

บทที่ 3

ระเบียบวิธีวิจัย

ขอบเขตของการวิจัย

1. การศึกษาฤทธิ์กระตุ้นการหายของบาดแผลในหลอดทดลอง (*in vitro*)
 - 1.1 การทดสอบฤทธิ์เพิ่มจำนวนเซลล์ (Cell Proliferation activity) ของสารสกัดว่านหมาว้อ (*Curcuma cf. comosa* Roxb.) ด้วยวิธี WST-1 cell proliferation assay
 - 1.2 การทดสอบฤทธิ์กระตุ้นการหายของบาดแผลโดยใช้แบบจำลองการหายของบาดแผล (*in vitro* wound healing model) ด้วยวิธี Scratch assay
2. การศึกษาฤทธิ์กระตุ้นการหายของบาดแผลในสัตว์ทดลอง (*in vivo*)
 - 2.1 การทดสอบฤทธิ์กระตุ้นการหายของบาดแผลของสารสกัดว่านหมาว้อ
 - 2.2 การทดสอบฤทธิ์กระตุ้นการหายของบาดแผลของตำรับครีมที่มีสารสกัดของว่านหมาว้อ
 - 2.3 การตรวจชิ้นเนื้อทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของเนื้อเยื่อ (Histology)

สารสกัดพืชสมุนไพร

สารสกัดหยาบ (crude extract) ด้วยตัวทำละลาย ethyl acetate ของว่านหมาว้อ (*Curcuma cf. comosa* Roxb.) ได้จากโครงการวิจัยที่ 1 เรื่อง โครงการวิจัยที่ 1 เรื่อง การจำแนกชนิด การสกัด แยกสารบริสุทธิ์ และศึกษาโครงสร้างเคมีของสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจากเหง้าของพืชสมุนไพร *Curcuma cf. comosa* Roxb. (Plant identification, extraction, isolation and structural identification of bioactive compounds from rhizome of a herbal plant, *Curcuma cf. comosa* Roxb.) ภายใต้แผนงานวิจัยเดียวกัน คือ การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของพืชสมุนไพร *Curcuma cf. comosa* Roxb. และพัฒนาเป็นตำรับยารักษาแผล โดยสกัดจากส่วนหัวของพืชสมุนไพร *Curcuma cf. comosa* Roxb. ด้วยวิธี Fraction percolation ซึ่งมีวิธีการสกัดโดยสังเขป คือ ชั่งผงพืชสมุนไพรแห้งที่บดละเอียด เติมตัวทำละลาย แล้วสกัดพืชสมุนไพรด้วยเครื่อง Soxhlet apparatus (Buchi, Switzerland) เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นกรองสารสกัดหยาบ ระเหยแห้งด้วยเครื่อง Rotary evaporator (Buchi, Switzerland) ที่อุณหภูมิ 50-70 องศาเซลเซียส จนสารสกัดหยาบแห้ง บรรจุลงในขวดแก้ว บันทึกน้ำหนักสารสกัดหยาบที่แห้งสนิท เก็บในตู้เย็น

ตอนที่ 1 การศึกษาฤทธิ์กระตุ้นการหายของบาดแผลในหลอดทดลอง (*in vitro*) ของสารสกัด ว่านหมาว้อ

เป็นการศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด L929 (mouse subcutaneous connective tissue) และเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด HeLa cell (human cervical carcinoma) โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินประสิทธิภาพในการกระตุ้นการเติบโต และเพิ่มจำนวนของเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการซ่อมแซมบาดแผล รวมถึงการหายของบาดแผลใน *in vitro* wound healing model

วัสดุและอุปกรณ์

Autoclave (Kokusai Enshinkimod H-88LL, Japan)

Cell counter (Hand Held Tally Counter, Diamond 24100, Taiwan)

CO₂ Incubator (Shellab Automatic CO₂ 23237C, USA)

Haemocytometer (Neubaure BOECO, Germany)

Hot air oven (Heraeus Instrument, T6200, Germany)

Laminar air flow (Holten Mod. HBB 2460, USA)

Micropipette (Tranferpette, Germany)

Microplate reader (Biotek/ELX-808 IU, USA)

Microplate shaker (ELMI shaker ST3, USA)

Microscope (Nikon/Alphaphot 2, Switzerland),

pH meter (Mettler, Switzerland)

Refrigerated Centrifuge (Labofug 200 S Hettich, Germany)

Reverted microscope (Nikon, ECLIPSE TE 300, Japan)

Ultrasonic bath (5210, Branson)

Vortex mixer (Thermolyne, USA)

Water bath (Heto-Holten A/S BWB22-2, Denmark)

Glassware and Plasticware: 96-well microtiter plates (TPP, Switzerland), 6-well microtiter plates (TPP, Switzerland), disposable 0.22 µm membrane filter (Gelman Laboratory, USA), centrifuge tubes (TPP, Switzerland), cell culture bottle (TPP, Switzerland)

สารเคมี

Dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma, USA),
 Doxorubicin (Pfizer, USA)
 Dulbecco' Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco, USA),
 Ethyl acetate (Merck, Germany),
 Fetal Bovine Serum (Gibco, USA),
 Penicillin/streptomycin solution (Gibco, USA),
 Sodium hydroxide (Merck, Germany),
 Sulfuric acid (Merck, Germany),
 Trypan Blue Stain (Gibco, USA),
 Trypsin EDTA (Gibco, USA),
 WST-1 cell proliferation kit assay (Roche, Switzerland)

เซลล์เพาะเลี้ยง (Cell cultures)

เซลล์เพาะเลี้ยงได้จากคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี จำนวน 2 ชนิด คือ

1. เซลล์เนื้อเยื่อใต้ผิวหนังของหนู ชนิด L929 (mouse subcutaneous connective tissue)
2. เซลล์มะเร็งปากมดลูกของมนุษย์ ชนิด HeLa cell (human cervical carcinoma)

การเพาะเลี้ยงเซลล์ทั้งสองชนิด เลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด Dulbecco' Modified Eagle Medium (DMEM) ที่เติม 1% penicillin/streptomycin solution และ 10% FBS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% และเปลี่ยนอาหารใหม่ทุก ๆ 3 วัน

การเตรียมเซลล์เพาะเลี้ยง

เพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์สมบูรณ์ (completed medium) ที่ประกอบด้วย Dulbecco' Modified Eagle Medium (DMEM), 1% penicillin/streptomycin solution และ 10% Fetal Bovine Serum (FBS) บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C สภาวะที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ใน CO₂ incubator จนเซลล์เจริญเติบโตมีความหนาแน่น 80-100 % confluent ใช้ pipette ดูดอาหารเก่าออกให้หมด เติม 0.25% Trypsin EDTA ปริมาณ 2 ml ที่ทิ้งไว้ 1 นาที เติม completed medium 5 ml ใช้ปิเปตดูดและเป่าสารละลาย เพื่อให้เซลล์ที่เกาะอยู่หลุดออกให้หมด จากนั้น ถ่ายสารละลายเซลล์ลงใน conical tube นำไปปั่นแยกด้วย Refrigerated centrifuge ที่ความเร็ว 1,500 rpm 15 นาที ที่อุณหภูมิ

เติม completed medium 5 ml ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นแยกอีกครั้ง ทิ้งส่วนใสเติม completed medium ใหม่

การเตรียมสารสกัดสมุนไพร

เตรียมสารสกัดสมุนไพรให้มีความเข้มข้น 2 เท่าของความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบ ด้วยตัวทำละลาย ethyl acetate และ completed medium โดยใช้ 1% DMSO ช่วยในการละลาย ทั้งนี้ ความเข้มข้นสุดท้ายของสมุนไพรที่ใช้ทดสอบเท่ากับ 400, 200, 150, 100, 75, 50 และ 25 µg/ml

วิธีดำเนินการวิจัย

1.1 การทดสอบฤทธิ์เพิ่มจำนวนเซลล์ (Cell proliferation activity) ของสารสกัดว่านหมาว้อ (*Curcuma cf. comosa* Roxb.) ด้วยวิธี WST-1 cell proliferation assay

Cell proliferation assay เป็นวิธีการศึกษาผลของสารทดสอบต่อการเจริญเติบโต และการเพิ่มจำนวนของเซลล์เพาะเลี้ยง เทคนิคการทดสอบด้วยวิธี WST-1 cell proliferation assay อาศัยหลักการที่เซลล์ที่มีชีวิตจะสามารถย่อย WST-1 (2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt) ให้เป็นสารสีเหลือง ซึ่งละลายในน้ำได้ดี เมื่อใส่สารนี้ลงไปในอาหารเลี้ยงเซลล์ และบ่มเพาะกับเซลล์ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เซลล์ที่มีชีวิตจะเปลี่ยนสารตั้งต้น คือ WST-1 ไปเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีสีเหลือง เมื่อนำอาหารเลี้ยงเซลล์เพาะเลี้ยงนั้นไปวัดการดูดกลืนแสงด้วย spectrophotometer หากเซลล์มีการเจริญเติบโตเพิ่มจำนวน จะเกิดสารสีเหลืองปริมาณมาก ทำให้การดูดกลืนแสงมีค่ามาก แต่หากเซลล์ไม่เจริญเติบโต หรือตายที่อาจมาจากความเป็นพิษของสารทดสอบ ค่าดูดกลืนแสงจะลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

วิธีการทดสอบด้วย WST-1 cell proliferation assay

เจือจางเซลล์เพาะเลี้ยงด้วย completed medium ให้มีความเข้มข้นของเซลล์เท่ากับ 1×10^5 cell/ml ด้วยวิธี trypan blue assay และนับเซลล์ด้วยเครื่อง Hemocytometer เติมเซลล์เพาะเลี้ยงที่ปรับความเข้มข้นแล้วลงใน 96 -well plate หลุมละ 100 µl บ่มเซลล์เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 °C สภาวะที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ใน CO₂ incubator เป็นเวลา 6 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์เกาะติดกับภาชนะ หลังจากนั้น เติมสารสกัดสมุนไพรความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณหลุมละ 100 µl แต่ละความเข้มข้นทำซ้ำ 3 ครั้ง และใช้ Doxorubicin ความเข้มข้น 2 µg/ml เป็น positive control บ่มเซลล์และสารทดสอบที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมงเติม 5% WST-1 ทุกหลุม หลุมละ 50 µl บ่มต่อที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง วัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ด้วย microplate reader

ที่ความยาวคลื่น 570 nm โดยใช้ความยาวคลื่น 630 nm เป็น reference wavelength แสดงผลเป็นค่า Proliferation Index (P.I.) ที่คำนวณได้จากสมการ

$$\text{Proliferation index (P.I.)} = \frac{\text{mean absorbance of sample}}{\text{mean absorbance of control}}$$

เมื่อ mean absorbance of sample คือ ค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสงของสารทดสอบ และ mean absorbance of control คือ ค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสงของกลุ่มควบคุม ซึ่งไม่มีสารทดสอบ

1.2 การทดสอบฤทธิ์กระตุ้นการหายของบาดแผลโดยใช้แบบจำลองการหายของบาดแผล (*in vitro* wound healing model) ของสารสกัดว่านหมาว้อ (*Curcuma cf. comosa* Roxb.) ด้วยวิธี Scratch assay

หลังจากเตรียมเซลล์เพาะเลี้ยง ให้เติมเซลล์เพาะเลี้ยง ปริมาตร 500 μ l และอาหารเลี้ยงเซลล์ ปริมาตร 500 μ l ลงใน 6-well plate บ่มเซลล์เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 °C สภาวะที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ใน CO₂ incubator เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นใช้ pipette tip ขนาดปริมาตร 200 μ l ขีดเส้นพาดขวางผ่านกลางหลุมของจานเลี้ยงเซลล์เป็นแนวยาวตามที่กำหนด เพื่อให้เกิดช่องว่าง (artificial wound) ล้างเอาเซลล์ที่หลุดออกจากการขีดออกไป แล้วนำเซลล์เพาะเลี้ยงนั้นไปบ่มกับสารสกัดว่านหมาว้อที่ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 1,000 μ l บันทึกภาพเซลล์เพาะเลี้ยงภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่เวลา 0, 2, 4, 8, และ 16 ชั่วโมง ฤทธิ์กระตุ้นการหายของแผลของสารสกัดสมุนไพร ประเมินจากการลดลงของพื้นที่ซึ่งเป็นที่ว่างตามรอยขีดเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

ส่วนที่ 2 การศึกษาฤทธิ์กระตุ้นการหายของบาดแผลในสัตว์ทดลอง

วัสดุและอุปกรณ์

Animal cages

Metal ear punch diameter 2 mm. (Fisher Scientific, Pittsburgh USA)

Microscope (Nikon/Alphaphot 2, Switzerland),

Micropipette (Tranferpette, Germany)

Microtome

Scan scope

Vernier caliper

Forceps and scissors

Glassware: Beaker, Slides and cover slips

สารเคมี

Ethyl acetate (Merck, Germany)

Diethyl ether (Merck, Germany)

Formalin (Merck, Germany)

Hematoxytin & Eosin (H&E)

Isopropyl alcohol (Carlo, Italy)

Paraffin (Sigma Chemical, USA)

Xylyne (Sigma Chemical, USA)

Zoletil 100 (Virbac, France)

Hirudoid® (Medinova Ltd, Switzerland)

Oxoferin® (Holopack, Germany)

การเตรียมสารสกัดพืชสมุนไพรร

เตรียมสารสกัดหยาบด้วยสารละลาย ethyl acetate ของว่านหมาว้อ (*Curcuma cf. comosa* Roxb.) ให้มีความเข้มข้น 0.1% w/v และ 0.2% w/v

การเตรียมตำรับครีมที่มีสารสกัดพืชสมุนไพรร

ตำรับครีมที่มีสารสกัดหยาบด้วยสารละลาย ethyl acetate ของว่านหมาว้อ (*Curcuma cf. comosa* Roxb.) ได้จากโครงการวิจัยที่ 5 เรื่องการพัฒนาตำรับยาเตรียมจากส่วนสกัดที่แสดงฤทธิ์ของพืชสมุนไพรร *Curcuma cf. comosa* Roxb เพื่อใช้ในการรักษาแผล (Formulation development of bioactive fraction of *Curcuma cf. comosa* Roxb to promote wound healing) ภายใต้แผนงานวิจัยเดียวกัน คือ การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของพืชสมุนไพรร *Curcuma cf. comosa* Roxb. และพัฒนาเป็นตำรับยารักษาแผล

การตั้งตำรับครีมมีรายละเอียดการเตรียมพอสังเขป ดังนี้

1. เตรียม Cream base 1,000 g.
 - Oil phase : หลอม stearic acid 30 g, glyceryl monostearate 20 g, cetyl alcohol 80 g, cremophor A25 10 g, silicone oil 5 g, isopropyl myristate 30 g ตามลำดับ บน water bath จนมีอุณหภูมิประมาณ 75°C
 - Water phase: โปรราย carbopol ultrez 10 3 g ใน Propylene glycol 20 g จนกระจายตัวหมด แล้วเติมน้ำ 798.9 ml จากนั้นอุ่นให้ได้อุณหภูมิประมาณ 78°C
 - ผสม oil phase ใน water phase ช้าๆ และคนสม่ำเสมอ จนอุณหภูมิประมาณ 50°C
 - เติม triethanolamine 5 g ครีมจะเริ่ม congeal
 - เติม germaben-II 8 g และ α -tocopherol 0.1 g. บรรจุลงภาชนะ

2. เตรียมตำรับครีมที่มีสารสกัดด้วย ethyl acetate ของว่านหมาว้อ ปริมาณตำรับละ 150 g โดยให้มีความเข้มข้น 5%w/w, 10%w/w, 15%w/w และ 20%w/w ของ cream base ภายหลังการเตรียมตำรับครีม ต้องมีการประเมินตำรับต่างๆ ดังนี้
 - **การทดสอบความคงตัว (stability)** ของตำรับครีมที่มีสารสกัดด้วย ethyl acetate ของว่านหมาว้อด้วยการทำ heating and cooling cycle โดยนำตำรับครีมที่มีสารสกัดด้วย ethyl acetate ของว่านหมาว้อเก็บในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 45 °C นาน 48 ชม. แล้วจึงนำไปเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 8 °C นาน 48 ชม. คิดเป็น 1 รอบ ทำซ้ำ 10 รอบ
 - **การประเมินลักษณะทางกายภาพ (appearance)** ของตำรับครีมที่มีสารสกัดด้วย ethyl acetate ของว่านหมาว้อที่ผ่านการทำ heating and cooling cycle เปรียบเทียบกับตำรับครีมที่มีสารสกัดด้วย ethyl acetate ของว่านหมาว้อที่เก็บไว้ในอุณหภูมิห้อง (25°C) โดยสังเกตลักษณะเนื้อครีม การแยกชั้น การตกตะกอน สีและกลิ่น
 - **การประเมินความหนืด (Viscosity)** ของตำรับครีมที่มีสารสกัดด้วย ethyl acetate ของว่านหมาว้อที่ผ่านการทำ heating and cooling cycle เปรียบเทียบกับตำรับครีมที่มีสารสกัดด้วย ethyl acetate ของว่านหมาว้อที่เก็บไว้ในอุณหภูมิห้อง(25°C) โดยใช้ Viscometer (LMS Instruments)
 - **การประเมินความเป็นกรด-ด่าง (pH)** ของตำรับครีมที่มีสารสกัดด้วย ethyl acetate ของว่านหมาว้อที่ผ่านการทำ heating and cooling cycle เปรียบเทียบกับตำรับครีมที่มี

สารสกัดด้วย ethyl acetate ของว่านหมาว้อที่เก็บไว้ในอุณหภูมิห้อง(25°C) โดยใช้ pH paper (Macherey-Nagel, Germany) ช่วง pH 3.8- 5.5

- การวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญในตำรับครีมที่มีสารสกัดด้วย ethyl acetate ของว่านหมาว้อที่ผ่านการทำ heating and cooling cycle เปรียบเทียบกับ ตำรับครีมที่มีสารสกัดด้วย ethyl acetate ของว่านหมาว้อที่เก็บไว้ในอุณหภูมิห้อง(25°C) โดยใช้ HPLC

ผลการประเมินตำรับครีมต่างๆ อยู่ในโครงการวิจัยที่ 5 เรื่องการพัฒนาตำรับยาเตรียมจากส่วนสกัดที่แสดงฤทธิ์ของพืชสมุนไพร *Curcuma cf. comosa* Roxb เพื่อใช้ในการรักษาแผล(Formulation development of bioactive fraction of *Curcuma cf. comosa* Roxb to promote wound healing)

สัตว์ทดลอง

หนู mice พันธุ์ C57BL/6 คณะแพศ อายุ 8 สัปดาห์ น้ำหนักประมาณ 20-25 g จำนวน 36 ตัว จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล หนูถูกเลี้ยงที่ห้องสัตว์ทดลองของคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี อย่างน้อย 1 สัปดาห์ก่อนการทดลอง โดยให้อาหารสำเร็จรูปตามมาตรฐานของสำนักสัตว์ทดลอง และดื่มน้ำตลอดเวลา เปลี่ยนอาหารและน้ำดื่มทุก 2 วัน เปลี่ยนวัสดุรองนอนทุก 3 วัน สภาวะที่ใช้ในการเลี้ยง คือ อุณหภูมิ $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ความชื้นสัมพัทธ์ 55-60% ระยะเวลาที่สัมผัสแสง คือ มีแสง 12 ชั่วโมง และปิดไฟ 12 ชั่วโมง โดยการทดลองในสัตว์ทดลอง ได้รับอนุมัติการใช้สัตว์ทดลองจากคณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและใช้สัตว์ทดลอง มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี (Ethics committee) (ID #7/2555/research) เอกสารดังกล่าวแนบมา

วิธีดำเนินการวิจัย

การสร้างบาดแผล

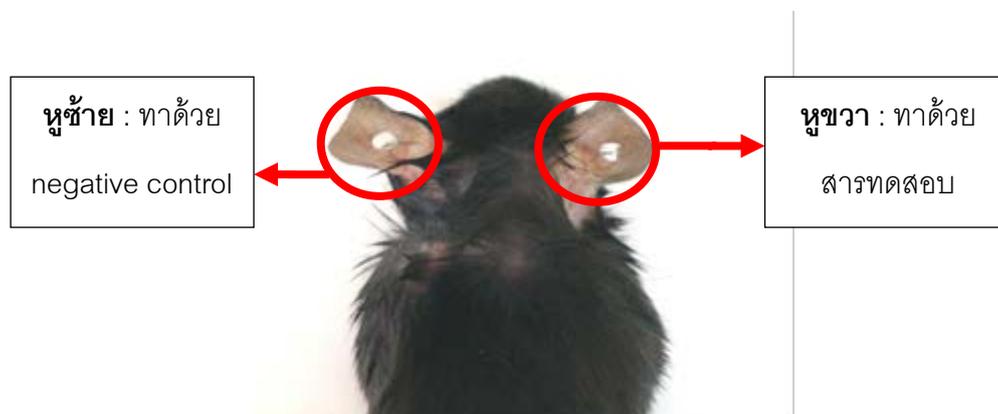
ฉีดยาสลบหนูทดลองด้วย Zoletil 100 จากนั้นเช็ดบริเวณใบหูด้วยแอลกอฮอล์เพื่อทำลายเชื้อเจาะใบหูของหนูทั้งสองข้างที่บริเวณกลางหู (Center of the cartilaginous part of both ears) ให้เป็นรู (through-and-through hole) (รูปที่ 11) ด้วย 2-mm diameter metal ear punch บันทึกภาพลักษณะภายนอกของบาดแผล และวัดขนาดของรูที่เจาะทันทีด้วย vernier caliper วัดซ้ำ 3 ครั้ง (ไม่ต้องปิดแผล และไม่มีการใช้ยาต้านจุลชีพตลอดการทดลอง) และนับเป็นวันที่ 0



รูปที่ 11 การเจาะใบหูของหนูเพื่อให้เกิดแผล

การทาบแผล

แบ่งหนูทดลองออกเป็น 6 กลุ่ม กลุ่มละ 6 ตัว ทาสารทดสอบที่บริเวณบาดแผลของใบหูทั้งสองข้าง ดังรูปที่ 12 โดยหูข้างซ้ายของหนูทดลองทุกตัว จะถูกทาด้วยตัวควบคุม (negative control) เช่น ethyl acetate หรือ cream base ส่วนหูข้างขวาของหนูทดลองทุกตัว จะถูกทาสารทดสอบ เช่น สารสกัดหยาดด้วย ethyl acetate ของว่านหมาว้อ หรือ ตำรับครีมที่มีสารสกัดด้วย ethyl acetate ของว่านหมาว้อ หรือ positive control



รูปที่ 12 การทาสารทดสอบที่บริเวณบาดแผลของใบหูทั้งสองข้างของหนูทดลอง

โดยหนูทดลองกลุ่มต่างๆ จะถูกทาสารทดสอบแตกต่างกัน ดังนี้
 หนูกลุ่มที่ 1 (n=6)

- หูซ้าย : ทาด้วย ethyl acetate
- หูขวา : ทาด้วยสารสกัดหยาดของว่านหมาว้อที่ความเข้มข้น 0.1% w/v

หนูกุ่มที่ 2 (n=6)

- หูข้างซ้าย : ทาด้วย ethyl acetate
- หูข้างขวา : ทาด้วยสารสกัดหยาบของว่านหมาว้อที่ความเข้มข้น 0.2% w/v

หนูกุ่มที่ 3 (n=6)

- หูข้างซ้าย : ทาด้วย ethyl acetate
- หูข้างขวา : ทาด้วย Oxoferin[®]

หนูกุ่มที่ 4 (n=6)

- หูข้างซ้าย : ทาด้วย cream base
- หูข้างขวา : ทาด้วยตำรับครีมที่มีสารสกัดของว่านหมาว้อที่ความเข้มข้น 5% w/w

หนูกุ่มที่ 5 (n=6)

- หูข้างซ้าย : ทาด้วย cream base
- หูข้างขวา : ทาด้วยตำรับครีมที่มีสารสกัดของว่านหมาว้อที่ความเข้มข้น 10% w/w

หนูกุ่มที่ 6 (n=6)

- หูข้างซ้าย : ถูกทาด้วย cream base
- หูข้างขวา : ถูกทาด้วย Hirudoid[®] cream

หนูกุ่มที่ 1-3 ทาบาดแผลที่ใบหูแต่ละข้างด้วยสารละลาย ปริมาตร 0.2 μ l ส่วนหนูกุ่มที่ 4-6 ทาบาดแผลที่ใบหูแต่ละข้างด้วยครีม ปริมาณ 10 mg ทาทุกวัน วันละ 1 ครั้ง

การประเมินการหายของบาดแผล

ถ่ายภาพลักษณะภายนอกของบาดแผล รวมทั้งบันทึกวันที่แผลเริ่มปิดจนกระทั่งปิดสนิท รวมทั้งวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของบาดแผลโดยใช้ vernier caliper วัดซ้ำ 3 ครั้ง ในวันที่ 0, 1, 2, 5, 7, 10, 15, 20, 25, 30 และคำนวณค่าร้อยละของการหายของบาดแผล โดยใช้สูตร

$$\% \text{ wound healing} = \frac{\text{diameter at day}_0 - \text{diameter at day}_n}{\text{diameter at day}_0} \times 100$$

สารที่มีฤทธิ์กระตุ้นการหายของแผล จะเร่งอัตราการสร้างเนื้อเยื่อใหม่มาซ่อมแซมปิดรูแผลที่เกิดขึ้น ซึ่งสามารถประเมินได้จากขนาดรูเจาะที่เล็กลงเมื่อเวลาผ่านไป นอกจากนี้ยังสามารถประเมินด้วยการซ่อมแซมบาดแผลนั้นทำให้เกิดแผลเป็น (scar) มากน้อยแค่ไหนด้วย

การตรวจชิ้นเนื้อทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของเนื้อเยื่อ (Histology)

ส่งตรวจชิ้นเนื้อในวันที่ 0, 2, 5, 10 และ 20 โดยฆ่าหนูด้วยวิธีดมสลบด้วย ether ตัดหูหนูด้วยกรรไกรที่ฐานของใบหู (base of the pinna) ใส่ใน 10% buffered formalin pH 7.0 เตรียมเนื้อเยื่อโดย Paraffin technique เพื่อศึกษา histology ด้วยเครื่องมือ scan scope ดังนี้

- Washing : ให้น้ำไหลผ่านเนื้อเยื่อ เพื่อล้าง 10% buffered formalin จากเนื้อเยื่อ
- Dehydration : ดึงน้ำออกจากเซลล์ด้วย ethanol โดยเริ่มจากความเข้มข้นต่ำไปสูง คือ 25%, 50%, 75%, 100%
- Clearing : นำ dehydrant ออกจากเนื้อเยื่อ โดยใช้ xylene เป็น Clearing agent
- Infiltration : นำ paraffin ที่เป็น embedding agent เข้าสู่เนื้อเยื่อเพื่อทำให้ง่ายต่อการตัด
- Embedding : ผึ่งเนื้อเยื่อลงใน paraffin หลอมเหลว (embed) ก่อนที่จะนำเนื้อเยื่อมาตัด โดยจะใช้แบบ (mold) จากนั้นแกะพิมพ์ออกมาจะได้เป็นลักษณะ paraffin block
- Sectioning : ตัดชิ้นเนื้อที่ฝังอยู่ใน paraffin block โดยมีความหนา 4 micron ด้วยเครื่อง microtome ชิ้นเนื้อเยื่อที่ได้จะมีลักษณะเป็น ribbon
- Adhesion : นำ section ที่ตัดได้มายึดติดบนแผ่น slide แก้ว โดยนำ section นั้นมาลอยใน water bath 50 °C ที่ผสม gelatin จากนั้นช้อน section ด้วย glass slide แล้วนำมาตั้งทิ้งไว้บนเครื่อง warmer
- Staining & Mounting : ย้อมสีเพื่อให้เห็น contrast ใน tissue มากขึ้นโดยใช้สี hematoxylin & eosin (H&E) จากนั้นทำการหยด permount แล้วปิดทับด้วย Cover slip โดยมีขั้นตอนย่อย ดังนี้
 - Deparaffinization : ใช้ Xylene จำนวน 2 โถ เป็นตัวละลายหรือดึง wax medium ออกจากชิ้นเนื้อเยื่อ
 - Hydration : ล้าง xylene ให้หมดไปจากชิ้นเนื้อเยื่อ และเตรียมน้ำสไลด์ ชิ้นเนื้อเยื่อส่งสู่น้ำเพื่อการย้อมสี โดยใช้ ethanol เรียงลำดับจากความเข้มข้นสูงไปต่ำ คือ 100%, 75%, 50%, 25%
 - Staining : ย้อมสีโดยใช้สี hematoxylin & eosin (H&E)
 - Dehydration : ทำให้ชิ้นเนื้อเยื่อบนสไลด์ปราศจากน้ำโดยใช้ ethanol เริ่มจากความเข้มข้นต่ำไปสูง คือ 25%, 50%, 75%, 100%
 - Clearing : ทำให้ชิ้นเนื้อเยื่อบนสไลด์ปราศจาก dehydrants โดยใช้ xylene ซึ่งเป็น clearing agent เช่นเดียวกับการเตรียมชิ้นเนื้อ เนื่องจาก

xylene สามารถดึงพวก ethanol ที่ใช้เป็นตัว dehydrant ได้ดี อีกทั้งยังสามารถเป็นสื่อ นำและละลายเข้ากันได้ดีกับ permount ที่ใช้เป็น mounting medium

- Mounting : นำเอา cover glass ที่มีขนาดใหญ่กว่าชิ้นเนื้อเล็กน้อยปิดทับลงบนชิ้นเนื้อเยื่อบนสไลด์โดยใช้ mounting medium หยดลงบนเนื้อเยื่อ ที่ทำการย้อมสีเสร็จแล้ววางทับด้วย cover glass เสร็จแล้วนำไปตากลมให้ mounting medium แห้ง แล้ว scan slide ด้วยเครื่องมือ scan scope

การประเมินการหายของบาดแผล พิจารณาจากความหนาแน่นของ polymorphonuclear (PMN), fibroblast, collagen fiber และหลอดเลือด

สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

แสดงผลการทดลองในรูปแบบ mean \pm standard deviation (S.D.) และวิเคราะห์ค่าทางสถิติโดยใช้ Student *t* test ค่า p value ≤ 0.01 : p value ≤ 0.05 ถือว่าข้อมูลมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ