

## บทที่ 5

### อภิปรายผลการวิจัย

งานวิจัยเป็นโครงการวิจัยที่ 2 ที่อยู่ภายใต้แผนงานวิจัย เรื่อง การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของพืชสายพันธุ์ใหม่ *Curcuma cf. comosa* Roxb. และพัฒนาเป็นตำรับยารักษาแผล (Study of Biological Activities of a New Specie Herb, *Curcuma cf. comosa* Roxb., and Development for the Use as Wound Healing Promotion) ซึ่งประกอบด้วยโครงการวิจัยย่อย 5 เรื่อง คือ

- โครงการวิจัยที่ 1** การสกัด แยกสารบริสุทธิ์ และ ศึกษาโครงสร้างเคมีของสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจากเหง้าของพืชสมุนไพรร *Curcuma cf. comosa* Roxb.  
(Extraction, isolation and structural identification of bioactive compounds from rhizome of a herbal plant, *Curcuma cf. comosa* Roxb.)
- โครงการวิจัยที่ 2** การศึกษาฤทธิ์กระตุ้นการหายของแผลของพืชสมุนไพรร *Curcuma cf. comosa* Roxb.  
(A study on wound healing effect of a herbal plant, *Curcuma cf. comosa* Roxb.)
- โครงการวิจัยที่ 3** การศึกษาฤทธิ์ต้านจุลชีพของพืชสมุนไพรร *Curcuma cf. comosa* Roxb.  
(A study on antimicrobial activity of a herbal plant, *Curcuma cf. comosa* Roxb.)
- โครงการวิจัยที่ 4** การศึกษาฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน และต้านการอักเสบปวดของพืชสมุนไพรร *Curcuma cf. comosa* Roxb.  
(A study on antioxidative, anti-inflammatory and analgesic activities of a herbal plant, *Curcuma cf. comosa* , Roxb.)
- โครงการวิจัยที่ 5** การพัฒนาตำรับยารักษาแผลจากสารสกัดที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพของพืชสมุนไพรร *Curcuma cf. comosa* Roxb.  
(Formulation development of bioactive fraction of *Curcuma cf. comosa* Roxb to promote wound healing )

เนื่องจากโครงการวิจัยที่ 1 ได้ทำการสกัดเหง้าของว่านหมาว้อด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ คือ เมธานอล เอธิลอะซิเตท และเฮกเซน ให้เป็นสารสกัด และโครงการวิจัยที่ 3 ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดว่านหมาว้อด้วยตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิด พบว่าสารสกัดเอธิลอะซิเตทมีฤทธิ์ต้านจุลชีพที่ดีที่สุด สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ 4 ชนิด คือ *Bacillus cereus*, *Campylobacter jejuni*, *Shigella sonnei*, และ *Streptococcus pyogenes* และมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา *Aspergillus niger* ได้ (ณัฐวุฒิ และคณะ, 2549) และงานวิจัยนี้ยังได้เลือกสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ของส่วนสกัดเอธิลอะซิเตทเพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านจุลชีพอีกด้วย (กรองกาญจน์ และคณะ, 2550) โครงการวิจัยที่ 4 ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน และต้านการอักเสบปวดของสารสกัดว่านหมาว้อด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ คือ เมธานอล เอธิลอะซิเตท และเฮกเซน โดยทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเกิด lipid peroxidation พบว่าสารสกัดด้วย ethyl acetate มีความสามารถยับยั้งการเกิด lipid peroxidation ดีที่สุด (น้ำทิพย์ และคณะ, 2548) ส่วนฤทธิ์ต้านการปวดทั้งในหลอดทดลอง (*in vitro*) และในสัตว์ทดลอง (*in vivo*) พบว่าพบว่ามีฤทธิ์ต้านการปวดในตัวอย่างทั้งสามชนิดมีฤทธิ์ต้านการปวดใกล้เคียงกับ ibuprofen และมีฤทธิ์ต้านการอักเสบโดยมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ COX-I และ COX-II นอกจากนี้ Teerawatanasuk และคณะ (2003) ยังพบว่า สารสกัดด้วยตัวทำละลาย ethyl acetate จากเหง้าของว่านหมาว้อมีฤทธิ์ต้านมะเร็ง โดยมีฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มจำนวน (anti-proliferative effect) ของเซลล์มะเร็งตับของหนู (murine hepatocellular carcinoma) ชนิด CBO140C12 และมีฤทธิ์ยับยั้งการบุกรุก (anti-invasion) ฤทธิ์ต้านการอพยพ (anti-migration) ของเซลล์มะเร็งในหลอดทดลอง (*in vitro*) และยับยั้งการเกาะติดของเซลล์มะเร็งต่อ extracellular matrix proteins นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์ anti-angiogenic activity โดยยับยั้ง hepatic sinusoidal endothelial (HSE) cells ในการสร้าง tube-like structures เมื่อเลี้ยงเซลล์ใน matrigel-coated substrate จากผลการวิจัยของโครงการวิจัยต่างๆ ข้างต้น จึงเป็นเหตุผลสนับสนุนให้โครงการวิจัยนี้เลือกสารสกัดด้วยตัวทำละลายด้วยเอธิลอะซิเตทมาทำการทดสอบฤทธิ์กระตุ้นการหายของบาดแผล

กระบวนการหายของแผล (wound healing) เป็นกระบวนการทางสรีรวิทยา ซึ่งเกิดขึ้นเป็นลำดับต่อเนื่องกัน 4 ระยะ คือ ระยะที่ 1: ระยะห้ามเลือด (hematostasis) ระยะที่ 2: ระยะการอักเสบ (inflammatory phase) ระยะที่ 3: ระยะการแบ่งเซลล์และซ่อมแซมบาดแผล และระยะที่ 4 : ระยะการปรับโครงสร้างเนื้อเยื่อ (Remodeling phase) (Beanes et al., 2003) การศึกษาฤทธิ์กระตุ้นการหายของบาดแผล มักจะศึกษาผลของสารทดสอบต่อกระบวนการหายของแผลในระยะที่ 3 คือ ระยะการแบ่งเซลล์และซ่อมแซมบาดแผล โดยระยะนี้ เซลล์ fibroblasts จะเคลื่อนที่มายังบริเวณบาดแผล เพื่อเข้าสู่ระยะการแบ่งเซลล์ มีการเจริญของเนื้อเยื่อเพื่อซ่อมแซมบาดแผล กระบวนการต่างๆ ที่เกิดขึ้นในระยะนี้ได้แก่ การสร้างหลอดเลือดใหม่ (angiogenesis) การสร้างเนื้อเยื่อใหม่ (granulation tissue

formation) ซึ่งประกอบด้วย fibrin, fibronectin, collagens, proteoglycans, glycoproteins และ glycosaminoglycans (GAGs) เช่น hyaluronan เป็นต้น มีการสะสมคอลลาเจน (collagen deposition) สร้างเนื้อเยื่อบุผิวใหม่ (epithelization) และการหดตัวของแผล (wound contraction) (Bale and Jones, 2006)

งานวิจัยนี้ประเมินฤทธิ์กระตุ้นการหายของบาดแผลในกระบวนการหายของแผลระยะที่ 3 คือ ระยะการแบ่งเซลล์และซ่อมแซมบาดแผลของสารสกัดหยาบด้วยเอธิลอะซิเตทของว่านหมาว้อ โดยการทดสอบฤทธิ์กระตุ้นการหายของบาดแผลในหลอดทดลอง ซึ่งวัดจากความสามารถในการเพิ่มจำนวนเซลล์เพาะเลี้ยง (Cell Proliferation activity) ด้วยวิธี WST-1 cell proliferation assay แสดงผลเป็น proliferation index (P.I.) หากสารทดสอบมีฤทธิ์เพิ่มจำนวนเซลล์ ค่า P.I. ควรมีค่ามากกว่า 1 และใช้แบบจำลองการหายของบาดแผล (*in vitro* wound healing model) ด้วยวิธี Scratch assay คือ การสร้าง artificial wound จากการขีดเส้นพาดขวางผ่านกลางหลุมของจานเลี้ยงเซลล์เป็นแนวยาว เพื่อให้เกิดช่องว่าง แล้วบ่มเซลล์เพาะเลี้ยงกับสารทดสอบที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน แล้วสังเกตการลดลงของพื้นที่ซึ่งเป็นที่ว่างตามรอยขีดที่เวลาต่างๆ กัน เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม หากสารทดสอบมีฤทธิ์กระตุ้นการหายของบาดแผล ควรมีความสามารถในการเพิ่มจำนวนเซลล์ให้ชิดกันเร็วที่สุด

นอกจากนี้ งานวิจัยได้ทดสอบฤทธิ์กระตุ้นการหายของบาดแผลในสัตว์ทดลอง สารที่มีฤทธิ์กระตุ้นการหายของแผล จะเร่งอัตราการสร้างเนื้อเยื่อใหม่มาซ่อมแซมปิดรูแผลที่เกิดขึ้น ซึ่งสามารถประเมินได้จากขนาดรูเจาะที่เล็กลงเมื่อเวลาผ่านไป และยังสามารถประเมินด้วยการซ่อมแซมบาดแผลนั้น ทำให้เกิดแผลเป็น (scar) น้อยลงแค่นั้นด้วย การประเมินการหายของบาดแผลวัดจากร้อยละของการหายของบาดแผล (% wound healing) หากสารทดสอบมีฤทธิ์กระตุ้นการหายของบาดแผลดี ค่าร้อยละของการหายของบาดแผลควรมีค่ามาก ถ้าร้อยละของการหายของบาดแผลมีค่าเท่ากับ 100% แสดงว่าแผลปิดสนิท ส่วนการตรวจชิ้นเนื้อทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของเนื้อเยื่อ (Histology) เพื่อประเมินการหายของบาดแผล โดยสังเกตจากความหนาแน่นของ polymorphonuclear (PMN), fibroblast, collagen fiber และหลอดเลือดที่สร้างใหม่ ซึ่งสารทดสอบมีฤทธิ์กระตุ้นการหายของบาดแผล ควรมีจำนวนมากกว่า

นอกจากนี้ ยังมีวิธีทดสอบอื่นๆ เพื่อประเมินฤทธิ์กระตุ้นการหายของบาดแผลของสารทดสอบในสัตว์ทดลอง เช่น การต้านอนุมูลอิสระในระหว่างกระบวนการหายของแผล, การเพิ่มปริมาณและการสังเคราะห์คอลลาเจนและ hydroxyproline, การเพิ่มการหดตัวของขอบแผล (wound contraction) จากค่าเฉลี่ยร้อยละการหดตัวของแผล (% wound contraction) โดยสร้างบาดแผลแบบกรีดที่หลังและเย็บแผล, การเพิ่มความแข็งแรงของบาดแผล จากค่า tensile strength, การกระตุ้นการสร้างเยื่อบุผิว

ใหม่ ทำให้สามารถสร้างเยื่อผิวหนังใหม่ปกคลุมบาดแผลได้เร็วขึ้น จากค่าเฉลี่ยร้อยละของการสร้างเยื่อผิวหนังใหม่ (% epithelization)

สรรพคุณการรักษาแผลของว่านหมาว้อที่ชาวบ้านนำเหง้าสด (rhizome) มาฝานเป็นแผ่นบางๆ แล้วพันรอบบาดแผลสดที่เกิดจากของมีคมตัดลึก ที่ทิ้งไว้เป็นเวลา 3-5 วัน เมื่อเปิดออกดู พบรอยแผลเชื่อมกันได้ดี เหลือเพียงรอยแดงและไม่มีการติดเชื้อ อาจอธิบายปรากฏการณ์ได้จากผลการวิจัยนี้ที่พบว่า ว่านหมาว้อมีฤทธิ์กระตุ้นการหายของบาดแผล โดยมีฤทธิ์เพิ่มจำนวนเซลล์ สามารถเร่งอัตราการสร้างเนื้อเยื่อใหม่มาซ่อมแซมปิดบาดแผล กระตุ้นการเพิ่มจำนวนของของ polymorphonuclear (PMN), fibroblast, collagen fiber และหลอดเลือดที่สร้างใหม่ นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์อื่นๆ ที่สนับสนุนการหายของบาดแผลจากรายงานการวิจัยของโครงการวิจัยในแผนงานเดียวกัน อาทิ ฤทธิ์ต้านจุลชีพ (ณัฐวุฒิ และคณะ, 2549; กรองกาญจน์ และคณะ, 2550) ฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน (น้ำทิพย์ และคณะ, 2548; ธีรศักดิ์ วงษ์วาน และคณะ, 2550)

ผลการวิจัยที่พบว่าสารสกัดด้วยเอธิลอะซิเตทของว่านหมาว้อ (*Curcuma cf. comosa* Roxb.) มีฤทธิ์กระตุ้นการหายของบาดแผล สอดคล้องกับรายงานการวิจัยของพืชสมุนไพรชนิดอื่นเช่น *Curcuma longa* ซึ่งอยู่ในตระกูล *Curcuma* วงศ์ *Zingiberaceae* เช่นกัน โดยขมิ้นชันมีฤทธิ์กระตุ้นการหายของบาดแผลในสัตว์ทดลอง ทั้งใน excision และ incision wound models มี % excision wound และ tensile strength ดีกว่ากลุ่มควบคุม (Rita *et al.*, 2012) นอกจากนี้ curcumin ยังมีฤทธิ์เพิ่มปริมาณคอลลาเจนและดีเอ็นเอ มีอัตราการหดตัวของแผลเร็วกว่า มี tensile strength เพิ่มขึ้น และมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระในระหว่างกระบวนการรักษาบาดแผลดีกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (Panchatcharam *et al.*, 2006)

งานวิจัยนี้ใช้ Oxoferin<sup>®</sup> หรือ Tetrachlorodecaoxide (TCDO) เป็นตัวเปรียบเทียบกับสารสกัดหยาบด้วยเอธิลอะซิเตทของว่านหมาว้อ เนื่องจากเป็นผลิตภัณฑ์ประเภทสารละลายที่มีจำหน่ายในท้องตลาด Oxoferin<sup>®</sup> มีฤทธิ์กระตุ้น phagocyte ให้ทำลายแบคทีเรีย และแตกตัวให้ oxygen ทำให้เกิดการเร่งเลือดมาเลี้ยง และสร้างเนื้อเยื่อบริเวณแผล จากผลการวิจัยนี้พบว่า สารสกัดหยาบด้วยเอธิลอะซิเตทของว่านหมาว้อมีฤทธิ์กระตุ้นการหายของบาดแผลดีกว่า Oxoferin<sup>®</sup> โดยมีค่าร้อยละของการหายของบาดแผล (% wound healing) มากกว่า โดยเฉพาะสารสกัดที่ความเข้มข้น 0.2% w/v สามารถทำให้แผลปิดสนิทได้ในวันที่ 30 (% wound healing = 100) แต่เป็นที่น่าสังเกตว่าลักษณะการปิดของบาดแผลเมื่อทาด้วยสารสกัด จะพบสะเก็ดแผลเป็นก้อนแข็ง ในขณะที่ Oxoferin<sup>®</sup> มีค่าร้อยละของการหายของแผลน้อยกว่า คือ  $36.92 \pm 2.62$  ในวันที่ 30 แต่ผิวหนังบริเวณบาดแผลจะเรียบ ไม่เป็นแผลนูน เนื่องจาก Oxoferin<sup>®</sup> สามารถเพิ่มหนังกำพร้าที่ถูกทำลาย และทำให้เกิดการสร้างผิวหนังของเนื้อเยื่อ (Malik *et al.*, 1997)

ตัวเปรียบเทียบที่เลือกใช้ในการทดสอบฤทธิ์กระตุ้นการหายของบาดแผลของตำรับครีมที่มีส่วนผสมของสารสกัดด้วยเอทิลอะซิเตทของว่านหมาว้อ คือ ครีม Hirudoid<sup>®</sup> หรือ Heparinoid ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของ Heparin เป็นสารประเภท glycosaminoglycans หรือ mucopolysaccharides ช่วยให้ความชุ่มชื้นกับเซลล์ ช่วยเซลล์ให้เจริญเติบโต และช่วยซ่อมแซมเซลล์ที่บาดเจ็บ จากผลการวิจัยพบว่าตำรับครีมที่มีสารสกัดของว่านหมาว้อมีฤทธิ์กระตุ้นการหายของบาดแผลดีกว่าครีม Hirudoid<sup>®</sup> โดยในวันที่ 30 ตำรับครีมที่มีสารสกัดของว่านหมาว้อ 5% w/w และ 10% w/w มีค่าร้อยละของการหายของบาดแผล เท่ากับ  $66.67 \pm 4.76$  และ  $62.12 \pm 14.61$  ตามลำดับ ในขณะที่ Hirudoid<sup>®</sup> มีค่าร้อยละของการหายของบาดแผลเพียง  $18.33 \pm 11.55$  น้อยกว่าตัวควบคุมคือ cream base (% wound healing =  $32.57 \pm 12.39$ ) ซึ่งการคัดเลือกตัวเปรียบเทียบนี้ อาจไม่เหมาะสม ไม่สามารถเปรียบเทียบฤทธิ์กระตุ้นการหายของบาดแผลได้ เพราะกลไกการออกฤทธิ์ของ Hirudoid<sup>®</sup> คือ ยับยั้งการจับตัวของเกล็ดเลือดในบริเวณหลอดเลือดดำใต้ผิวหนัง ทำให้การไหลเวียนของเลือดในบริเวณที่ทายาดีขึ้น ทำให้อาการปวดในบริเวณที่มีเลือดคั่งเบาบางลง ลดอาการบวม แดง อักเสบ และการดึงตัวของผิวหนังในบริเวณที่ทายา ดังนั้น หากมีการศึกษาวิจัยในครั้งหน้า ควรเลือกตัวเปรียบเทียบที่เหมาะสม มีกลไกการออกฤทธิ์กระตุ้นการหายของบาดแผล เช่น การนำ Oxoferin<sup>®</sup> มาตั้งเป็นตำรับครีมด้วย cream base ซึ่งเป็นตัวควบคุมในการทดลอง

ผลการตรวจชิ้นเนื้อทางจุลกายวิภาคศาสตร์ มีข้อสังเกตว่าเนื้อเยื่อบริเวณบาดแผลที่ใบหูของหนูทดลอง เมื่อทาด้วยสารสกัดหยาบด้วยเอทิลอะซิเตทของว่านหมาว้อ และตำรับครีมที่มีสารสกัดด้วยเอทิลอะซิเตทของว่านหมาว้อ จะพบปริมาณเม็ดเลือดขาวชนิด polymorphonuclear (PMN) ซึ่งเป็นเซลล์ในกระบวนการอักเสบหนาแน่นมากกว่ากลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับตัวเปรียบเทียบ Oxoferin<sup>®</sup> และ Hirudoid<sup>®</sup> และยังคงความหนาแน่นไปจนถึงวันที่ 20 ทั้งนี้ สาเหตุอาจเกิดจากการที่สารทดสอบเป็นสารสกัดหยาบ ยังไม่ได้แยกให้เป็นสารบริสุทธิ์ที่มีเฉพาะสารสำคัญ จึงมีสารอื่นๆ (impurities) ที่อาจรบกวนกลไกการกระตุ้นการหายของบาดแผล โดยกระตุ้นกระบวนการอักเสบ จึงทำให้พบ PMN ที่บริเวณบาดแผลในปริมาณมาก นอกจากนี้ Oxoferin<sup>®</sup> และ Hirudoid<sup>®</sup> (Livaoglu *et al.*, 2010) มีฤทธิ์ในการยับยั้งกระบวนการอักเสบ (Angelika *et al.*, 2000; Tiziana *et al.*, 2012) จึงทำให้พบ PMN น้อยกว่ากลุ่มถูกทาด้วยสารสกัดหยาบด้วยเอทิลอะซิเตทของว่านหมาว้อ และตำรับครีมที่มีสารสกัดด้วยเอทิลอะซิเตทของว่านหมาว้อ ดังนั้น การวิจัยลำดับถัดไปในอนาคต ควรมีการแยกชั้นสารสกัดหยาบเพื่อสกัดแยกให้เป็นสารบริสุทธิ์ เป็นการกำจัดส่วนประกอบอื่นๆ ที่ไม่ใช่สารสำคัญที่อาจเป็นปัจจัยรบกวนกระบวนการหายของบาดแผล