนาโนผสมสารสกัดชั่งข้าวโพดม่วงทั้งขนาด 5% และ 10% ดีขึ้น หนูที่ได้รับบาดเจ็บของไขสันหลังและได้รับแผ่นปิดผิวหนังเส้นใยโพลิเมอร์ระดับนาโนผสมสารสกัดชั่งข้าวโพดม่วง ทั้งขนาด 5% และ 10% ยังมีปริมาณของเนื้อเยื่อส่วนบริเวณ dorsal column ที่ถูกทำลายลดลงและกลับมาสู่ภาวะที่ใกล้เคียงกับปกติ ดังนั้นจึงพบว่าการตอบสนองของหนูที่ได้รับบาดเจ็บของไขสันหลังและได้รับแผ่นปิดผิวหนังเส้นใยโพลิเมอร์ระดับนาโนผสมสารสกัดชั่งข้าวโพดม่วง มีการตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วยการสัมผัสผ่าน von Frey filament test กลับมาสู่ปกติ การรับรู้ต่ออุณหภูมิซึ่งจะเกิดขึ้นโดยผ่านทางเดินประสาท lateral spinothalamic tract ซึ่งอยู่บริเวณ lateral funiculus ของส่วน white fiber ของไขสันหลังได้รับผลกระทบน้อยจะพบว่ามีเพียงช่วง 3 วันแรกเท่านั้นที่ได้รับผลกระทบ

จากการบาดเจ็บของไขสันหลัง สอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อวิทยาที่เราพบว่าในส่วนของทางเดินประสาทและการเปลี่ยนแปลงของ dorsal horn ของไขสันหลังเองก็ไม่พบความแตกต่างระหว่างความหนาแน่นของเซลล์ประสาทใน dorsal horn ของไขสันหลัง

นอกจากการลดความเครียดออกซิเดชันซึ่งทำให้มีการทำลายทั้งส่วนของ white และ grey matter ของไขสันหลังลดลงแล้วยังพบว่าทั้ง dexamethasone แผ่นปิดผิวหนังเส้นใยโพลิเมอร์ระดับนาโนที่ใช้โปรตีน zein เป็นโพลิเมอร์ และแผ่นปิดผิวหนังเส้นใยโพลิเมอร์ระดับนาโนผสมสารสกัดข้าวโพดม่วง ทำให้ระดับของ nerve growth factor (NGF) ซึ่งเป็นสารที่จำเป็นต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์ประสาท⁴¹ ในไขสันหลังสูงขึ้น ดังนั้นการที่ความหนาแน่นของเซลล์ประสาทยนต์ใน ventral horn ของไขสันหลังเพิ่มขึ้นตลอดจนการที่ white fiber ของไขสันหลังหรือบริเวณที่ถูกทำลายลดลงส่วนหนึ่งน่าจะเป็นผลจากการเพิ่ม NGF

ข้อมูลจากการศึกษาที่ผ่านมายังพบว่าการทำงานของ GABAergic system มักจะลดลงและมักเกิดภาวะ neuropathic pain ดังนั้นผู้วิจัยได้ประเมินการเปลี่ยนแปลงการทำงานของ GABAergic system พบว่าแผ่นปิดผิวหนังที่ใช้โปรตีน zein เป็นโพลิเมอร์มีการปรับการทำงานโดยเพิ่ม GABA-T ทำให้เพิ่มการทำให้ GABA หมดฤทธิ์ดังนั้นจึงมีแนวโน้มในการทำให้เสียสมดุลของการทำงานระหว่าง excitatory และ inhibitory influence ในไขสันหลัง ในขณะที่แผ่นปิดผิวหนังเส้นใยโพลิเมอร์ระดับนาโนผสมสารสกัดข้าวโพดม่วงสามารถลดการเพิ่มการทำงานของ GABA-T ที่เหนี่ยวนำโดย zein polymer และมีการทำงานของ GABA-T ไม่แตกต่างจากกลุ่ม sham operation

จากข้อมูลที่กล่าวมาในเบื้องต้นจะเห็นว่าแผ่นปิดผิวหนังเส้นใยโพลิเมอร์ระดับนาโนที่มีส่วนผสมสารสกัดข้าวโพดม่วงมีศักยภาพในการเร่งการฟื้นคืนสภาพของไขสันหลัง โดยกลไกการออกฤทธิ์นี้น่าจะผ่านการเพิ่มการสร้าง growth factor และการลดความเครียดออกซิเดชัน และการใช้แผ่นปิดผิวหนังเส้นใยโพลิเมอร์ระดับนาโนที่มีส่วนผสมสารสกัดข้าวโพดม่วงมีผลรบกวนการทำงานของ GABAergic system ในไขสันหลังน้อยจึงมีโอกาสทำให้เกิดภาวะ neuropathic pain ลดลง ดังนั้นซึ่งข้าวโพดสามารถนำมาเพิ่มมูลค่าเป็นผลิตภัณฑ์สุขภาพได้เป็นอย่างดี อย่างไรก็ตามจำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงสาระสำคัญในการออกฤทธิ์และความปลอดภัยในการใช้งานต่อไป ก่อนนำไปศึกษาใน clinical trial phase

บทที่ 6

ข้อเสนอแนะ

แผ่นปิดผิวหนังนาโนมีส่วนผสมสารสกัดข้าวโพดม่วงที่พัฒนาขึ้นมานี้มีศักยภาพในการเร่งการฟื้นคืนสภาพของไขสันหลังหลังบาดเจ็บ ดังนั้นการนำซึ่งข้าวโพดม่วงมาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์สุขภาพเร่งการฟื้นคืนสภาพของไขสันหลังหลังบาดเจ็บนอกจากจะช่วยเพิ่มมูลค่าซึ่งข้าวโพดม่วงแล้วยังช่วยเพิ่มคุณภาพชีวิตของให้ไขสันหลังฟื้นคืนสภาพจากการบาดเจ็บเร็วขึ้น ดังนั้นจึงน่าจะนำมาพัฒนาเพื่อใช้ได้กับผู้ป่วยที่มีการบาดเจ็บของไขสันหลัง จากข้อมูลในการศึกษาครั้งนี้ถึงแม้แผ่นปิดผิวหนังนาโนมีส่วนผสมสารสกัดข้าวโพดม่วงทั้ง 2 ขนาดจะให้ผลเร่งการฟื้นสภาพของไขสันหลังได้ แต่ขนาดที่น่าจะใช้คือขนาด 5% หรือเทียบปริมาณการใช้สารสกัดข้าวโพดม่วงสกัดด้วย 50%ethanol คือ 3.17 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว ซึ่งถ้าเทียบกับปริมาณที่ใช้ในคนคือ 190.20 มิลลิกรัม

อย่างไรก็ตามจำเป็นต้องมีการศึกษาเพื่อให้แผ่นปิดผิวหนังเส้นใยโพลิเมอร์ระดับนาโนผสมสารสกัดซึ่งข้าวโพดม่วงมีความคงตัวนานขึ้น ศึกษาสารสำคัญในการออกฤทธิ์ และความปลอดภัยในการใช้งานต่อไป ก่อนนำไปศึกษาใน clinical trial phase

บทที่ 7

บรรณานุกรม

1. ว่าด้วยเรื่องข้าวโพด [Cited 7 July 2011] Available from: <http://pavichanan.exteen.com/20080217/entry-1>
2. กองบรรณาธิการ ข้าวโพด กินอร่อยต้านโรค กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์เบงก์คอกบุ๊กส์, 2553
3. อัจฉรา กริ่งเกษมศรี การปลูกข้าวโพดฝักอ่อนของชาวบ้านไร่ จังหวัดอุทัยธานี [Cited 7 July 2011] Available from: <http://www.gotoknow.org/blog/stou2499000863/345512>
4. ภัยจาก "ภาวะสมองเสื่อม"[Cited 7 July 2011] Available from: <http://portal.in.th/lifelearn/pages/7973/>
5. Cleary GW, Beskar E. Transdermal and transdermal-like delivery system opportunities. BUSINESS BRIEFING: PHARMATECH 2004
6. Satturwar, P.M.; Fulzele, S.V.; Dorle, A.K. Biodegradation and in vivo biocompatibility of rosin: a natural film-forming polymer. AAPS PharmSciTech. 2003, 4, 1-6.
7. Chaurasia, M.; Chourasia, M.K.; Jain, N.K.; Jain, A.; Soni, V. Gupta, Y.; Jain, S.K. Cross-linked Guar Gum microspheres: A viable approach for improved delivery of anticancer drugs for the treatment of colorectal cancer. AAPS PharmSciTech. 2006, 7, E1-E9.
8. Malafaya, P.B.; Silva, G.A.; Reis, R.L. Natural-origin polymers as carriers and scaffolds for biomolecules and cell delivery in tissue engineering applications. Adv. Drug Deliv. Rev. 2007, 59, 207-233.
9. Chivate, A.A.; Poddar, S.S.; Abdul, S.; Savant, G. Evaluation of Sterculia foetida gum as controlled release excipient. AAPS PharmSciTech. 2008, 9, 197-204.
10. Beneke C., Viljoen AM, Hamman JH. Polymeric Plant-derived Excipients in Drug Delivery. Molecules 2009, 14, 2602-2620
11. Bag BC., Ghosh AK., Adhikari B, Maiti S. Effectiveness of a plant polymer as an antioxidant. Polymer Degradation and Stability 1998; 61: 303-307
12. จินดา สนิทวงศ์ฯ สุวิทย์ อินทฤทธิ์ และสสิต มั่งมีชัย.. การใช้ซังข้าวโพดหวานเป็น อาหารหยาบ สำหรับโครีดนมในช่วงแล้ง กองอาหารสัตว์ กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2541, น.1-11
13. Aldrete JA.. Epidural fibrosis after permanent catheter insertion and infusion. J Pain Symptom Manage 1995;10:624-631.

14. Schültke E, Kamencic H, Skihar VM, Griebel R, Juurlink B. Quercetin in an animal model of spinal cord compression injury: correlation of treatment duration with recovery of motor function. *Spinal Cord*. 2010; 48(2): 112-117.
15. Schültke E, Griebel RW, Juurlink BH. Quercetin administration after spinal cord trauma changes S-100 levels. *Can J Neurol Sci*. 2010;37(2):223-8.
16. Sultana B, Anwar F, Asi MR, Chata SAS. Antioxidant potential of extracts from different agro wastes: Stabilization of corn oil. *GRASAS Y ACEITES*, 2008;59 (3): 205-217.
17. Lin M, Chu QC, Tian XH, Ye JN. Determination of active ingredients in corn silk, leaf, and kernel by capillary electrophoresis with electrochemical detection. *J Capill Electrophor Microchip Technol*. 2007;10(3-4):51-6.
18. Roussos I, Rodríguez M, Villán D, Ariza A, Rodríguez L, García J. Development of a Rat Model of Spinal Cord Injury and Cellular Transplantation. *Transplant. Proc.* 2005 Nov; 37(9): 4127–30.
19. Genovese T, Mazzon E, Crisafulli C, Paola RD, Muià C, Bramanti P, et al. Immunomodulatory Effects of Etanercept in an Experimental Model of Spinal Cord Injury. *J. Pharmacology. Exp. Ther.* 2006 Mar 1; 316(3): 1006–16.
20. Onifer SM, Rabchevsky AG, Scheff SW. Rat models of traumatic spinal cord injury to assess motor recovery. *Ilar J. Natl. Res. Counc. Inst. Lab. Anim. Resour.* 2007; 48(4): 385–95.
21. Zhu Y, Wang A, Shen W, Patel S, Zhang R, Young WL, et al. Nanofibrous Patches for Spinal Cord Regeneration. *Adv. Funct. Mater.* 2010; 20(9): 1433–40.
22. Yune TY, Lee JY, Jung GY, Kim SJ, Jiang MH, Kim YC, et al. Minocycline Alleviates Death of Oligodendrocytes by Inhibiting Pro-Nerve Growth Factor Production in Microglia after Spinal Cord Injury. *J. Neuroscience*. 2007 Jul 18; 27(29): 7751–61.
23. Sandeep K. Agrawal and Michael G. Fehlings. Role of NMDA and Non-NMDA Ionotropic Glutamate Receptors in Traumatic Spinal Cord Axonal Injury. *The Journal of Neuroscience*, 1997, 17(3):1055–1063
24. Li S, Mealing G, Morley P, Stys P, et al. Novel Injury Mechanism in Anoxia and Trauma of Spinal Cord White Matter: Glutamate Release via Reverse Na⁺-dependent Glutamate Transport. *The Journal of Neuroscience*, 1999, 19(14):1-9
25. Glu S, Hanci V, Bahadir B, Acikgoz S, Bektas S, Ankarali S, Kalayci M, Acikgoz B, et al. The effectiveness of dexmedetomidine in experimental spinal cord injury compared to methylprednisolone in rats. *Journal of Clinical Neuroscience*, 2010, 17:490-494
26. Ismailoğlu O, Oral B, Sütcü R, Kara Y, Tomruk O, Demir N, et al. Neuroprotective effects of raloxifene on experimental spinal cord injury in rats. *Am J Med Sci*. 2013 Jan;345(1):39-44.

27. Rael LT, Thomas GW, Craun ML, Curtis CG, Bar-Or R, Bar-Or D. Lipid peroxidation and the thiobarbituric acid assay: standardization of the assay when using saturated and unsaturated fatty acids. *J Biochem Mol Biol*; 2004;37(6):749-52.
28. Sohal RS, Weindruch R. Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science*; 1996;273:59-63.
30. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *J. Biol. Chem.*; 1969;244: 6049-6055
31. Glutathione Peroxidase, in: W.B. Jakoby (Ed.), *Enzymatic Basis of Detoxication*. Academic Press, New York, 1980; (2).333–353.
32. Busconi, L. and Michel, T. Endothelial nitric oxide synthase. N-terminal myristoylation determines subcellular localization *J. Biol. Chem.* 1993. 268,8410-8413.
33. Blight AR : Miracles and molecules-progress in spinal cord repair. *Nat Neurosci* 5 Suppl : 1051-1054, 2002
34. Cohen DM, Pate l CB, Ahobila-Vajjula P, Sundberg LM, Chacko T, Liu SJ, et al. : Blood-spinal cord barrier permeability in experimental spinal cord injury : Dynamic contrast-enhanced MRI. *NMR Biomed* 22 : 332- 341, 2009
35. Hausmann ON : Post-traumatic inflammation following spinal cord injury. *Spinal Cord* 41 : 369-378, 2003.
36. Aoyama T, Hida K, Kuroda S, Seki T, Yano S, Shichinohe H, et al. : Edaravone (mci-186) scavenges reactive oxygen species and ameliorates tissue damage in the murine spinal cord injury model. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 48 : 539-545; discussion 545, 2008
37. Bao F, Liu D : Hydroxyl radicals generated in the rat spinal cord at the level produced by impact injury induce cell death by necrosis and apoptosis : protection by a metalloporphyrin. *Neuroscience* 126 : 285-295, 2004
38. Hall ED, Springer JE. Neuroprotection and acute spinal cord injury: a reappraisal. *NeuroRx* 2004;1:80-100.
39. Yücel N, Cayli SR, Ateş O, Karadağ N, Firat S, Türköz Y. Evaluation of the neuroprotective effects of citicoline after experimental spinal cord injury: improved behavioral and neuroanatomical recovery. *Neurochem Res* 2006;31:767-75.
40. Xu W, Chi L, Xu R, Ke Y, Luo C, Cai J, Qiu M, Gozal D, Liu R. Increased production of reactive oxygen species contributes to motor neuron death in a compression mouse model of spinal cord injury. *Spinal Cord.* 2005 ;43(4):204-13.
41. Zhang H, Wu F, Kong X, et al. Nerve growth factor improves functional recovery by inhibiting endoplasmic reticulum stress-induced neuronal apoptosis in rats with spinal cord injury. *J Transl Med.* 2014;12:130. doi: 10.1186/1479-5876-12-130.