



ผลของการกระตุ้นกระแสไฟฟ้าร่วมกับแสงจากไดโอดเปล่งแสงสีแดง
ต่อการหายของบาดแผลที่ผิวหนัง

**The Effects of the Combination of Electrical Stimulation and Red Light-Emitting
Diode for Wound Healing on Skin**

แมมมอช ชู่อองสกุล

Maemmoth Chuongsakun

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิศวกรรมชีวการแพทย์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of
Master of Science in Biomedical Engineering**

Prince of Songkla University

2561

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์



ผลของการกระตุ้นกระแสไฟฟ้าร่วมกับแสงจากไดโอดเปล่งแสงสีแดง
ต่อการหายของบาดแผลที่ผิวหนัง

**The Effects of the Combination of Electrical Stimulation and Red Light-Emitting
Diode for Wound Healing on Skin**

แมมมอช ชู่องสกุล

Maemmoth Chuongsakun

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิศวกรรมชีวการแพทย์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of
Master of Science in Biomedical Engineering
Prince of Songkla University**

2561

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ ผลของการกระตุ้นกระแสไฟฟ้าร่วมกับแสงจากไดโอดเปล่งแสงสีแดงต่อการหาย
ของบาดแผลที่ผิวหนัง

ผู้เขียน นาย แมมมอธ ชูอ่องสกุล

สาขาวิชา วิศวกรรมชีวการแพทย์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

คณะกรรมการสอบ

.....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุรพงษ์ ชาติพันธุ์)

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นภัสนันท์ เดือนศักดิ์)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.พรชัย พฤษย์ภักทรานนท์)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ปลื้มจิต บุญยพิพัฒน์)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุรพงษ์ ชาติพันธุ์)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยรับนี้เป็นส่วน
หนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิศวกรรมชีวการแพทย์

.....
(ศาสตราจารย์ ดร.ดำรงศักดิ์ ฟ้ารุ่งแสง)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้มาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และได้แสดงความขอบคุณบุคคลที่มีส่วนช่วยเหลือแล้ว

ลงชื่อ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุรพงษ์ ชาติพันธุ์)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลงชื่อ

(นาย แมมมอช ชูอ่องสกุล)

นักศึกษา

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน และ
ไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ

(นาย แมมมอธ ชูอ่องสกุล)

นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์ ผลของการกระตุ้นกระแสไฟฟ้าร่วมกับแสงจากไดโอดเปล่งแสงสีแดงต่อการหาย
ของบาดแผลที่ผิวหนัง

ผู้เขียน นายเมฆมมอช ชูอ่อนสกุล

สาขาวิชา วิศวกรรมชีวการแพทย์

ปีการศึกษา 2561

บทคัดย่อ

การหายของบาดแผลเป็นกระบวนการทางชีวภาพที่ทดแทนหรือซ่อมแซมเนื้อเยื่อที่เกิดความเสียหาย มีการศึกษาเกี่ยวกับการรักษาบาดแผลมากมายทั้งในหลอดทดลองและในสิ่งมีชีวิตที่มีทั้ง การรักษาด้วยยาและการรักษาที่ไม่ใช้ยา ซึ่งการรักษาที่ไม่ใช้ยา เช่น การกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าและการรักษาด้วยแสง ในการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อสร้างเครื่องต้นแบบของอุปกรณ์ที่นำการกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าร่วมกับแสงจากหลอดไดโอดเปล่งแสงสีแดงเพื่อทำการรักษาบาดแผลและเพื่อศึกษาผลของการรักษาพร้อมดังกล่าวในสัตว์ทดลอง อุปกรณ์นี้สามารถสร้างไฟฟ้ากระแสตรงที่ 10 ไมโครแอมแปร์และแสงสีแดงที่มีความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ในการศึกษาที่ใช้หนูวิสตาร์แรทจำนวน 66 ตัว และแบ่งเป็น 4 กลุ่มทดลอง ได้แก่ กลุ่มควบคุม กลุ่มที่รักษาด้วยการกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้า กลุ่มที่รักษาด้วยแสงจากหลอดไดโอดเปล่งแสงสีแดง และกลุ่มที่รักษาด้วยการกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าร่วมกับแสงจากหลอดไดโอดเปล่งแสงสีแดง ซึ่งพื้นที่ของบาดแผลที่เกิดบนหลังของสัตว์ทดลองจะถูกถ่ายรูปและนำมาคำนวณอัตราการหายของบาดแผลโดยใช้โปรแกรมอิมเมจเจ นอกจากนี้ปริมาณของคอลลาเจนและไฟโบรบลาสโกรทแฟกเตอร์จะทำการประเมินในวันที่ 7 14 และ 21 ผลของการศึกษานี้พบว่าอัตราการหายของแผลที่วันที่ 14 ของกลุ่มสัตว์ทดลองที่รักษาด้วยการกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าร่วมกับแสงจากหลอดไดโอดเปล่งแสงสีแดงมีค่า ร้อยละ 60 ในขณะที่กลุ่มอื่นมีค่าน้อยกว่านี้ แต่อย่างไรก็ตามพบว่าหลังวันที่ 16 ของการทดลองอัตราการหายของบาดแผลมีค่าไม่แตกต่างกัน สำหรับผลการย้อมสีเพื่อหาปริมาณของคอลลาเจนและไฟโบรบลาสโกรทแฟกเตอร์ที่วันที่ 7 และ 14 ซึ่งชี้ให้เห็นว่ากลุ่มที่ได้รับการรักษาจะมีความเข้มของสีย้อมที่เข้มกว่ากลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับการรักษา แต่เมื่อครบ 21 วันผลจากการย้อมจะไม่แตกต่างกันมาก ซึ่งสามารถสรุปได้ว่าการใช้การกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าร่วมกับแสงจากหลอดไดโอดเปล่งแสงสีแดงช่วยให้อาการหายเร็วขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับการรักษาเพียงอย่างเดียวอย่างใดอย่างหนึ่ง

คำสำคัญ: การกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้า หลอดไดโอดเปล่งแสง การรักษาตัวของบาดแผล คอลลาเจน ไฟโบรบลาส

Thesis Title	The effects of the combination of electrical stimulation and red light-emitting diode for wound healing on skin
Author	Mr. Maemmoth Chuongsakun
Major Program	Biomedical Engineering
Academic Year	2018

Abstract

Wound healing is a biological process which replaces or repairs the tissue damage. Many treatments to induce wound healing have been studied both *in vitro* and *in vivo* such as pharmacological treatments and non-pharmacological treatments. Electrical stimulation and photo therapy are considered as non-pharmacological treatments. The objectives of this study are to fabricate a prototype of an instrument that combines an electrical stimulation and photo therapy using red light-emitting diode (LED) for wound healing and to investigate the effects of this combination treatment in the animal model. The electrical stimulator can generate 10 μ A direct current and it can also generate red light with 660 nm in wave length. In this study, there were 66 Wistar rats divided in 4 groups; control group, electrical stimulation group, light emitting diode group and electrical stimulation combined with light emitting diode group. Wound area on dorsal skin was photographed and calculated for wound healing rate using ImageJ. Furthermore, the amount of collagen and fibroblast growth factor was evaluated on day-7, 14 and 21. Results of this study showed that the wound healing rate at day-14 in a treatment group with electrical stimulation combined with red LED was 60% whereas that in other groups was lesser. However, after 16 days, there was no difference in wound healing rate. From staining results, it support that the treatment groups had better healing rate at day-7 and day-14 when compared with the control group because the color intensity relate to the amount of collagen and fibroblast growth factor were higher. However, there was not much different at day-21 among these groups. It can conclude that the combination of electrical stimulation and red LED provided faster wound healing rate during 10 days after wound occurrence compared with a single treatment as a result of an increase of collagen and fibroblast forming.

Keyword: Electrical stimulation, Light emitting diode, Wound healing, Collagen, Fibroblast

กิตติกรรมประกาศ

ขอแสดงความขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุรพงษ์ ชาติพันธุ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ให้การสนับสนุน ระยะเวลาคอยให้คำปรึกษาแนะนำความรู้ในด้านการดำเนินงานวิจัย ข้อมูล เอกสารต่างๆ เป็นอย่างดี รวมทั้งคอยขัดเกลากระบวนการคิดแก้ปัญหาและให้กำลังใจตลอดจนตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้ดำเนินไปอย่างสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นภัสนันท์ เดือนศักดิ์ คณะแพทยศาสตร์ สาขาวิชาสรีรวิทยา มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ที่ได้ระยะเวลาในการเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.พรชัย พุกภัยภัทรานนต์ คณะวิศวกรรมศาสตร์ ภาควิชาวิศวกรรมไฟฟ้า มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ ที่ได้ให้คำแนะนำและระยะเวลาในการเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ปลื้มจิต บุญยพิพัฒน์ คณะแพทยศาสตร์ ภาควิชาพยาธิวิทยา มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ ที่ได้ให้คำแนะนำและระยะเวลาในการเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ ดร.อาทิตยา สุขเกษม ที่คอยให้คำปรึกษาและคำแนะนำในการทำงานวิจัย รวมทั้งให้ความช่วยเหลือเรื่องข้อมูลและการค้นหาคำตอบ

ขอขอบพระคุณ พี่ๆเพื่อนๆ และน้องๆ ในสถาบันวิศวกรรมชีวการแพทย์ทุกคน ที่ให้คำปรึกษาคำแนะนำรวมถึงกำลังใจในการทำงานวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ น้อง ที่คอยเป็นกำลังใจและสนับสนุนทั้งด้านทุนทรัพย์และความช่วยเหลือในทุกๆด้าน ทั้งคำแนะนำระหว่างเรียนและกำลังใจระหว่างทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้

แมมมอธ ชูอ่องสกุล

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(8)
รายการตาราง	(9)
รายการภาพประกอบ	(10)
บทที่	
1. บทนำ	
1.1 ความสำคัญและที่มาของ โครงการวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์	3
1.3 ทบทวนวรรณกรรม	4
1.3.1 การรักษาตัวของบาดแผลบริเวณผิวหนัง	4
1.3.2 การทบทวนวรรณกรรมการกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้า	6
1.3.3 การทบทวนวรรณกรรมการกระตุ้นด้วยแสง	8
1.3.4 การตรวจสอบการรักษาตัวของบาดแผล	10
1.4 ขอบเขตของงานวิจัย	10
1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับ	11
2. วิธีการดำเนินงานวิจัย	
2.1 การคำนวณประชากรกลุ่มตัวอย่าง	13
2.2 การออกแบบและสร้างเครื่องกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าและ เครื่องกระตุ้นด้วยแสง	16
2.3 การทดลองในสัตว์ทดลองและการติดตามผล	19
2.4 การตรวจสอบอัตราการหายของบาดแผลจากรูปภาพ	22
2.5 การตรวจสอบปริมาณโปรตีนที่สนใจจากชิ้นเนื้อบริเวณบาดแผล	24
2.6 การวิเคราะห์ทางสถิติในแต่ละกลุ่มการทดลอง	25

สารบัญ(ต่อ)

	หน้า
3.ผลการศึกษา	
3.1 เครื่องกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าและเครื่องกระตุ้นด้วยแสง	26
3.1.1 เครื่องกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้า	26
3.1.2 เครื่องกระตุ้นด้วยแสงสีแดงจากหลอดแอลอีดี (LED)	26
3.2 อัตราการหายของบาดแผล	30
3.3 ผลจากการย้อมด้วย Hematoxylin and Eosin (H&E)	33
3.4 ผลจากการย้อมด้วย Masson's trichrome	40
3.5 ผลการศึกษาทางอิมมูโนฮิสโตเคมี (Immunohistochemistry)	43
4.วิจารณ์ผลการศึกษา	
4.1 การหายของบาดแผลเมื่อใช้เครื่องกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าและ เครื่องกระตุ้นด้วยแสง	47
4.2 ผลการคำนวณพื้นที่บาดแผลจากภาพดิจิทัล	48
4.3 ผลจากการย้อมด้วย Hematoxylin and eosin	49
4.4 ผลจากการย้อมด้วย Masson's trichrome	50
4.5 ผลจากการย้อมด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี	51
5.บทสรุป	
5.1 ผลสรุป	52
5.2 ข้อเสนอแนะสำหรับงานในอนาคต	53
บรรณานุกรม	54
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก อุปกรณ์การวิจัย	57
ภาคผนวก ข ภาพสไลด์จากการย้อม	60
ภาคผนวก ค Proceeding	65
ประวัติผู้เขียน	73

รายการตาราง

ตาราง	หน้า
3.1 ค่าความต่างศักย์และกระแสจากเครื่องกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้า	27

รายการภาพประกอบ

ภาพประกอบ	หน้า
1.1 จำนวนร้อยละและชนิดของบาดแผล	2
1.2 มูลค่าทางการตลาดของวัสดุและผลิตภัณฑ์ที่ใช้ในการรักษาบาดแผล	2
1.3 แสดงระยะเวลาการหายทั่วไปของบาดแผลแต่ละระยะ	4
1.4 แสดงระยะเวลาการหายทั่วไปของบาดแผลและกระบวนการ	5
1.5 กระบวนการทางประจุ (Ion)ของเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการหายของบาดแผล	7
1.6 โมเดลของคารู (KARU 's model)	9
2.1 การใช้โปรแกรม G-Power ในการหาจำนวนสัตว์ทดลองระหว่าง กลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ใช้กระแสไฟฟ้ากระตุ้น	13
2.2 การใช้โปรแกรม G-Power ในการหาจำนวนสัตว์ทดลองระหว่าง กลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ใช้ แสงในการรักษา	14
2.3 จำนวนสัตว์ทดลองและกลุ่มการทดลอง	15
2.4 เครื่องกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าที่ประดิษฐ์ขึ้น โดยมีส่วนประกอบ ของเครื่องกระตุ้น	16
2.5 ลักษณะสัญญาณจากเครื่องกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าเป็น biphasic	17
2.6 เครื่องกระตุ้นด้วยแสงจากไดโอดเปล่งแสงสีแดง ที่ประดิษฐ์ขึ้น	18
2.7 การวัดพลังงานแสงที่ออกมาจากหลอดไดโอด	18
2.8 แผลบริเวณหลังของสัตว์ทดลองขนาด 8 มิลลิเมตร	19
2.9 การกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้า	20
2.10 การกระตุ้นด้วยแสงจากไดโอดเปล่งแสง	21
2.11 การกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าร่วมกับแสงจากไดโอดเปล่งแสง	21
2.12 แผนภาพแสดงกระบวนการกระตุ้นและระยะเวลาในการทดลอง กับสัตว์ทดลอง	21
2.13 ภาพบาดแผลที่ถูกถ่ายด้วยกล้องดิจิทัลเพื่อนำไปวัดขนาดพื้นที่ของบาดแผล	23
2.14 ภาพจากการวัดขนาดพื้นที่บาดแผลหลังจากการปรับค่า threshold	23
2.15 ชิ้นเนื้อที่ตัดและแช่ใน 10 % neutral buffered formalin	24

รายการภาพประกอบ(ต่อ)

ภาพประกอบ	หน้า
2.16 ภาพจากสไลด์ที่ย้อมด้วย (a) Hematoxylin & Eosin (b) Masson's trichrome และ (c) Fibroblast growth factor (FGF,ab8880,Abcam)	25
3.1 เครื่องกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าโดยสามารถวัดค่ากระแสได้ในช่วง 1-100 μ A	27
3.2 เครื่องกระตุ้นด้วยแสงสีแดงจากหลอดไดโอดเปล่งแสง	28
3.3 ค่าความยาวคลื่นของหลอดไดโอดเปล่งแสงสีแดงมีค่า 660 nm	28
3.4 (A) ตำแหน่งในการวัดพลังงานจากเครื่องกระตุ้นด้วยแสง และ (B) กราฟแสดงค่าพลังงานของแต่ละตำแหน่งของเครื่องกระตุ้นด้วยแสง	29
3.5 ภาพบาดแผลของหนูแต่ละกลุ่มการทดลอง ณ วันแรก วันที่ 7 14 และ 21	31
3.6 กราฟแสดงอัตราการหายของบาดแผลในแต่ละกลุ่มการทดลอง	32
3.7 ตัวอย่างผลการย้อม Hematoxylin & Eosin ในกลุ่มทดลอง 7 วัน	34
3.8 ตัวอย่างผลการย้อม Hematoxylin & Eosin ในกลุ่มทดลอง 14 วัน	36
3.9 ตัวอย่างผลการย้อม Hematoxylin & Eosin ในกลุ่มทดลอง 21 วัน	38
3.10 ตัวอย่างภาพชิ้นเนื้อที่ย้อมด้วย Masson's trichrome ณ วันที่ 7 14 และ 21	40
3.11 ขั้นตอนการใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำหรับหาค่าปริมาณคอลลาเจนจากภาพดิจิทัลของชิ้นเนื้อที่ผ่านการย้อม Masson's trichrome	41
3.12 ผลการตรวจสอบปริมาณของคอลลาเจน โดยใช้โปรแกรมวัดค่าความเข้มของสีจากการย้อมด้วย Masson's trichrome	42
3.13 ตัวอย่างภาพชิ้นเนื้อที่ย้อมทางอิมมูโนฮิสโตเคมี (Immunohistochemistry)	44
3.14 ขั้นตอนการหาปริมาณไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์โดยการนับจำนวนเซลล์ไฟโบรบลาสต์ด้วยโปรแกรม ImageJ ด้วยการย้อมทางอิมมูโนฮิสโตเคมี (Immunohistochemistry)	45
3.15 จำนวนเซลล์ไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์ที่นับด้วยโปรแกรม ImageJ ในกลุ่มการทดลองแต่ละกลุ่มเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม	46

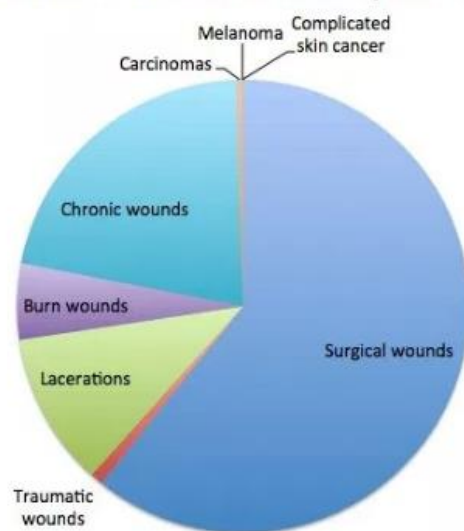
บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของโครงการวิจัย

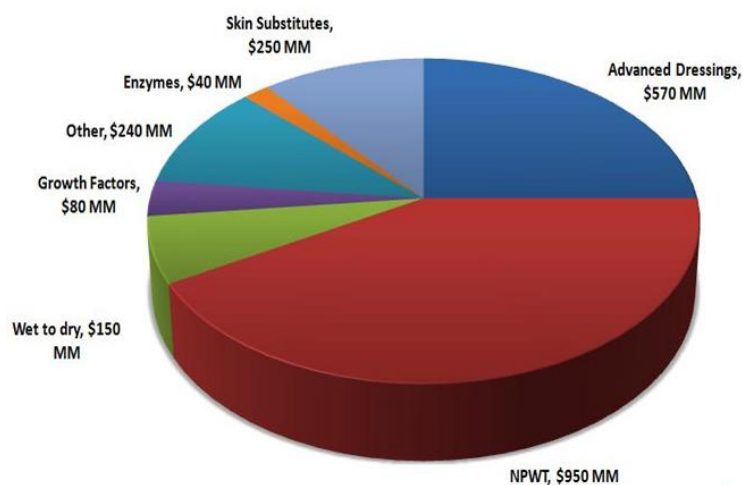
บาดแผลบนร่างกายเกิดขึ้นเมื่อได้รับการกระทบ เสียคลี โคนของมีคม เป็นโรค หรือ เกิดความเสียหายที่รุนแรงบริเวณผิวหนังกำพว้า ในกรณีบาดแผลเป็นแคร์รอยขีดข่วน บาดแผลสามารถรักษาหายได้ในเวลาที่รวดเร็ว แต่เมื่อใดที่บาดแผลเป็นบาดแผลใหญ่ มีความรุนแรง จะยากต่อการหายตามธรรมชาติหรือใช้เวลาในการฟื้นฟูนาน บาดแผลมีทั้งแบบติดเชื้อและไม่ติดเชื้อ (1) อีกทั้งยังแตกต่างด้วยลักษณะการเกิดบาดแผล เช่น ในกรณีโดนมีดบาดบาดแผลมีลักษณะเป็นแผลตัด หากโดนชนบาดแผลจะเป็นรอยข้ำ เมื่อเกิดบาดแผลที่ลึกลงไปมากกว่าผิวหนังชั้นหนังแท้ จะต้องมีการดูแลรักษาที่มากขึ้นและมีผลต่อการการใช้ชีวิตอย่างมาก ต้องใช้เวลาในการรักษาบาดแผลนาน จนกว่าเนื้อเยื่อจะมีการสร้าง โปรตีนและคอลลาเจน ขึ้นมาทดแทนเนื้อเยื่อเดิม หากบาดแผลเกิดการติดเชื้อและใช้เวลาหายนาน จะทำให้เสียค่าใช้จ่ายในการป้องกันไม่ให้บาดแผลติดเชื้อและค่าใช้จ่ายเกี่ยวกับยาเพื่อให้บาดแผลหายเร็วขึ้น ดังนั้นการที่บาดแผลหายเร็วจะช่วยลดระยะเวลาของสิ่งต่างๆ ที่กล่าวมาแล้วได้เพื่อให้ผู้มีบาดแผลใช้ชีวิตเป็นปกติได้เร็วที่สุด (2) ในประเทศไทยยังไม่มี การจัดทำสถิติเรื่องของการเกิดบาดแผลและจำนวนเงินที่ใช้รักษา แต่ในประเทศสหรัฐอเมริกาเรื่องของบาดแผลถือว่าเป็นเรื่องที่สำคัญ โดยโรคที่เกี่ยวกับบาดแผลคิดเป็น 2% จากโรคทั้งหมดและมีหลายชนิดด้วยกัน เช่น บาดแผลทั่วไปที่สามารถเกิดขึ้นได้จากการใช้ชีวิตประจำวัน (Traumatic wound) หรือบาดแผลชนิดเรื้อรัง (Chronic) ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์สูงมากรองจากบาดแผลจากการผ่าตัด (3) ดังแสดงในรูปที่ 1.1 และจากรูปที่ 1.2 แสดงให้เห็นว่ามูลค่าการตลาดของวัสดุผลิตภัณฑ์ที่ใช้ในการรักษาบาดแผลมีสูงถึง 2.3 พันล้านเหรียญสหรัฐ (4)

Share of Global Wound Prevalence By Wound Type



รูปที่ 1.1 จำนวนร้อยละและชนิดของบาดแผล (3)

\$2.3 Billion Market



รูปที่ 1.2 มูลค่าทางการตลาดของวัสดุและผลิตภัณฑ์ที่ใช้ในการรักษาบาดแผล (4)

มีการศึกษาเกี่ยวกับการนำกระแสไฟฟ้ามากระตุ้นบาดแผลที่เป็นแผลเบาหวานทั้งในสัตว์ทดลองและผู้ป่วย พบว่าการกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าสามารถช่วยให้บาดแผลหายได้เร็วขึ้น ซึ่งเป็นการลดระยะเวลาในการรักษาได้ดียิ่งเนื่องจากกระแสไฟฟ้ามีผลต่อการจัดเรียงตัวของเซลล์ ทำให้เซลล์มีความเป็นระเบียบมากขึ้นจึงช่วยให้ง่ายต่อการรักษาตัวของบาดแผล และไม่มีผลในแง่ลบมากอีกด้วย (5–9) นอกจากนี้มีการศึกษาเพิ่มเติมพบว่าแสง เช่น แสงเลเซอร์พลังงานต่ำและแสงจากหลอดแอลอีดี (LED) สามารถช่วยการกระตุ้นสารเคมีภายในเซลล์ (10–13) ทำให้เกิดการหลั่งสารที่ช่วยในการสร้างคอลลาเจนให้เร็วยิ่งขึ้นส่งผลให้บาดแผลหายเร็วยิ่งขึ้น จากเหตุผลที่กล่าวมาข้างต้นทั้งการกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าหรือแสงมีผลในการช่วยรักษาตัวของบาดแผลให้หายเร็วขึ้น นอกจากนี้มีรายงานการศึกษาที่ทำการทดลองแบบใช้การกระตุ้นบาดแผลโดยการนำหลายวิธีมาใช้ร่วมกันในการรักษาบาดแผล เช่น การนำแสงจากหลอด LED ใช้ร่วมกับผ้าปิดแผลชนิด semipermeable และการใช้คลื่นอัลตราซาวด์ร่วมกับผ้าปิดแผลชนิด semipermeable (14) การนำกระแสไฟฟ้ามากระตุ้นร่วมกับความร้อนเพื่อดูการรักษาตัวของแผล (10) หรือการใช้พลังงานความร้อนร่วมกับการกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้า (13) เป็นต้น อย่างไรก็ตามปัจจุบันยังไม่มีผลการกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้ามาใช้ร่วมกับการกระตุ้นด้วยแสงในการรักษาบาดแผล ดังนั้นการนำกระบวนการทั้งการกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าและแสงมาใช้ในการรักษาร่วมกันจึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจซึ่งการใช้วิธีการทั้งสองร่วมกันมีความเป็นไปได้ในการช่วยลดระยะเวลาในการรักษาตัวของบาดแผลให้รวดเร็วยิ่งขึ้น

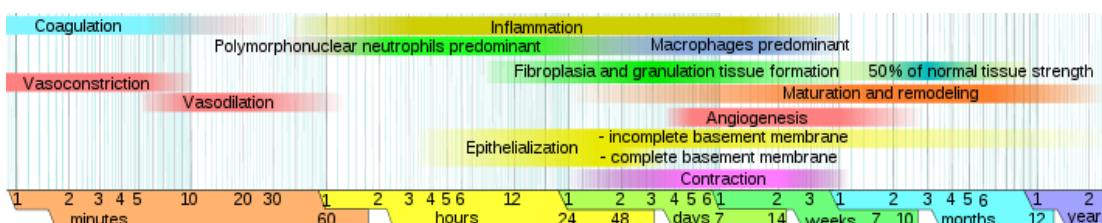
1.2 วัตถุประสงค์

- 1.2.1 เพื่อประดิษฐ์เครื่องต้นแบบของการรักษาบาดแผลโดยการกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าร่วมกับการกระตุ้นด้วยแสงในสัตว์ทดลองที่สามารถนำไปใช้เป็นพื้นฐานสำหรับการทำเครื่องที่ใช้กับผู้ป่วยได้
- 1.2.2 เพื่อศึกษาผลของการใช้งานร่วมกันระหว่างการกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าและการกระตุ้นด้วยแสงต่อการหายของบาดแผลเมื่อเปรียบเทียบกับแผลที่หายตามธรรมชาติ

1.3 ทบทวนวรรณกรรม

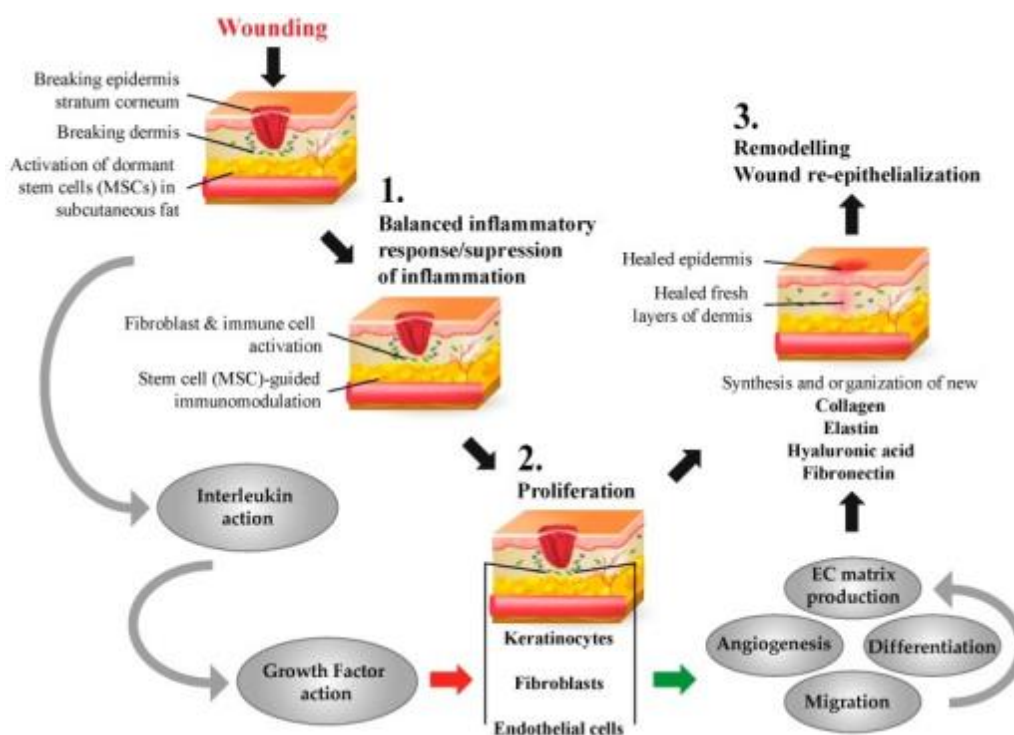
1.3.1 การรักษาตัวของบาดแผลบริเวณผิวหนัง

เมื่อเกิดบาดแผลบริเวณผิวหนัง จะทำให้เกิดเลือดออกบริเวณผิวหนังโดยในระยะเริ่มแรกของกระบวนการรักษาตัวของบาดแผลเป็นระยะการห้ามเลือด (Hemostasis) จะมีเกล็ดเลือดมาจับบริเวณที่เกิดการบาดเจ็บและเริ่มทำการแข็งตัวของบริเวณส่วนที่ได้รับการบาดเจ็บเพื่อไม่ให้เลือดไหลมากจนเกินไป (1,2) หลังจากระยะนี้จะเข้าสู่ระยะการอักเสบ (Inflammation) โดยระยะนี้จะทำการชะล้างส่วนของเซลล์ที่ได้รับความเสียหายออกไปรวมทั้งแบคทีเรียและเชื้อโรคอื่น ๆ อีกด้วยซึ่งมีเม็ดเลือดขาวเป็นตัวช่วยจับกิน เรียกว่ากระบวนการ Phagocytosis หลังจากนั้นจะมีการกระตุ้นให้ร่างกายเริ่มทำการสร้างและแบ่งตัวของเซลล์บริเวณผิวหนัง ถัดมาจะเป็นระยะการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อใหม่ (Proliferation) ในระยะนี้จะเกิดกระบวนการสร้างหลอดเลือดใหม่ (Angiogenesis) และมีการสะสมตัวของคอลลาเจนพร้อมกับการสร้างเนื้อเยื่อ เช่น เยื่อบุผิวและบาดแผลยังมีการหดตัวของเนื้อเยื่อด้วยเช่นกัน และเนื่องจากมีกระบวนการสร้างหลอดเลือดใหม่จึงส่งผลให้ระยะนี้เกิดการสร้างตัวของหลอดเลือดและเซลล์สร้างเส้นใย (Fibroblast) เมื่อมีการสร้างเนื้อเยื่อบุผิว (3) เกิดขึ้นในระยะนี้ก็จะส่งผลต่อการกระจายตัวของเนื้อเยื่อเพื่อทำการรักษาตัวของบาดแผล ดังนั้นเมื่อเข้าสู่ระยะนี้ จะทำให้เกิดการตายของเซลล์ (Apoptosis) (3) ลดน้อยลงทำให้บาดแผลเริ่มต้นการหายได้รวดเร็ว ระยะสุดท้ายคือ การจัดเรียงตัวของเซลล์ (Remodeling) จะมีการจัดเรียงตัวของคอลลาเจนใต้ผิวหนังเพื่อให้ผิวหนังกลับเป็นปกติ ซึ่งแต่ละระยะจะช้าหรือเร็วขึ้นอยู่กับลักษณะของบาดแผลว่าคิดเชื่อหรือเรื้อรังหรือไม่ และขึ้นอยู่กับอายุของผู้ป่วยอีกด้วย (4)



รูปที่ 1.3 แสดงระยะเวลาการหายทั่วไปของบาดแผลในแต่ละระยะ (15)

กระบวนการหายของบาดแผลในช่วงระยะการอักเสบ (Inflammation) จะมีกระบวนการกระตุ้นการสร้างเซลล์ไฟโบรบลาสต์ และระบบภูมิคุ้มกันต่าง ๆ ทำให้เกิดการรักษาตัวของบาดแผลนอกจากนั้นเข้าสู่ระยะที่สองของการรักษาบาดแผลจะมีการกระตุ้นสารธรรมชาติที่เซลล์ใช้สื่อสารกัน (Growth factor) เพื่อทำให้เกิดการรักษาตัวมากขึ้น หลังจากนั้นจะเข้าสู่ระยะการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อใหม่ (Proliferation) ซึ่งระยะนี้จะเกิดการสร้างเซลล์สร้างเส้นใย และเนื้อเยื่อบุโพรง (Endothelium) เพื่อทำให้เกิดการสร้างผิวหนังขึ้นมาใหม่อีกครั้ง สำหรับในระยะถัดมาคือ การจัดเรียงตัวของเซลล์ใหม่ (Remodeling) จะเกิดกระบวนการหลัก ๆ คือ การเกิดขึ้นของคอลลาเจน อิลาสติน และไฟโบรเนคตินต่าง ๆ ทำให้ผิวหนังรักษาตัวได้สมบูรณ์มากขึ้นและแข็งแรงเทียบเท่าก่อนการเกิดบาดแผลดังรูปที่ 1.4

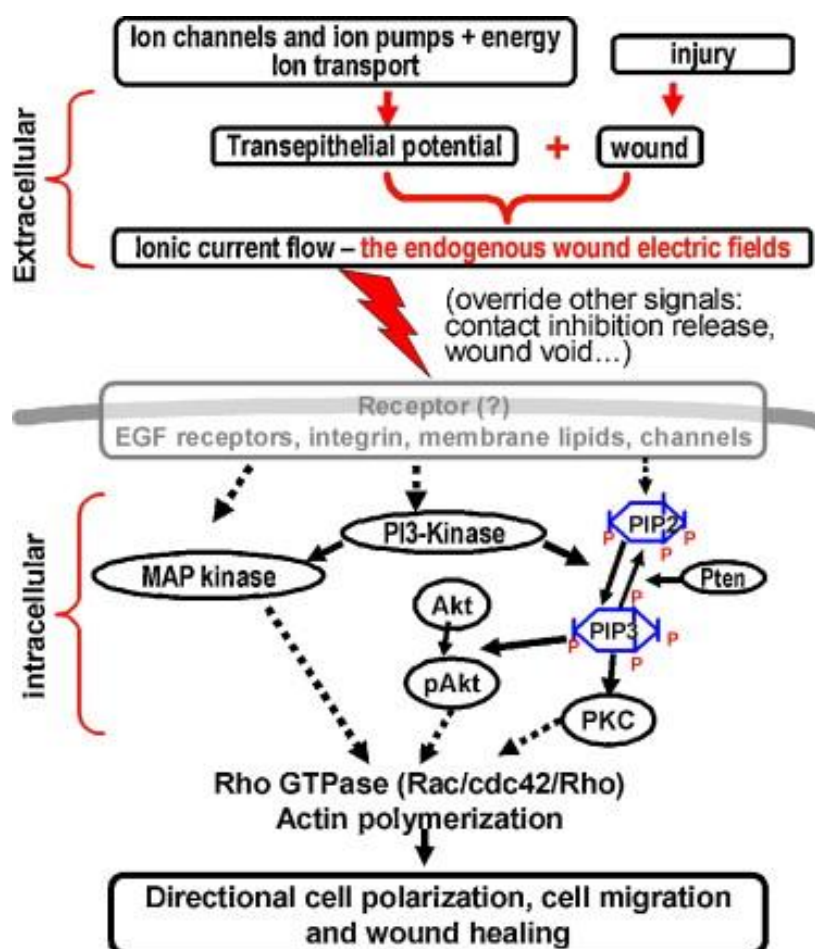


รูปที่ 1.4 แสดงระยะเวลาการหายทั่วไปของบาดแผลและกระบวนการ (16)

1.3.2 การรักษาบาดแผลด้วยการกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้า

การกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าในปัจจุบันมีด้วยกันหลากหลายวิธี เช่น การทดสอบความสามารถเกี่ยวกับการหายของบาดแผลโดยปรับค่าของกระแสไฟฟ้าตั้งในงานวิจัย (17,18) ที่แสดงให้เห็นว่ามีความต่างของค่ากระแสไฟฟ้าสามารถรักษาบาดแผลให้หายได้ นอกจากนี้มีงานวิจัยใช้กระแสไฟฟ้าชนิดไฟฟ้ากระแสตรงปรับค่ากระแส 40mA พบว่าส่งผลต่อการหายของบาดแผลอย่างมีนัยสำคัญ (6,19) พารามิเตอร์ที่นิยมปรับใช้ต่อมาคือค่าของความต่างศักย์ ซึ่งจากงานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่าค่าความต่างศักย์มีผลต่อระยะเวลาการหายของบาดแผล (6,20) ทั้งนี้การกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้านั้นมีหลากหลายลักษณะทั้งไฟฟ้ากระแสตรง ไฟฟ้ากระแสสลับ และความต่างศักย์ไฟฟ้า นอกจากนี้ชนิดของกระแสไฟฟ้าที่มีส่วนสำคัญต่อการกระตุ้นโดยใช้รักษาบาดแผลแล้ว พารามิเตอร์ที่สำคัญในการรักษาบาดแผลด้วยการกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้า ยังมีเรื่องของความถี่และระยะเวลาในการกระตุ้นอีกด้วย (6,18,19)

การกระตุ้นบาดแผลด้วยกระแสไฟฟ้านั้นถือเป็นการรักษาอย่างหนึ่งในปัจจุบัน โดยหลักการของการกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้ามักเกี่ยวข้องกับการปลดปล่อยกระแสไฟฟ้าสู่ผิวหนัง โดยกระแสไฟฟ้าจะลงลึกไปยังภายใต้ผิวหนัง และทำการกระตุ้นระบบการรักษาตัวของบาดแผลบริเวณผิวหนัง และเนื่องจากเซลล์ภายในร่างกายของมนุษย์มีส่วนเกี่ยวข้องกับกลไกเคมีไฟฟ้า ดังนั้นกระแสไฟฟ้าจึงสามารถเพิ่มอัตราการหายของบาดแผลได้ด้วยการเพิ่มจำนวนเซลล์ ทั้งเซลล์ผิวหนัง เซลล์ประสาท และเซลล์หลอดเลือด นอกจากนี้ยังส่งผลต่อเม็ดเลือดขาว การสร้างและสลายตัวของเซลล์ที่ตาย ช่วยลดกระบวนการติดเชื้อและเพิ่มการขนส่งสารอาหารในระบบเลือด (5, 6,10) โดยกระบวนการต่าง ๆ นี้ประกอบด้วย กระแสไฟฟ้ามีผลต่อการสร้างโปรตีนของเซลล์ โดยการเพิ่มกระบวนการทำงานของเซลล์ นอกจากนี้ยังส่งผลต่อของกระบวนการสร้างดีเอ็นเอ (DNA) และเนื่องจากการส่งผลต่อ ปริมาณประจุ (Ion) ภายในเซลล์ก็เป็นสาเหตุที่ส่งผลต่อกระบวนการหายของบาดแผลเนื่องจากการเพิ่มขึ้นของปริมาณประจุ ส่งผลต่อระบบการตอบสนองภายในเซลล์ดังรูปที่ 1.5 ทำให้เกิดการเพิ่มจำนวนของเซลล์บริเวณที่เกิดบาดแผลทำให้อัตราการรักษาตัวของบาดแผลเกิดขึ้นได้รวดเร็วกว่าปกติเมื่อมีการใช้กระแสไฟฟ้าไปกระตุ้นบริเวณบาดแผล



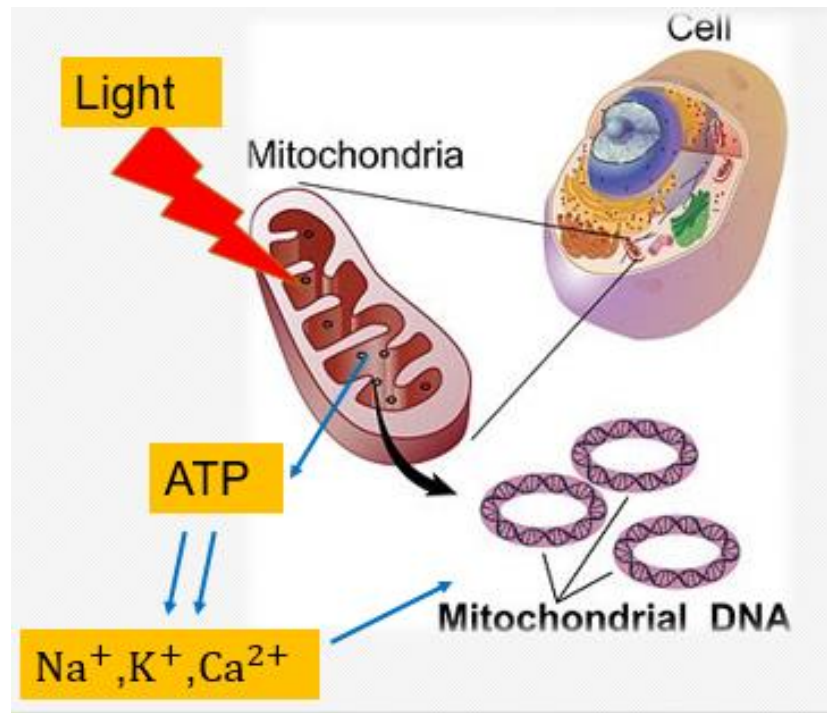
รูปที่ 1.5 กระบวนการทางประจุ (Ion) ของเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการหายของบาดแผล (21)

1.3.3 การรักษาบาดแผลด้วยการกระตุ้นด้วยแสง

การกระตุ้นด้วยแสงมีพารามิเตอร์ที่สำคัญหลายพารามิเตอร์ด้วยกัน จากการทบทวนวรรณกรรมพบว่าค่าของความยาวคลื่น และพลังงานต่อพื้นที่จะมีผลต่อการหายของบาดแผล (22,23) โดยความยาวคลื่นที่มีผลต่อการหายของบาดแผลบริเวณผิวหนังนั้นจะมีค่าอยู่ในช่วงความยาวคลื่นประมาณ 600 ถึง 700 นาโนเมตร ซึ่งแสงในช่วงความยาวคลื่นนี้เป็นแสงสีแดงโดยมีผลต่อตัวรับแสงภายในเซลล์บริเวณผิวหนังดีที่สุด (7) และจากงานวิจัยนี้ยังบ่งบอกเรื่องของเวลาในการกระตุ้นอีกด้วยว่าเวลาที่เหมาะกับวัฏจักรของการรักษาตัวของบาดแผลนั้นสำคัญกว่าการรักษาด้วยการกระตุ้นนาน ๆ

นอกจากนี้ในการทบทวนวรรณกรรมเพื่อให้ทราบถึงความสำคัญของลักษณะสีของแสงจากหลอดไฟโอดเปล่งแสงเพราะสังเกตเห็นว่าแสงมีหลายสีหลายความยาวคลื่น ดังนั้นอาจมีแสงสีอื่นที่ส่งผลต่อการหายของบาดแผลมากกว่าแสงสีแดง และจากงานวิจัยของ Li et al. (7) พบว่าแสงสีต่างกันออกไปมีผลต่อบาดแผลต่างกันตามตัวรับแสงภายในเซลล์ (Chromophore) และเนื่องจากแสงสีแดงมีตัวรับที่บริเวณผิวหนังมากจึงทำให้ส่งผลในการหายของบาดแผลบริเวณผิวหนังได้ดีกว่าแสงสีอื่นและนอกจากนี้แสงสีแดงยังมีส่วนช่วยเพิ่มการสร้าง Epidermal Growth Factor และ Fibroblast Growth Factor ซึ่งถือว่าเป็นตัวบ่งชี้ที่สำคัญในการรักษาตัวของบาดแผลว่าเกิดขึ้นมากน้อยเพียงใด

ดังนั้นขั้นตอนการกระตุ้นการหายของบาดแผลด้วยแสงมีกระบวนการหลัก ๆ ดังรูปที่ 1.5 เกิดขึ้นโดยเริ่มจากเมื่อมีการปลดปล่อยแสงไปยังบริเวณบาดแผลจะส่งผลไปยังภายในเซลล์และเข้าไปสู่ไมโทคอนเดรีย (Mitochondria) โดยภายในไมโทคอนเดรียของแต่ละเซลล์จะมีโคโมฟอร์ตต่าง ๆ คอยรับแสงทำให้เกิดกระบวนการต่าง ๆ ภายในเซลล์ซึ่งในเซลล์บริเวณผิวหนังมีโคโมฟอร์ตที่รับแสงสีแดง(7,12,22) ทำให้แสงสีแดงสามารถกระตุ้นการหายของบาดแผลได้ หลังจากได้รับการกระตุ้นจากแสงสีแดงแล้วจะเกิดการแปลงค่าความยาวคลื่นแสงเป็นสัญญาณ และส่งผลให้เซลล์เริ่มทำงานตามความยาวคลื่นที่รับ โดยบริเวณผิวหนังเมื่อเซลล์รับการกระตุ้นจากแสงสีแดงทำให้เกิดกระบวนการเพิ่มขึ้นของอะดีโนซีนไตรฟอสเฟต (ATP) ภายในเซลล์ส่งผลต่อการปลดปล่อยประจุ ทำให้เกิดการรักษาตัวของบาดแผลเพิ่มมากขึ้นเนื่องจากการกระตุ้นเพิ่มการทำงานของระบบการรักษาตัวภายในร่างกาย อีกทั้งยังเพิ่มกระบวนการเพิ่มจำนวนของเซลล์ (Cell proliferation) เพิ่มการสร้างหลอดเลือดและเซลล์ผิวหนังอีกด้วย (7-9) เนื่องมาจากกระบวนการดังแสดงในรูปที่ 1.5 ทำให้เกิดการกระตุ้นบาดแผลให้เร่งการรักษาตัวและเริ่มทำการสร้างส่วนที่จำเป็นในการหายของบาดแผลเนื่องจากการส่งผ่านการกระตุ้นไปยังเซลล์ที่ทำงานอยู่ภายใต้ผิวหนัง



รูปที่ 1.6 โมเดลของคารู (KARU 's model) (9)

1.3.4 การตรวจสอบการรักษาตัวของบาดแผล

ในการตรวจสอบสภาพของบาดแผลสามารถดำเนินการได้โดยการหาพื้นที่การหายของบาดแผล เพื่อนำข้อมูลมาใช้ในการคำนวณอัตราการหายของบาดแผล ในปัจจุบันมีวิธีการใช้โปรแกรมหาพื้นที่ของวัตถุในภาพคือ โปรแกรม ImageJ (7,20) หรือการวัดพื้นที่บาดแผลด้วยการใช้กระดาษโปร่งใสทาบบาดแผลแล้วคำนวณพื้นที่ของบาดแผล (24) แต่เนื่องด้วยการทาบบาดแผลใส่นั้นยังมีความผิดพลาดอยู่มาก สำหรับการใส่โปรแกรม ImageJ บางครั้งยากในการปรับค่าของเทรชโฮลด์ (Threshold) ของภาพเพราะความไม่เสถียรมากนัก เนื่องจากขึ้นอยู่กับผู้ใช้เป็นส่วนใหญ่ ทำให้บางครั้งพื้นที่ของบาดแผลที่ได้จะมีความแตกต่างกัน และในปัจจุบันก็มีอัลกอริทึมบางตัวที่สามารถนำมาปรับใช้เพื่อหาขนาดของบาดแผลได้โดยค่าของพื้นที่ที่ได้นั้นจะคงที่เสมอเนื่องจากตัวโปรแกรมจะคำนวณค่า เทรชโฮลด์ ได้เท่ากันทุกครั้งต่างจากการใช้ ImageJ ทำให้การใช้ อัลกอริทึมนี้มีข้อแตกต่างในการคำนวณหาพื้นที่ที่จะมีค่าเสถียรกว่า ImageJ นอกจากนี้ยังมีวิธีตรวจ ขึ้นเนื้อด้วยการย้อมทางวิทยาศาสตร์ โดยวิธีการย้อมทำให้สามารถดูพารามิเตอร์ได้หลากหลาย เช่น คุปริมาตรของคอลลาเจนของขึ้นเนื้อเพราะเมื่อบาดแผลหายได้รวดเร็วปริมาณของคอลลาเจนจะมีมากกว่าบาดแผลที่ใช้ระยะเวลาในการหาย นอกจากนี้การย้อมสีขึ้นเนื้อยังสามารถทราบถึง สารธรรมชาติที่เซลล์ใช้สื่อสารกันที่เรียกว่า Growth factor ต่าง ๆ ภายในขึ้นเนื้อเพื่อยืนยันอัตรา ความเข้มข้นของ Growth factor ภายในช่วงเวลาต่าง ๆ และเห็นแนวโน้มในการรักษาตัวของ บาดแผล เช่น การย้อมสีและตรวจวัด Epidermal Growth Factor และ Fibroblast Growth Factor (7) และการย้อมสียังทำให้ทราบความเข้มข้นของตัวบ่งชี้เม็ดเลือดขาว (Macrophage maker) ซึ่งบ่งบอก ถึงระยะการหายของบาดแผลได้อีกด้วย ดังนั้นการตรวจผลด้วยการย้อมสีในปัจจุบันจึงสามารถ ระบุถึงตัวบ่งชี้ต่าง ๆ ของการหายของบาดแผลได้

1.4 ขอบเขตของงานวิจัย

1.4.1 ศึกษาเฉพาะการกระตุ้นไฟฟ้าแบบกระแสตรงและแสงสีแดงจากไดโอดเปล่งแสงร่วมกันเพื่อ ดูการรักษาตัวของบาดแผลบริเวณผิวหนัง

1.4.2 ศึกษาในสัตว์ทดลองคือ หนูขาวใหญ่สายพันธุ์ Wistar ที่สร้างบาดแผลขึ้นมาเพื่อดูการรักษา ตัวของบาดแผลบริเวณผิวหนัง

1.4.3 เปรียบเทียบเฉพาะอัตราการหายของบาดแผล (Wound healing rate) และคุปริมาตรของ คอลลาเจนไม่ได้ศึกษาในกลไกเชิงโมเลกุลเกี่ยวกับกระบวนการหายหรือรักษาตัวของบาดแผล

1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

- 1.5.1 ได้ข้อมูลทางเทคนิคของเครื่องต้นแบบที่เป็นประโยชน์ในการรักษาด้วยการกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าร่วมกับการกระตุ้นด้วยแสงสีแดงจากไดโอดเปล่งแสง
- 1.5.2 ได้วิธีการใหม่โดยการใช้ร่วมกันโดยการกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าและการกระตุ้นด้วยแสงสีแดงจากไดโอดเปล่งแสงเพื่อใช้รักษาบาดแผล
- 1.5.3 ได้เครื่องมือต้นแบบที่สามารถนำไปต่อยอดเพื่อเป็นแนวทางรักษาผู้ป่วย

บทที่ 2

วิธีการดำเนินการวิจัย

การวิจัยนี้เป็นการทดลองการกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าใช้งานร่วมกับแสง เพื่อดูผลต่อการหายของบาดแผลด้วยการวิเคราะห์ขนาดของบาดแผลและตัวอย่างชิ้นเนื้อภายใต้ผิวหนัง ในการศึกษาผลการกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าร่วมกับแสงสีแดงจากหลอดไดโอดเปล่งแสงที่บาดแผลบริเวณผิวหนังต่อการหายของบาดแผลว่าช่วยเพิ่มความเร็วในการหายของบาดแผลหรือไม่ และยังมีการตรวจสอบพารามิเตอร์อื่นนอกจากขนาดของบาดแผลอีกด้วย ได้แก่ ปริมาณคอลลาเจนบริเวณบาดแผล และ ไฟโบรบลาสต์โกรทแฟคเตอร์ (Fibroblast growth factor) (6,7) โดยขั้นตอนในการวิจัยมีดังนี้

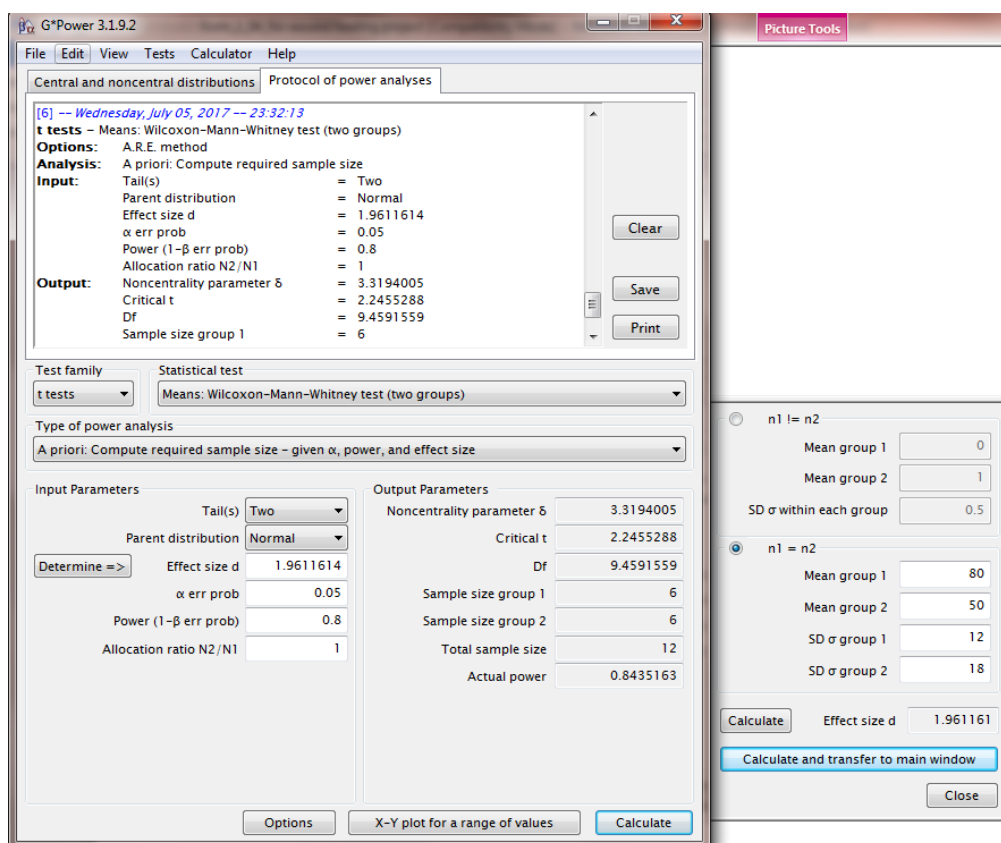
1. การคำนวณจำนวนประชากรกลุ่มตัวอย่างของสัตว์ทดลองและแบ่งกลุ่มการทดลอง
2. การออกแบบและสร้างเครื่องกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าและเครื่องกระตุ้นด้วยแสงสีแดงจากหลอดไดโอดเปล่งแสง
3. การทดลองการกระตุ้นในสัตว์ทดลองและติดตามผลการทดลองด้วยการศึกษาค่าของพื้นที่การหายของบาดแผล การย้อมชิ้นเนื้อบริเวณบาดแผลเพื่อศึกษาปริมาณของคอลลาเจน และ ปริมาณของไฟโบรบลาสต์โกรทแฟคเตอร์
4. การวิเคราะห์ผลการทดลองโดยการเปรียบเทียบผลปริมาณคอลลาเจน ปริมาณไฟโบรบลาสต์โกรทแฟคเตอร์จากกลุ่มการทดลองแต่ละกลุ่ม และอัตราการหายของบาดแผลในแต่ละกลุ่มการทดลอง

โดยแต่ละกลุ่มการทดลองจะแบ่งตามวิธีการรักษาดังนั้นจะมีกลุ่มการทดลองแตกต่างกัน 4 กลุ่มคือ

1. กลุ่มควบคุมซึ่งไม่ได้รับการกระตุ้น
2. กลุ่มกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าโดยทำการกระตุ้นบริเวณบาดแผลด้วยกระแสไฟฟ้าเท่านั้น
3. กลุ่มกระตุ้นด้วยแสงสีแดงจากหลอดไดโอดเปล่งแสง โดยทำการกระตุ้นบริเวณบาดแผลด้วยแสงเท่านั้น
4. กลุ่มกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าร่วมกับแสงสีแดงจากหลอดไดโอดเปล่งแสงจะกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าและแสงพร้อมกัน

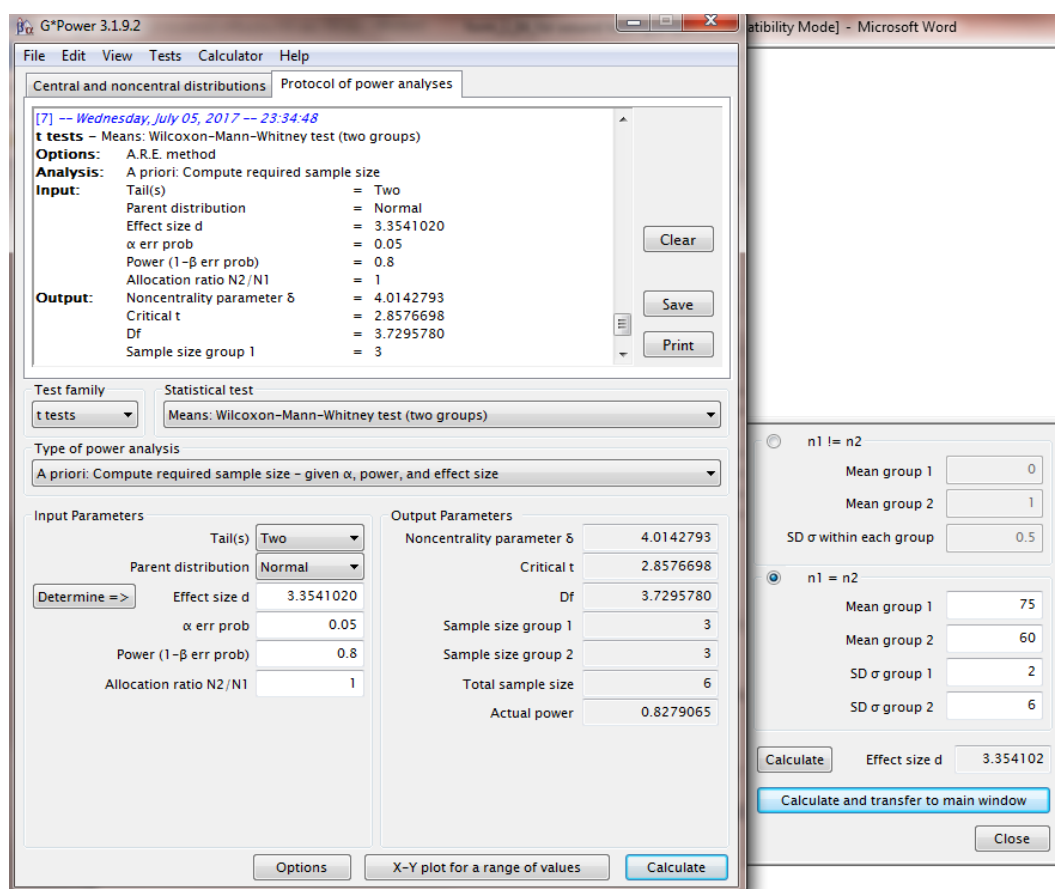
2.1 การคำนวณประชากรกลุ่มตัวอย่าง

สัตว์ทดลองจะเลือกใช้หนูแรทสายพันธุ์ Wistar เพศผู้ และคำนวณประชากรกลุ่มตัวอย่าง (Sample size) ด้วยโปรแกรม G-power โดยใช้ค่าร้อยละของพื้นที่บาดแผลที่หายของแต่ละกลุ่มในสัปดาห์แรกเพื่อการคำนวณจำนวน โดยกลุ่มทดลองที่ 1 ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุมที่ไม่มีการรักษาใด ๆ มีค่าพื้นที่ของบาดแผลเป็น 80% เทียบกับพื้นที่ของบาดแผลเริ่มต้นวันแรก และ กลุ่มทดลองที่ 2 ซึ่งจะรักษาด้วยกระแสไฟฟ้ากระตุ้นมีค่าพื้นที่ของบาดแผลเป็น 50% เทียบกับพื้นที่ของบาดแผลเริ่มต้นในวันแรก โดยแต่ละกลุ่มจะมีค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation) เท่ากับ 12 และ 18 % ตามลำดับ (อ้างอิงค่า Wound closure จาก Lee et al., J. Exp. Biomed. Sci. 13 (2007) และใช้ค่า $\alpha=0.05$ $\beta=0.2$ ทำให้ได้ค่าจำนวนสัตว์ทดลอง $n=6$ ในแต่ละกลุ่ม ดังแสดงในรูปที่ 2.1



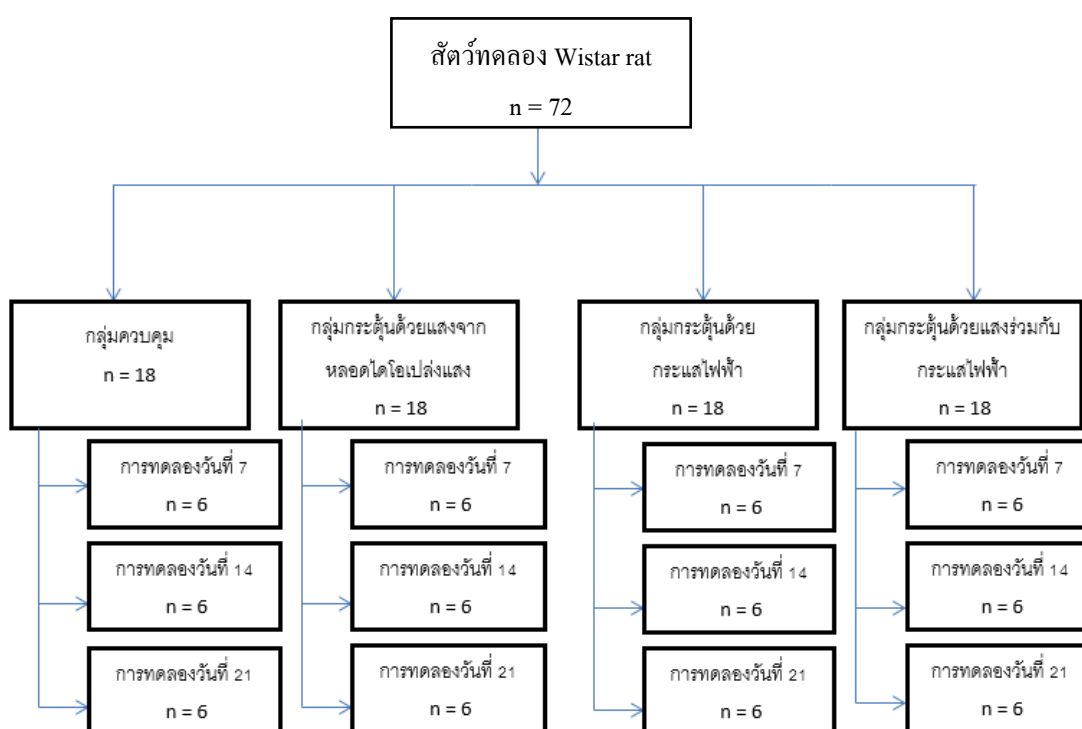
รูปที่ 2.1 การใช้โปรแกรม G-Power ในการหาจำนวนสัตว์ทดลองระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ใช้กระแสไฟฟ้ากระตุ้น

สำหรับกลุ่มทดลองที่ 3 ซึ่งใช้แสงจากหลอดไดโอดเปล่งแสงสีแดงในการรักษาเปรียบเทียบกับกลุ่มทดลองที่ 1 ซึ่งเป็นควบคุมที่ไม่มีการรักษาใด ๆ จะมีค่า Variation of wound diameter เป็น $60 \pm 6\%$ และ $75 \pm 2\%$ ตามลำดับ (อ้างอิงค่า Variation of wound diameter จาก Rezende et al., J. Photochemistry and Photobiology B: Biology. 87 (2007) 145-153) และใช้ค่า $\alpha=0.05$ $\beta=0.2$ ทำให้ได้ค่าจำนวนสัตว์ทดลอง $n=3$ ในแต่ละกลุ่ม ดังแสดงในรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.2 การใช้โปรแกรม G-Power ในการหาจำนวนสัตว์ทดลองระหว่างกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ใช้แสงสีแดงจากหลอดไดโอดเปล่งแสงในการรักษา

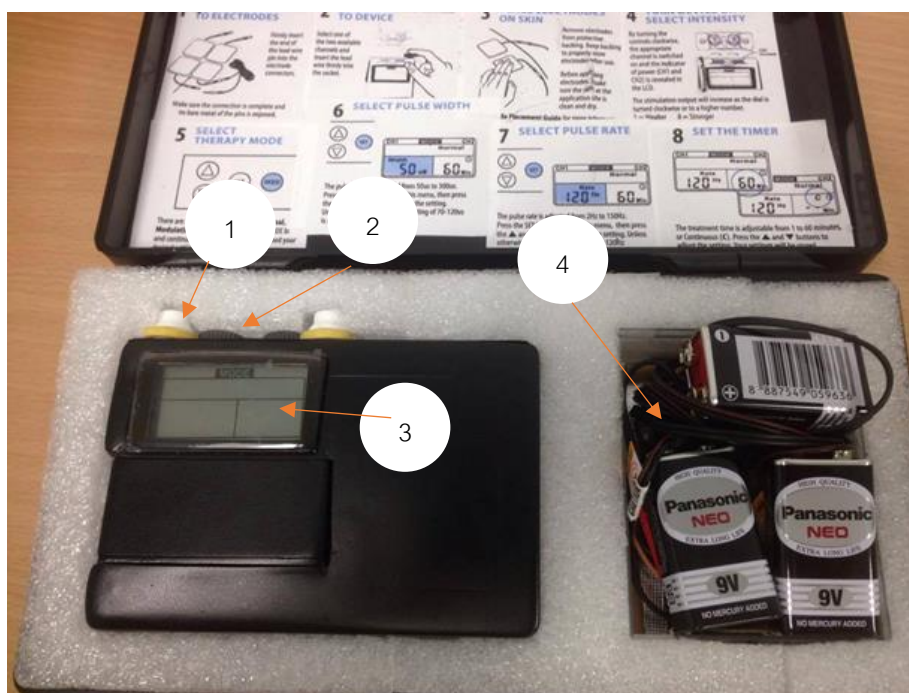
เนื่องจากงานวิจัยนี้จะทำการเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่ทำการรักษาด้วยวิธีที่แตกต่างกัน ในระยะเวลา 21 วันและจำนวนสัตว์ทดลองที่คำนวณคือ 6 ตัวต่อกลุ่มต่อระยะเวลาที่สนใจ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จะใช้สัตว์ทดลองในแต่ละกลุ่มเป็นจำนวนกลุ่มละ 18 ตัว (สัปดาห์ที่ 1: 6 ตัว, สัปดาห์ที่ 2: 6 ตัว และสัปดาห์ที่ 3: 6 ตัว) มีทั้งหมด 4 กลุ่ม ดังนั้นจะใช้สัตว์ทดลองทั้งสิ้น 72 ตัว จากการใช้โปรแกรม G-Power สามารถแบ่งกลุ่มการทดลองได้ดังรูปที่ 2.3



รูปที่ 2.3 จำนวนสัตว์ทดลองและกลุ่มการทดลอง

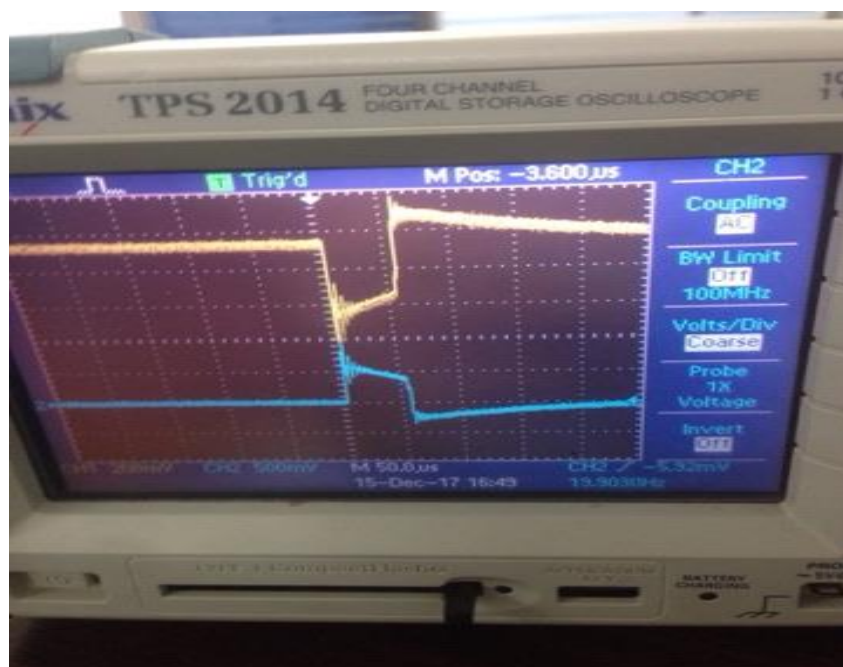
2.2 การออกแบบและสร้างเครื่องกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าและเครื่องกระตุ้นด้วยแสง

เครื่องกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าที่ออกแบบดังรูปที่ 2.4 ได้กำหนดค่าที่ต้องการคือจะมีค่ากระแสไฟฟ้าประมาณ 10 ไมโครแอมแปร์ (5) สามารถปรับค่าของความถี่ได้ในช่วง 20-100 Hz และสามารถปรับค่าความกว้างของช่วงคลื่นได้ในช่วง 40-200 ms นอกจากนี้เครื่องกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าจะใช้ชนิดของกระแสเป็นชนิดไฟฟ้ากระแสตรงแบบ Biphasic waveform โดยใช้เครื่องออสซิลอสโคปในการวัดรูปคลื่นของกระแสไฟฟ้า (รูปที่ 2.5) และจากการศึกษาบทความต่าง ๆ พบว่าค่าของกระแสไฟฟ้าไม่ได้เป็นปัจจัยอย่างเดียวต่อการหายของบาดแผลที่สำคัญที่สุดแต่ยังมีค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ต้องคำนึงถึงด้วย ซึ่งเครื่องกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้านี้จะมีค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ 9 โวลต์



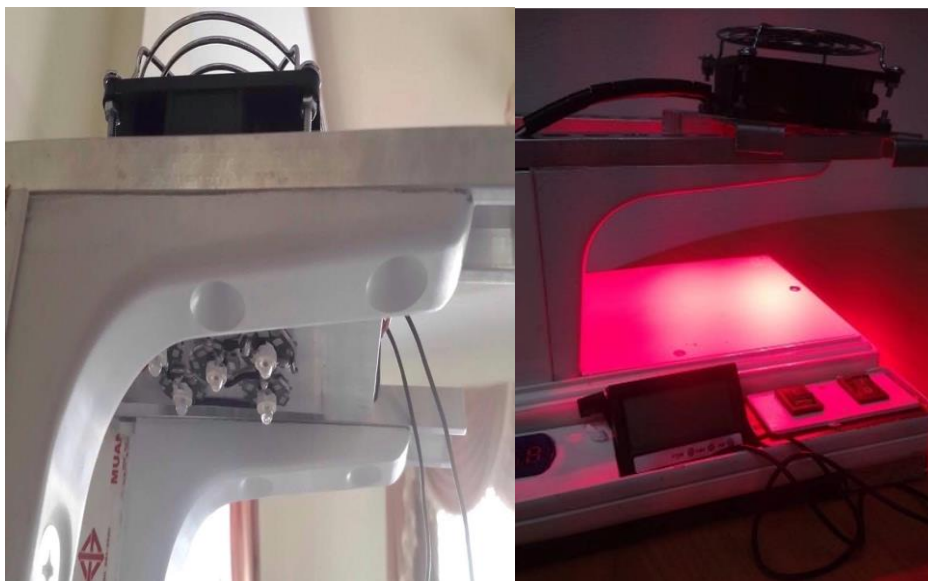
รูปที่ 2.4 เครื่องกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าที่ประดิษฐ์ขึ้น โดยมีส่วนประกอบของเครื่องกระตุ้น ดังนี้

- (1) ช่องใส่สายปลดปล่อยกระแส
- (2) ปุ่มปรับค่ากระแส
- (3) หน้าจอแสดงผล และ
- (4) สายต่อกับอิเล็กทรอนิกส์

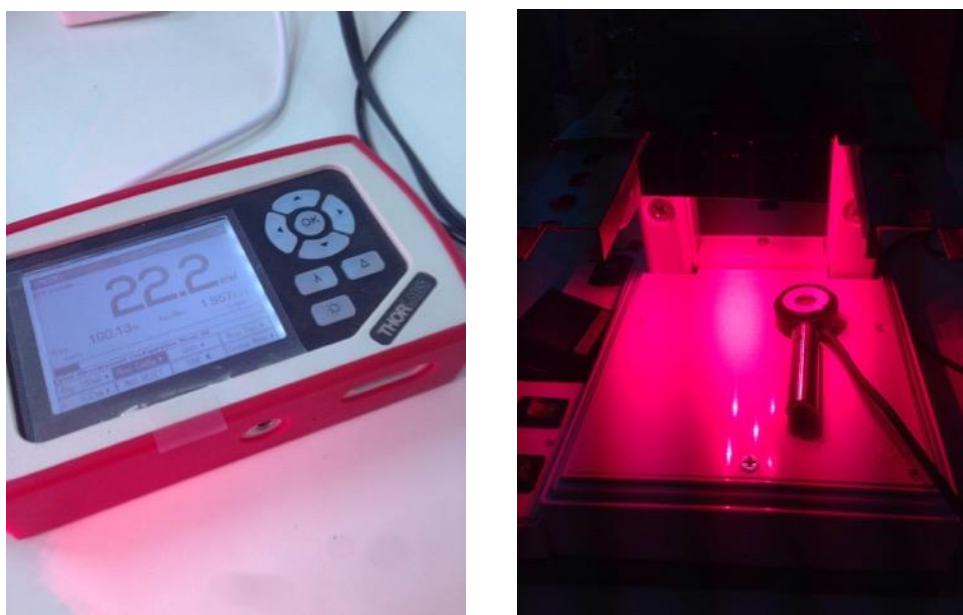


รูปที่ 2.5 ลักษณะสัญญาณจากเครื่องกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าเป็น biphasic

เครื่องกระตุ้นด้วยแสงที่ออกแบบแสดงดังรูปที่ 2.6 เครื่องกระตุ้นด้วยแสงจะใช้ความยาวคลื่นแสงที่ 600 ถึง 660 นาโนเมตร เป็นช่วงของแสงสีแดงจากหลอดไดโอดเปล่งแสงพลังงานสูง ให้ค่าพลังงานต่อหลอด 5 วัตต์ พื้นที่ในการส่องแสงครอบคลุมประมาณ 5 ถึง 10 ตารางเซนติเมตร ระยะจากหลอดไดโอดเปล่งแสงจะห่างจากพื้นที่ที่ต้องการส่องแสงเป็นระยะ 15 เซนติเมตร พลังงานต่อพื้นที่ในการส่องแสงครอบคลุมประมาณ 5 ถึง 10 จูลต่อตารางเซนติเมตร (14,23) ซึ่งวัดค่าพลังงานที่เครื่องกระตุ้นด้วยแสงผลิตออกมาโดยใช้เครื่องวัดพลังงานแสงยี่ห้อ THORLABS รุ่น PM100D ดังรูปที่ 2.7



รูปที่ 2.6 เครื่องกระตุ้นด้วยแสงจากไดโอดเปล่งแสงสีแดง ที่ประดิษฐ์ขึ้น



รูปที่ 2.7 การวัดพลังงานแสงที่ออกมาจากหลอดไดโอด

2.3 การทดลองในสัตว์ทดลองและการติดตามผล

การศึกษานี้ใช้หนูแรทสายพันธุ์ Wistar เพศผู้ โดยน้ำหนักของหนูทดลองที่ใช้จะมีน้ำหนัก 250 ถึง 280 กรัม สัตว์ทดลองจะถูกแบ่งกลุ่มทั้งหมด 4 กลุ่มโดยสัตว์ทดลองแต่ละตัวจะได้รับการดูแลตามมาตรฐาน 3Rs สัตว์ทดลองจะถูกขังน้ำหนักเพื่อกำหนดปริมาณยาสลบและดำเนินการทำให้สัตว์ทดลองสลบ โดยใช้การฉีดยาไทโอเพนทอล (Thiopental sodium) เข้าทางหน้าท้อง (Intraperitoneal injection) ด้วยปริมาณ 50 มิลลิกรัมของยาต่อน้ำหนักหนึ่งกิโลกรัมของสัตว์ทดลอง หลังจากนั้นทำการโกนขนบริเวณหลังของหนูออกโดยใช้ที่โกนขนไฟฟ้าไปจนเห็นบริเวณหนังชัดเจนแล้วนำขนออกอีกรอบหนึ่งด้วยยากำจัดขนเพื่อให้ผิวหนังเรียบไม่มีขนเหลืออยู่ หลังจากนั้นทำการล้างผิวหนังด้วย normal saline ตามด้วยใช้ 10% povidone-iodine เพื่อทำการฆ่าเชื้อบริเวณผิวหนังและตามด้วย 70% isopropyl alcohol อีกครั้งทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที (6,7) หลังจากนั้นสร้างบาดแผลโดยใช้ตัวคีบ (Forcep) มีดผ่าตัดและกรรไกรที่ผ่านการฆ่าเชื้อโดย hot bead sterilizer ในการตัดให้เป็นลักษณะวงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 8 มิลลิเมตร (รูปที่ 2.8) โดยมีระดับความลึกลงไปจนถึงชั้นก่อนกล้ามเนื้อระยะประมาณ 2 มิลลิเมตร โดยจะตัดชั้นหนังแท้ และชั้นหนังกำพร้าออกไป ปิดแผลด้วยผ้ากอซสะอาด ทำการพักสัตว์ทดลองบริเวณที่มีความอบอุ่น หลังจากสัตว์ทดลองฟื้นจะนำสัตว์ทดลองกลับสู่กรงเลี้ยง โดยจะเลี้ยงกรงละ 1 ตัว เมื่อครบ 24 ชั่วโมงจากการผ่าตัดจึงเริ่มทำการทดลองและทุกวันมีการทำความสะอาดบาดแผลด้วย Normal saline

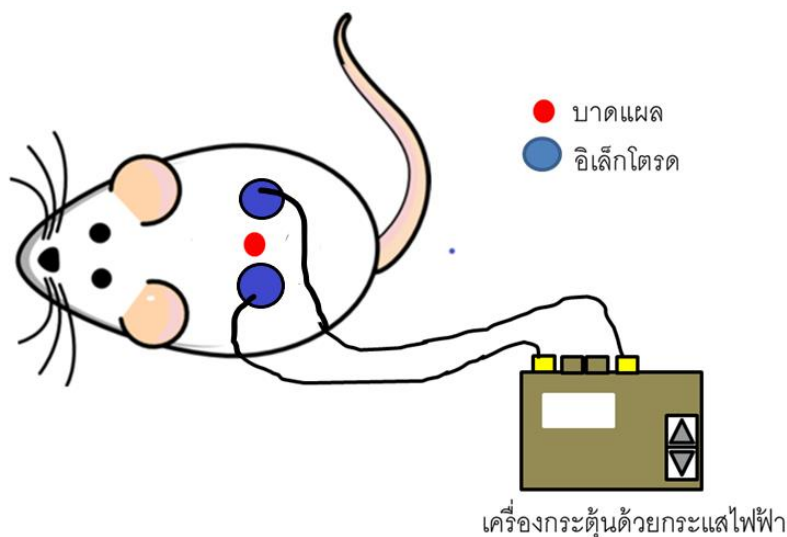


รูปที่ 2.8 แผลบริเวณหลังของสัตว์ทดลองขนาด 8 มิลลิเมตร

ในการศึกษานี้มีการแบ่งสัตว์ทดลองเป็น 4 กลุ่มได้แก่

1. กลุ่มควบคุมซึ่งไม่มีการรักษาบาดแผลด้วยวิธีการใด ๆ
2. กลุ่มที่รักษาด้วยการกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้า
3. กลุ่มที่รักษาด้วยการกระตุ้นด้วยแสง
4. กลุ่มที่รักษาด้วยการกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าร่วมกับแสง

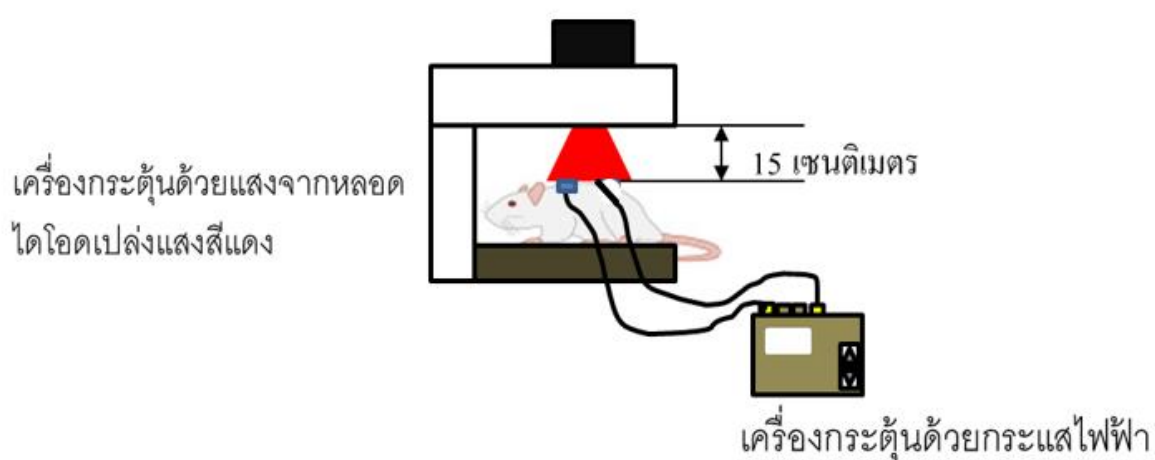
นำกลุ่มที่รักษาแต่ละกลุ่ม คือ กลุ่มที่รักษาด้วยการกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้า (กลุ่มที่ 2; รูปที่ 2.9) กลุ่มที่รักษาด้วยการกระตุ้นด้วยแสง (กลุ่มที่ 3; รูปที่ 2.10) และกลุ่มที่รักษาด้วยการกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าร่วมกับแสง (กลุ่มที่ 4; รูปที่ 2.11) มาให้การรักษาเป็นระยะเวลา 15 นาที ดังแผนการดำเนินการรักษาในรูปที่ 2.12 โดยก่อนการกระตุ้นจะต้องทำให้สัตว์ทดลองสลบด้วยการวางยาสลบก่อนทำการรักษาโดยจะให้ยาสลบไทโอเพนทอลปริมาณ 50 มิลลิกรัมของยาต่อน้ำหนัก 1 กิโลกรัมของสัตว์ทดลอง เมื่อทำการรักษาด้วยการกระตุ้นเสร็จเรียบร้อยแล้วจะทำการปิดบาดแผลด้วยผ้ากอซสะอาดเพื่อไม่ให้บาดแผลโดนสิ่งสกปรกมากเกินไปจากนั้นจะนำสัตว์ทดลองกลับไปพักในกรงเลี้ยงหลังจากสัตว์ทดลองฟื้นจากสภาวะสลบ ซึ่งจะดำเนินการดังกล่าวนี้ทุกวันจนครบ 21 วัน และทุกวันที่ 7 14 และ 21 จะทำการการุณยฆาตโดยให้ยาสลบสัตว์ทดลองด้วยไทโอเพนทอลทางช่องท้องในปริมาณ 150 มิลลิกรัมของยาต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมของสัตว์ทดลอง เพื่อเก็บชิ้นเนื้อบริเวณบาดแผลไปย้อมและวัดปริมาณคอลลาเจนและโปรตีนที่สนใจ



รูปที่ 2.9 การกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้า



รูปที่ 2.10 การกระตุ้นด้วยแสงจากไดโอดเปล่งแสง



รูปที่ 2.11 การกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าร่วมกับแสงจากไดโอดเปล่งแสง

รูปที่ 2.12 แผนภาพแสดงกระบวนการกระตุ้นและระยะเวลาในการทดลองกับ
สัตว์ทดลอง

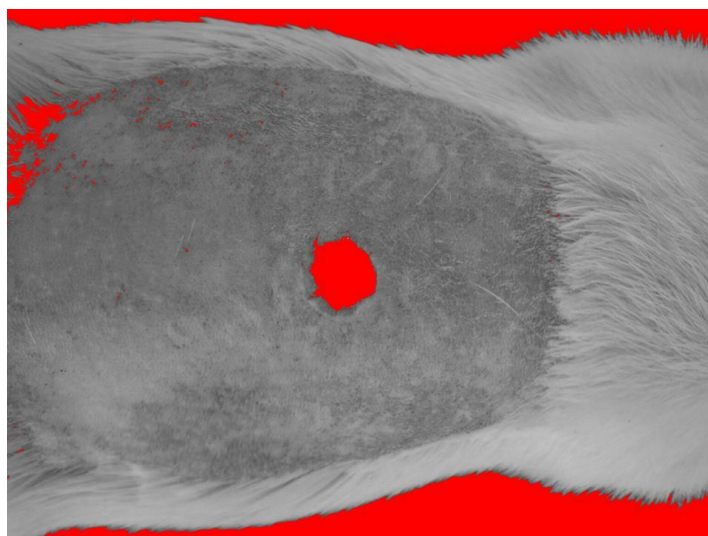
2.4 การตรวจสอบอัตราการหายของบาดแผลจากรูปภาพ

บาดแผลของสัตว์ทดลองในแต่ละกลุ่มจะถูกถ่ายภาพและเก็บเป็นภาพดิจิทัลแบบ jpg (รูปที่ 2.13) โดยก่อนการเก็บภาพทุกครั้งสัตว์ทดลองต้องถูกทำให้สลบและถูกจัดท่านอนในตำแหน่งเดิม และวัดระยะกึ่งกลางให้ห่างจากบาดแผลประมาณ 15 เซนติเมตรเพื่อให้ได้ตำแหน่งที่ถูกต้อง หลังจากมั่นใจเรื่องระยะห่างแล้วจะทำการถ่ายภาพ 3 ครั้งเพื่อให้ได้ภาพที่ใกล้เคียงกันและนำภาพที่ได้แยกตามกลุ่มของสัตว์ทดลองและทำการเก็บภาพไว้ในคอมพิวเตอร์ทุกวันของการทดลอง หลังจากนั้นใช้โปรแกรม ImageJ วัดขนาดพื้นที่ของบาดแผล โดยค่าที่วัดได้จะอยู่ในหน่วยของพิกเซล โดยขั้นตอนในการวัดพื้นที่ของบาดแผลจะเริ่มจากการปรับค่าความเข้มของแสง (Intensity) ของภาพโดยการกำหนดค่า threshold ของภาพเพื่อให้บริเวณบาดแผลถูกแยกออกมาเด่นชัดจากผิวหนังของสัตว์ทดลองจากนั้นดำเนินการวัดขนาดพื้นที่ของบาดแผลด้วยคำสั่งการวัดพื้นที่ analyze area โดยจะวัดจนถึงขอบของบาดแผล (รูปที่ 2.14) นำค่าพื้นที่ที่วัดได้ออกมาคำนวณอัตราการหายของบาดแผลในหน่วยของร้อยละ โดยใช้สมการด้านล่างนี้

$$\text{อัตราการหายของบาดแผลบริเวณผิวหนัง(\%)} = \frac{\text{พื้นที่บาดแผลเริ่มต้น} - \text{พื้นที่บาดแผลสุดท้าย}}{\text{พื้นที่บาดแผลเริ่มต้น}} \times 100$$



รูปที่ 2.13 ภาพบาดแผลที่ถูกถ่ายด้วยกล้องดิจิทัลเพื่อนำไปวัดขนาดพื้นที่ของบาดแผล



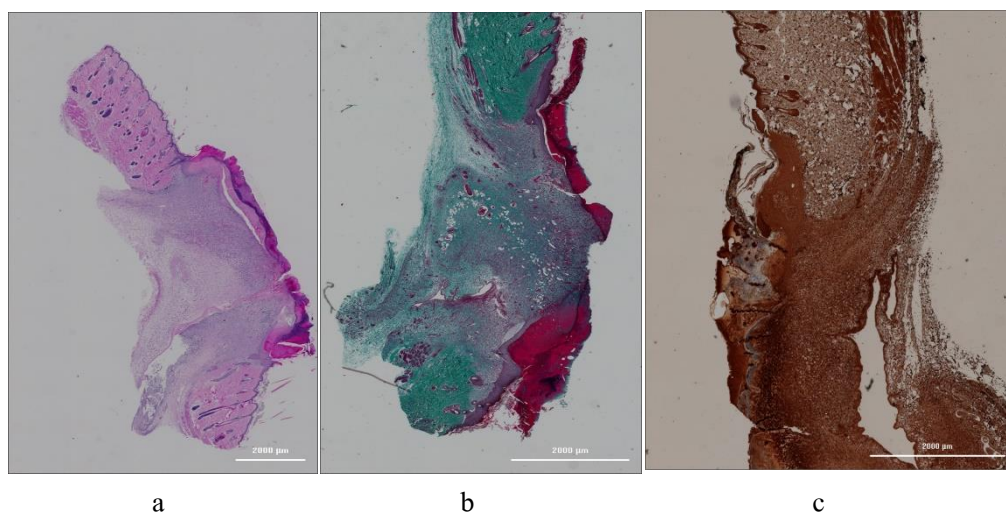
รูปที่ 2.14 ภาพจากการวัดขนาดพื้นที่บาดแผลหลังจากการปรับค่า threshold

2.5 การตรวจสอบปริมาณโปรตีนที่สนใจจากชิ้นเนื้อบริเวณบาดแผล

ทำการตัดชิ้นเนื้อบริเวณบาดแผลที่ต้องการตรวจโดยมีความลึกจากผิวของบาดแผลตัดถึงชั้นหนังแท้มีขนาด 1x1 ตารางเซนติเมตร แล้วนำชิ้นเนื้อแช่ใน 10 % Neutral buffered formalin โดยให้ชิ้นเนื้อที่ตัดจมน้ำทั้งหมด (รูปที่ 2.15) ทำการแช่ชิ้นเนื้อเป็นระยะเวลาอย่างน้อย 24 ชั่วโมง จากนั้นส่งไปยังหน่วยพยาธิวิทยาเพื่อทำการ Dehydration และเก็บชิ้นเนื้อในพาราฟินเหลวเพื่อรักษาโครงสร้างเนื้อเยื่อและเซลล์ จากนั้นนำชิ้นเนื้อวางบนสไลด์เพื่อทำการตัดชิ้นเนื้อให้มีความหนา 3 ไมครอนและทำการย้อมสีดูปริมาณคอลลาเจนด้วยวิธีการมิถุนวิทยาโดยใช้เทคนิคการย้อม Hematoxylin & Eosin Masson's trichrome และใช้เทคนิค Immunohistochemistry เพื่อดูปริมาณโปรตีนไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์ ด้วยการใช้แอนติบอดี (Antibody) (รูปที่ 2.16) นำสไลด์ของชิ้นเนื้อมาส่องดูผลด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงโดยดูผล ณ วันที่ 7 14 และ 21 ของการทดลอง เมื่อได้ภาพดิจิทัลของการย้อมคอลลาเจนและโปรตีนไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์ แล้วจะนำภาพดิจิทัลที่ได้มาวิเคราะห์ผ่านโปรแกรมที่ได้พัฒนาขึ้นเพื่อคำนวณค่าออกมาเป็นตัวเลขและทำการเปรียบเทียบผลของการรักษาระหว่างกลุ่ม



รูปที่ 2.15 ชิ้นเนื้อที่ตัดและแช่ใน 10 % neutral buffered formalin



รูปที่ 2.16 ภาพจากสไลด์ที่ข้อมด้วย (a) Hematoxylin & Eosin (b) Masson's trichrome และ (c) Fibroblast growth factor (FGF, ab8880, Abcam)

2.6 การวิเคราะห์ทางสถิติในแต่ละกลุ่มการทดลอง

อัตราการหายของบาดแผลในแต่ละกลุ่มการรักษาจะทำการเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม เพื่อหาความแตกต่างทางสถิติด้วยวิธี One way ANOVA นอกจากนี้ปริมาณคอลลาเจนและจำนวนเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ดูจากผลการข้อมขึ้นเนื้อในแต่ละกลุ่มการรักษาจะถูกเปรียบเทียบทางสถิติกับกลุ่มควบคุมโดยใช้วิธี One way ANOVA ด้วยโปรแกรม PRISM 5.0 (GraphPad, SanDiego, US) กรณีที่มีนัยสำคัญทางสถิติ ค่า $p < 0.05$

บทที่ 3

ผลการศึกษา

การศึกษานี้ได้มีการสร้างเครื่องกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าและเครื่องกระตุ้นด้วยแสงสีแดงจากหลอดแอลอีดี (LED) เพื่อนำไปใช้ในการรักษาบาดแผลที่เกิดขึ้นในสัตว์ทดลอง ทำการวิเคราะห์การหายของบาดแผลด้วยโปรแกรมคำนวณพื้นที่จากภาพถ่ายดิจิทัล และตรวจสอบชิ้นเนื้อด้วยการย้อมสีเพื่อดูปริมาณคอลลาเจนและไฟโบรบลาสโตกรทแฟกเตอร์ (Fibroblast growth factor) โดยผลการศึกษาที่ได้เป็นดังนี้

3.1 เครื่องกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าและเครื่องกระตุ้นด้วยแสง

3.1.1 เครื่องกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้า ได้ตรวจสอบเครื่องต้นแบบด้วยมัลติมิเตอร์ดังแสดงในรูปที่ 3.1 โดยเครื่องต้นแบบสามารถปล่อยกระแสไฟฟ้าได้ในช่วงของไมโครแอมป์เปร์ คือ ตั้งแต่ 1 – 100 μA โดยเป็นกระแสไฟฟ้าชนิดกระแสตรงและสามารถปรับค่าความถี่และความกว้างของลูกคลื่นได้ตั้งแต่ 20-200 Hz จากการทดลองที่ค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าต่าง ๆ พบว่าค่าของกระแสไฟฟ้าที่จ่ายออกมาจากเครื่องกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้ามีค่าไม่แตกต่างกันอยู่ในช่วง 38 ถึง 45 มิลลิแอมป์เปร์ ดังแสดงในตารางที่ 3.1

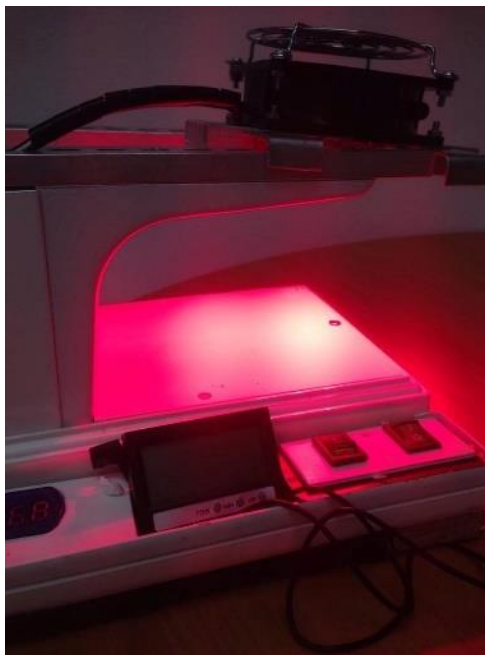
3.1.2 เครื่องกระตุ้นด้วยแสงสีแดงจากหลอดแอลอีดี ได้ต้นแบบดังแสดงในรูปที่ 3.2 โดยเครื่องต้นแบบสามารถปลดปล่อยแสงสีแดงมีค่าความยาวคลื่นคือ 660 นาโนเมตร ในลักษณะพัลส์ (Pulse) และได้พลังงานในช่วง 5 ถึง 6 จูล/ตารางเซนติเมตร มีกำลังงาน ณ จุดต่าง ๆ บนแผ่นของอุปกรณ์อยู่ระหว่าง 17 ถึง 26 มิลลิวัตต์ ดังแสดงในรูปที่ 3.3 และ 3.4 ตามลำดับ



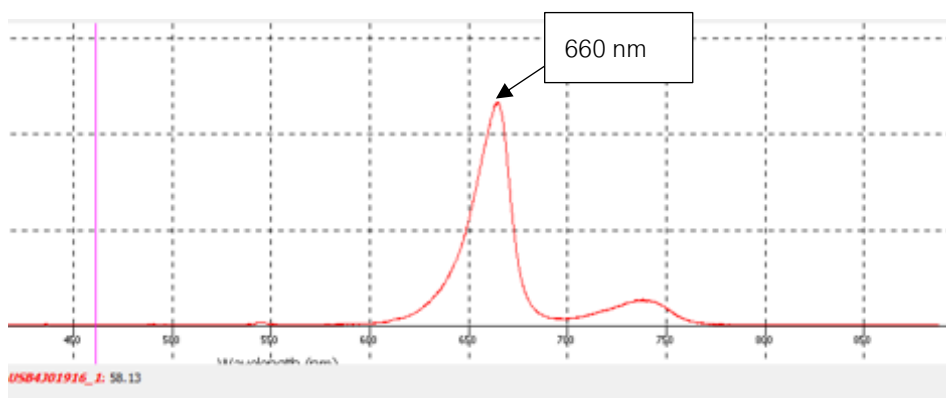
รูปที่ 3.1 เครื่องกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าโดยสามารถวัดค่ากระแสได้ในช่วง 1-100 μA

ตารางที่ 3.1 ค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าและกระแสไฟฟ้าจากเครื่องกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้า

VOLTS (V)	AMPARE (mA)
8.25	39-45
7.7	40-45
7.19	38-43
7.00	39-43
6.6	40-42
6.29	40-43

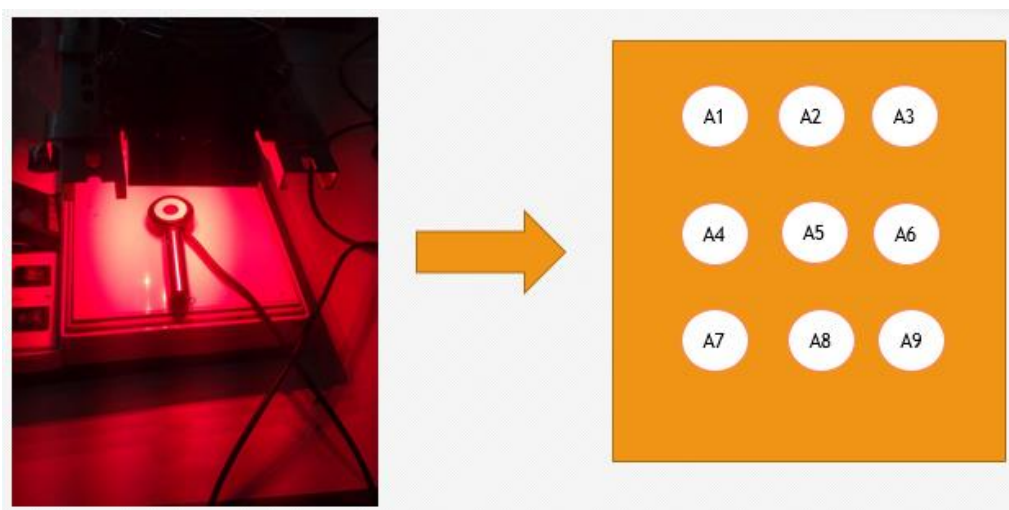


รูปที่ 3.2 เครื่องกระตุ้นด้วยแสงสีแดงจากหลอดไดโอดเปล่งแสง

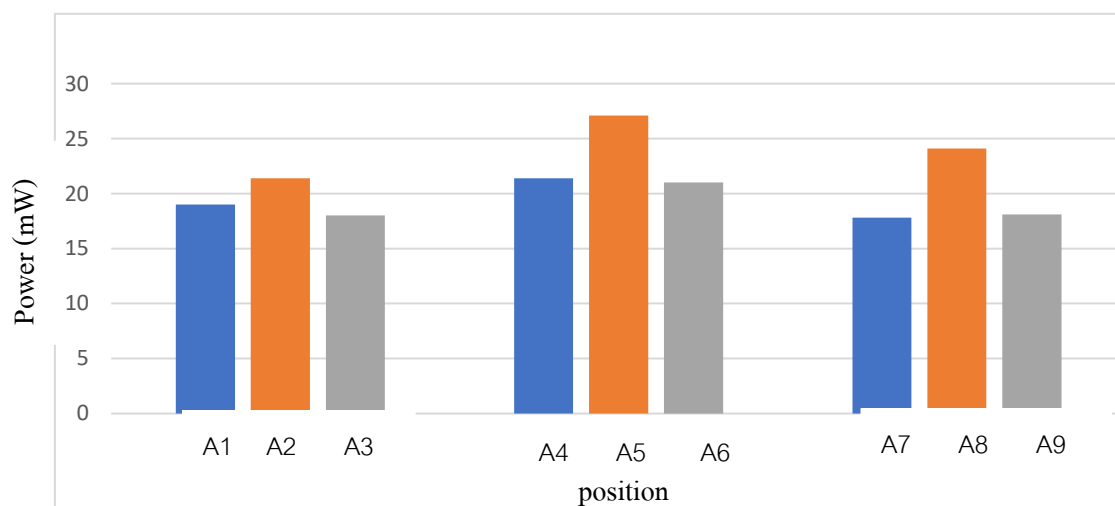


รูปที่ 3.3 ค่าความยาวคลื่นของหลอดไดโอดเปล่งแสงสีแดงมีค่า 660 nm

A



B



รูปที่ 3.4 (A) ตำแหน่งในการวัดพลังงานจากเครื่องกระตุ้นด้วยแสง และ (B) กราฟแสดงค่าพลังงานของแต่ละตำแหน่งของเครื่องกระตุ้นด้วยแสง

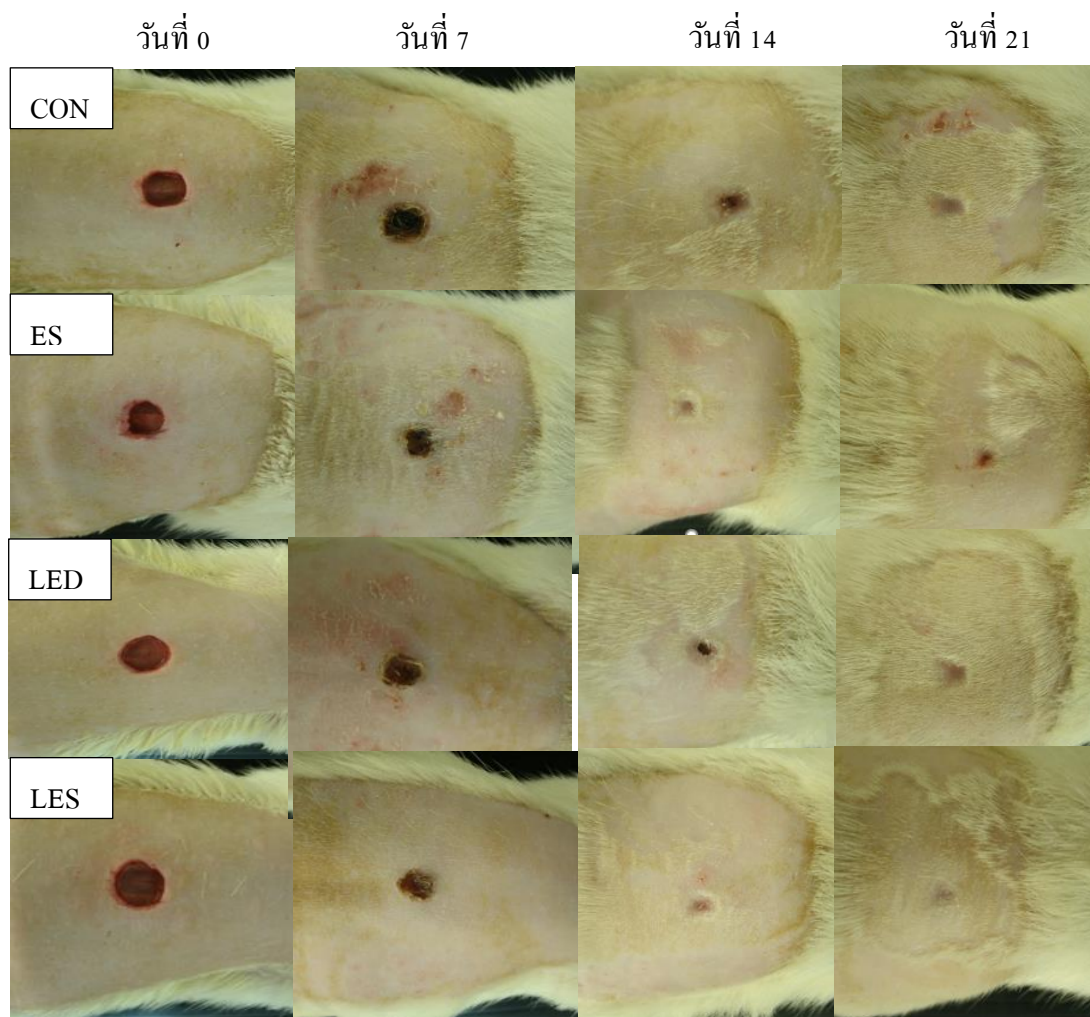
3.2 อัตราการหายของบาดแผล

การศึกษาวิจัยนี้ได้ทำการทดลองกับหนูแรทสายพันธุ์ Wistar 4 กลุ่ม จำนวนทั้งสิ้น 66 ตัว และทำการถ่ายภาพบาดแผลทุกวันเป็นเวลา 21 วัน ดังแสดงในรูปที่ 3.5 เพื่อคำนวณอัตราการหายของบาดแผลได้ผลดังนี้

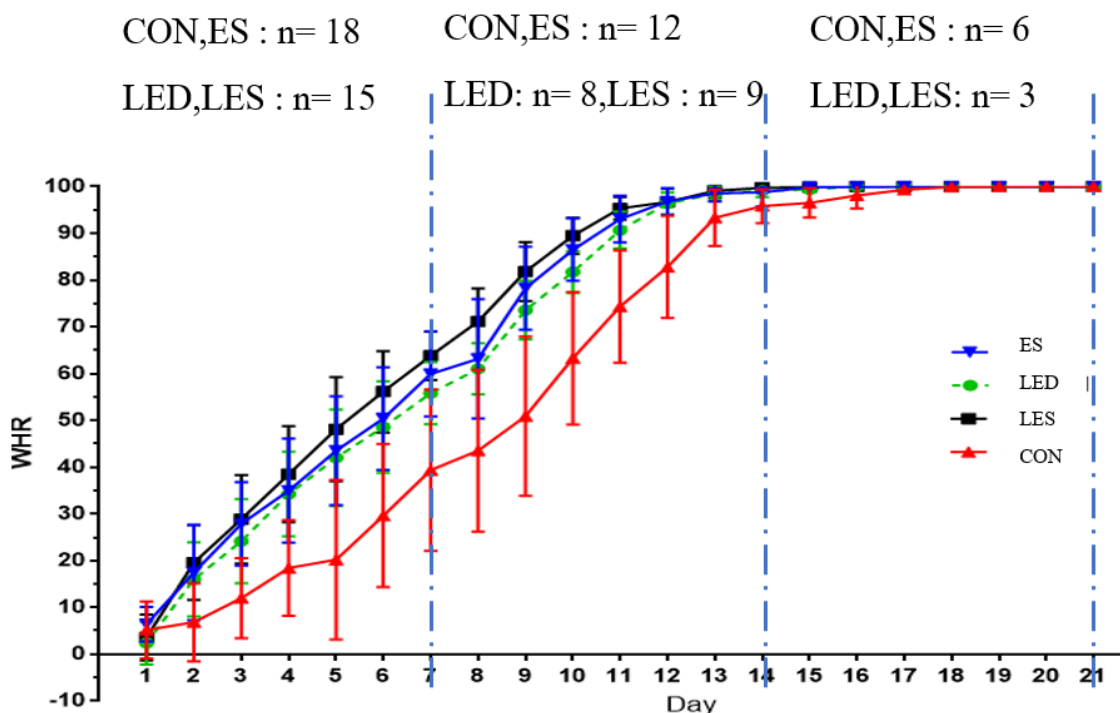
กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับการรักษาใด ๆ (กลุ่ม CON) บาดแผลจะมีการแห้งตัวที่ช้า บาดแผลมีขนาดใหญ่ และเกิดอาการบวมของบาดแผลมากกว่ากลุ่มที่ได้รับการรักษา โดยบาดแผลในกลุ่มควบคุมเมื่อดูอัตราการหายของบาดแผลพบว่าในวันที่ 7 ของการทดลองอัตราการหายของบาดแผลมีค่าเฉลี่ยประมาณ 40 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น (รูปที่ 3.6) บาดแผลจะมีการหลุดของสะเก็ดแผลในช่วงวันที่ 13 ของการทดลองซึ่งช่วงนี้จะเป็นช่วงที่แผลเริ่มไม่ค่อส่งผลต่อการทำกิจกรรมประจำวันของสัตว์ทดลองเนื่องจากบาดแผลเริ่มแห้งและเริ่มเป็นแผลเป็น และบาดแผลจะปิดสนิทจนเป็นแผลเป็นในวันที่ 17 ของการทดลอง

กลุ่มของสัตว์ทดลองที่กระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าอย่างเดียว (กลุ่ม ES) จะได้ผลใกล้เคียงกับกลุ่มที่กระตุ้นด้วยแสงอย่างเดียว (กลุ่ม LED) โดยอัตราการหายของบาดแผลในกลุ่มกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าอย่างเดียวในวันที่ 7 ของการทดลองมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 59 เปอร์เซ็นต์ สำหรับกลุ่มที่กระตุ้นด้วยแสงอย่างเดียวมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 56 เปอร์เซ็นต์ดังแสดงในรูปที่ 3.6 และจากการสังเกตลักษณะของบาดแผลในกลุ่มของกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าอย่างเดียวแผลจะแห้งเร็วกว่ากลุ่มที่กระตุ้นด้วยแสงอย่างเดียวและกลุ่มควบคุม นอกจากนี้ยังพบว่ากลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วยแสงอย่างเดียว นั้นจะมีอัตราการหายของบาดแผลช้าในช่วงแรกและเริ่มเพิ่มมากขึ้นในวันที่ 9 ของการทดลอง และในทั้ง 2 กลุ่มนี้บาดแผลจะมีสะเก็ดเริ่มหลุดในช่วงวันที่ 10 ถึง 11 ของการทดลอง หลังจากนั้นบาดแผลจะปิดจนกลายเป็นแผลเป็นในช่วงวันที่ 13 ถึง 15 ทั้งนี้ผลการทดลองจะมีความคลาดเคลื่อนบ้างเนื่องจากบางครั้งบาดแผลเป็นสะเก็ดและไม่หลุดพร้อมกันทำให้ผลของพื้นที่บาดแผลจะใหญ่กว่าบาดแผลที่มีการหลุดออกของสะเก็ดแล้ว

กลุ่มสุดท้ายคือกลุ่มของสัตว์ทดลองที่กระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าร่วมกับแสง (กลุ่ม LES) มีอัตราการหายของบาดแผลดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับทุกกลุ่มแต่ความแตกต่างระหว่างกลุ่มไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ โดยกลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าร่วมกับแสงจะมีอัตราการหายของบาดแผลในวันที่ 7 (รูปที่ 3.6) ของการทดลองมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 65 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 3.5) และเริ่มเกิดการหลุดของสะเก็ดแผลในช่วงวันที่ 9 ถึง 10 ของการทดลอง โดยในกลุ่มนี้ผลของอัตราการหายของบาดแผลจะรวดเร็วมากในช่วงต้นของการทดลองแต่จะเริ่มชะลอลงเมื่อเข้าสู่ช่วงสะเก็ดแผลหลุด และจะมีผลใกล้เคียงกับกลุ่มที่ทำการรักษาด้วยวิธีอื่นวันที่ 14 ของการทดลองดังแสดงในรูปที่ 3.6 และบาดแผลมีการหายสนิทในช่วงวันที่ 13 และวันที่ 14 ของการทดลอง



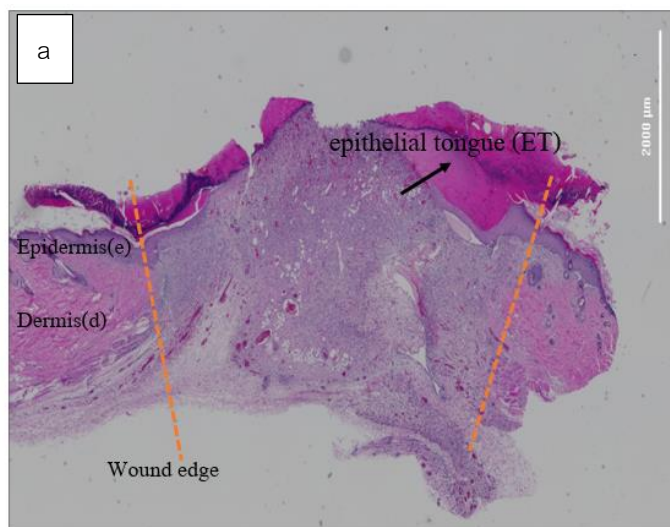
รูปที่ 3.5 ภาพบาดแผลของหนูแต่ละกลุ่มการทดลอง ณ วันแรก วันที่ 7 14 และ 21 ของกลุ่มควบคุม (CON) กลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้า (ES) กลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วยแสง (LED) และกลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าร่วมกับแสง (LES)



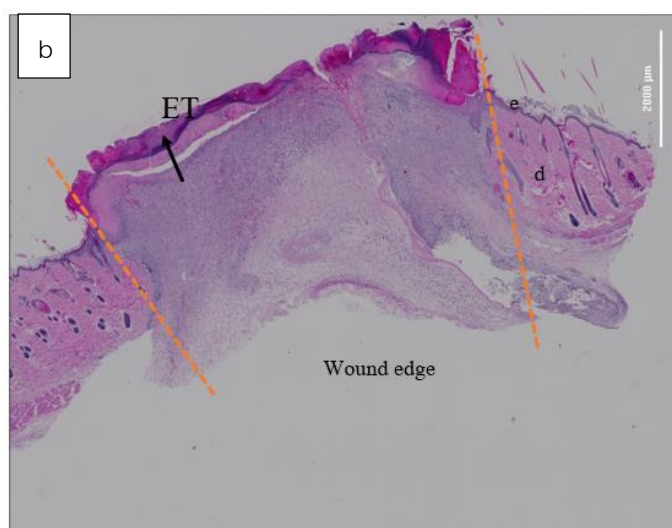
รูปที่ 3.6 กราฟแสดงอัตราการทำลายของบาดแผลในแต่ละกลุ่มการทดลอง กลุ่มควบคุม (CON) กลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้า (ES) กลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วยแสง (LED) และกลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าร่วมกับแสง (LES) โดยวันที่ 1 ถึง 7 มีจำนวนสัตว์ทดลอง 18 ตัว วันที่ 8 ถึง 14 มีจำนวนสัตว์ทดลอง 12 ตัว และวันที่ 15 ถึง 21 มีจำนวนสัตว์ทดลอง 6 ตัวในกลุ่ม ES และ CON และในกลุ่ม LES และ LED ในวันที่ 1 ถึง 7 มีจำนวนสัตว์ทดลอง 15 ตัว วันที่ 8 ถึง 14 มีจำนวนสัตว์ทดลอง 9 และ 8 ตัว และวันที่ 15 ถึง 21 จะมีจำนวนสัตว์ทดลอง 3 ตัว

3.3 ผลการย้อมด้วย Hematoxylin and Eosin (H&E)

จากการย้อมชิ้นเนื้อที่ตัดจากบาดแผลของสัตว์ทดลองด้วยเทคนิค H&E พบว่าการสร้างตัวบริเวณบาดแผลของกลุ่มควบคุม มีการสร้างตัวของชั้นหนังกำพร้า (Epidermis) และชั้นที่ลึกลงมา น้อยกว่ากลุ่มอื่นในวันที่ 7 (รูปที่ 3.7 a) และ วันที่ 14 (รูปที่ 3.8a) นอกจากนี้กลุ่มควบคุมยังมีผลของการสร้างตัวในชั้นหนังแท้ (Dermis) น้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับการรักษาอีกด้วย เมื่อเปรียบเทียบผลจากภาพดังแสดงใน รูปที่ 3.7 จะเห็นได้ว่าในวันที่ 7 ผลจากกลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าร่วมกับแสง (รูปที่ 3.7 d) มีความหนาแน่นในชั้นของหนังแท้มากกว่ากลุ่มควบคุม ดูได้จากช่องว่างภายใต้ผิวหนังที่มีน้อยกว่า ในวันที่ 14 ของการทดลองภาพที่ย้อมได้แสดงถึงการสร้างตัวของชั้นหนังกำพร้าที่เริ่มแบ่งชั้นอย่างเป็นระเบียบดูได้จากลูกศรในภาพ ชั้นผิวหนังเริ่มแบ่งชั้นไม่มีช่องว่างขนาดใหญ่ โดยรูปที่ 3.8 a ยังมีบาดแผลหลงเหลืออยู่เล็กน้อยแต่มีการสร้างชั้นผิวหนังออกมาให้เห็นลักษณะคล้ายกับรูปที่ 3.8 b สำหรับวันที่ 21 ทุกกลุ่มการทดลองมีผลการย้อมและการเกิดขึ้นของผิวหนังใหม่ที่คล้ายคลึงกันดังรูปที่ 3.9

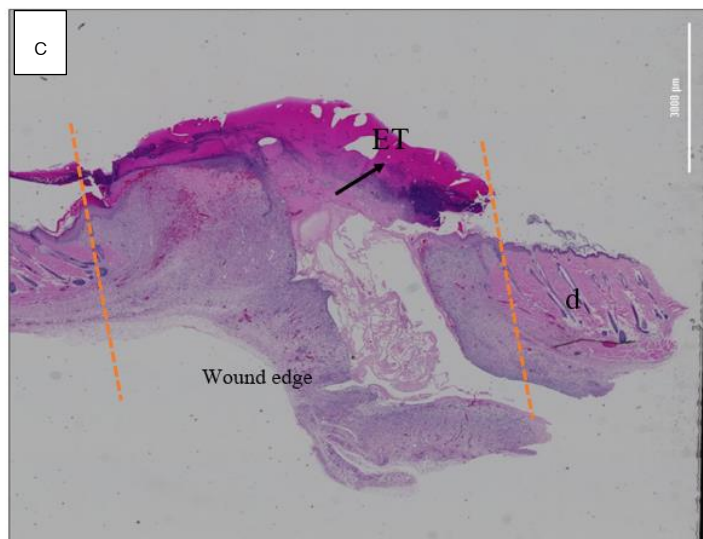


CON 7 days

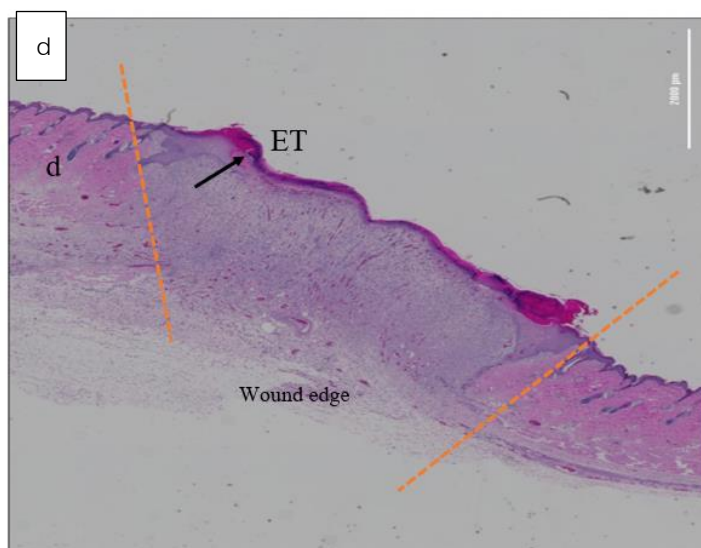


ES 7 days

รูปที่ 3.7 ตัวอย่างผลการย้อม Hematoxylin & Eosin ในกลุ่มทดลองแต่ละกลุ่ม (a) กลุ่มควบคุม 7 วัน (b) กลุ่มกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้า 7 วัน โดยบริเวณที่ถูกครีชีคือ หนังกำพร้าว (ET) เส้นประสีส้ม คือ บริเวณขอบของบาดแผล e คือชั้นหนังกำพร้าว และ d คือชั้นหนังแท้ โดยกำลังขยายที่ใช้ในการถ่ายภาพคือ 20 เท่า



LED 7 days

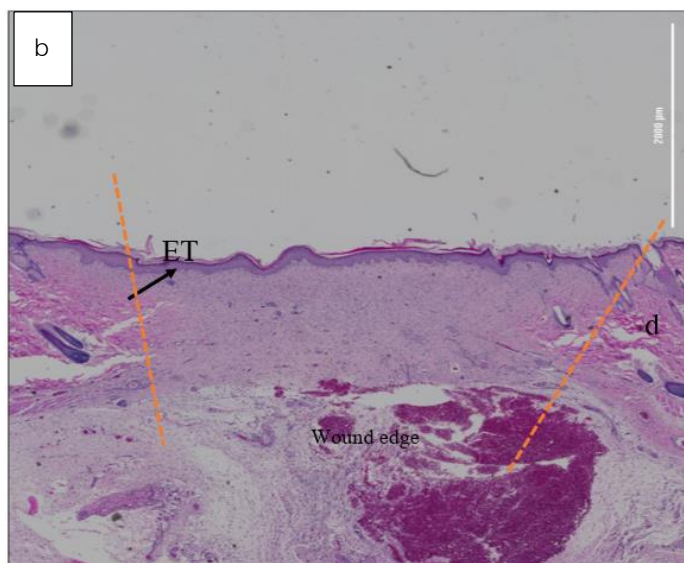


LES 7 days

รูปที่ 3.7 (ต่อ) ตัวอย่างผลการย้อม Hematoxylin & Eosin ในกลุ่มทดลองแต่ละกลุ่ม (c) กลุ่มกระตุ้นด้วยแสง 7 วัน และ (d) กลุ่มกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าร่วมกับแสง 7 วัน โดยบริเวณที่ลูกศรชี้คือหนังกำพร้า (ET) เส้นประสีส้มคือ บริเวณขอบของบาดแผล e คือชั้นหนังกำพร้า และ d คือชั้นหนังแท้ โดยกำลังขยายที่ใช้ในการถ่ายภาพคือ 20 เท่า

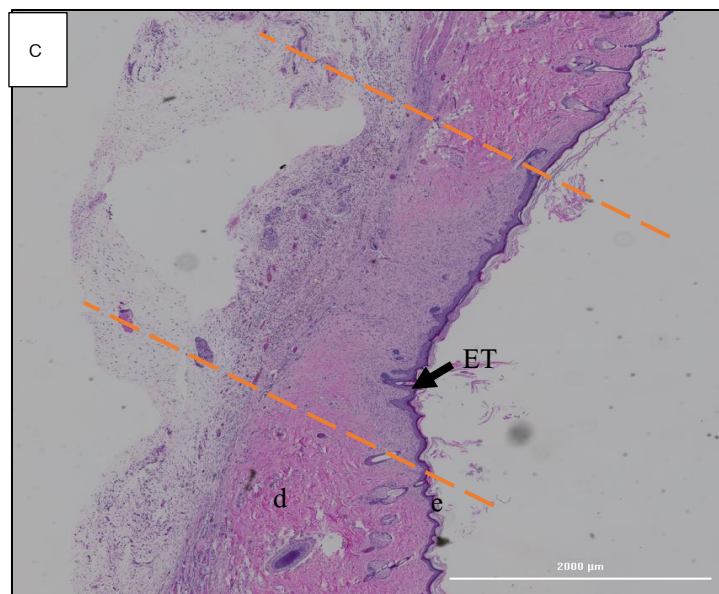


CON 14 days

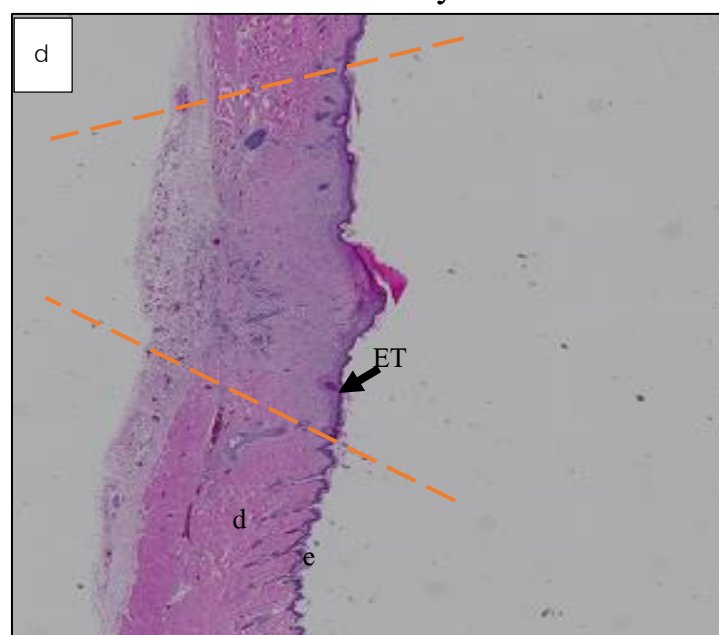


LES 14 days

รูปที่ 3.8 Hematoxylin and eosin stain (a) กลุ่มควบคุม 14 วัน (b) กลุ่มกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าร่วมกับแสง 14 วัน โดยบริเวณที่ถูกสรจี้คือ หน้ากำพวด (ET) เส้นประสีส้ม คือ บริเวณขอบของบาดแผล e คือชั้นหน้ากำพวด และ d คือชั้นหนังแท้ โดยกำลังขยายที่ใช้ในการถ่ายภาพคือ 20 เท่า

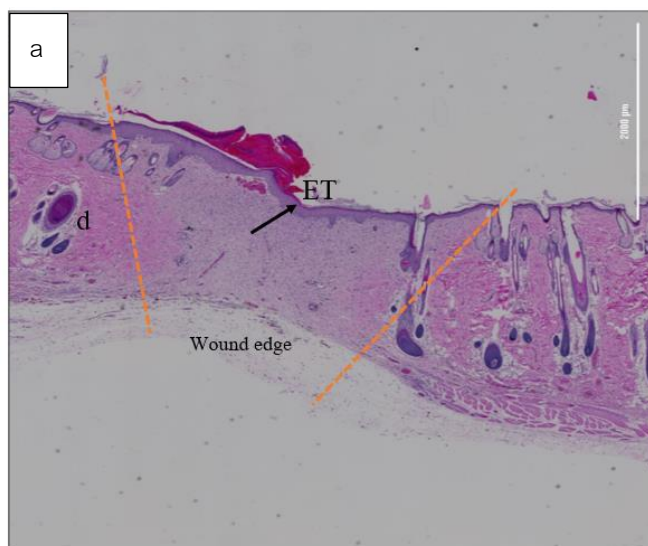


ES 14 Days

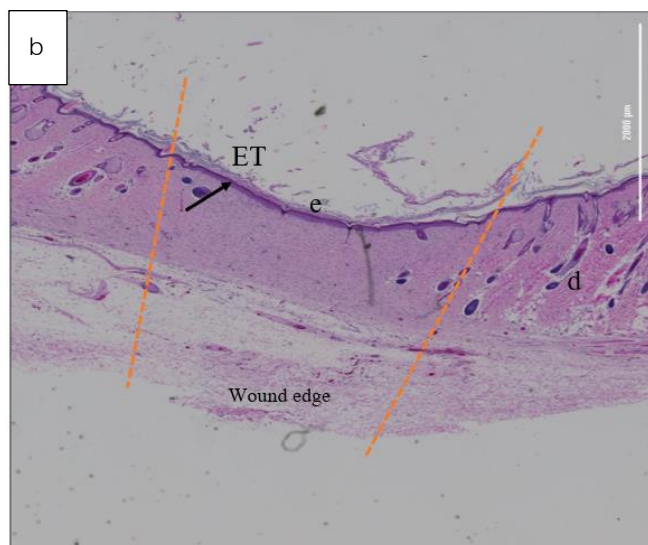


LED 14 Days

รูปที่ 3.8 (ต่อ) Hematoxylin and eosin stain (c) กลุ่มกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้า 14 วัน (d) กลุ่มกระตุ้นด้วยแสง 14 วัน โดยบริเวณที่ลูกศรชี้คือ หนังกำพร้าว (ET) เส้นประสีส้ม คือ บริเวณขอบของบาดแผล e คือชั้นหนังกำพร้าว และ d คือชั้นหนังแท้ โดยกำลังขยายที่ใช้ในการถ่ายภาพคือ 20 เท่า



CON 21 days

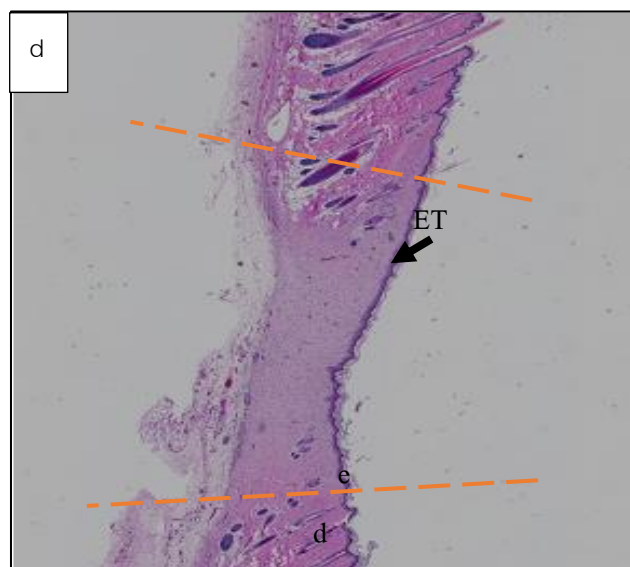


LES 21 days

รูปที่ 3.9 Hematoxylin and eosin stain (a).กลุ่มควบคุม 21 วัน (b).กลุ่มกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้า 21 วัน โดยบริเวณที่ลูกศรชี้คือ หนังก่ำพริ้ว (ET) เส้นประสีส้ม คือ บริเวณขอบ ของบาดแผล e คือชั้น หนังก่ำพริ้ว และ d คือชั้นหนังแท้ โดยกำลังขยายที่ใช้ในการถ่ายภาพคือ 20 เท่า



ES 21 Days

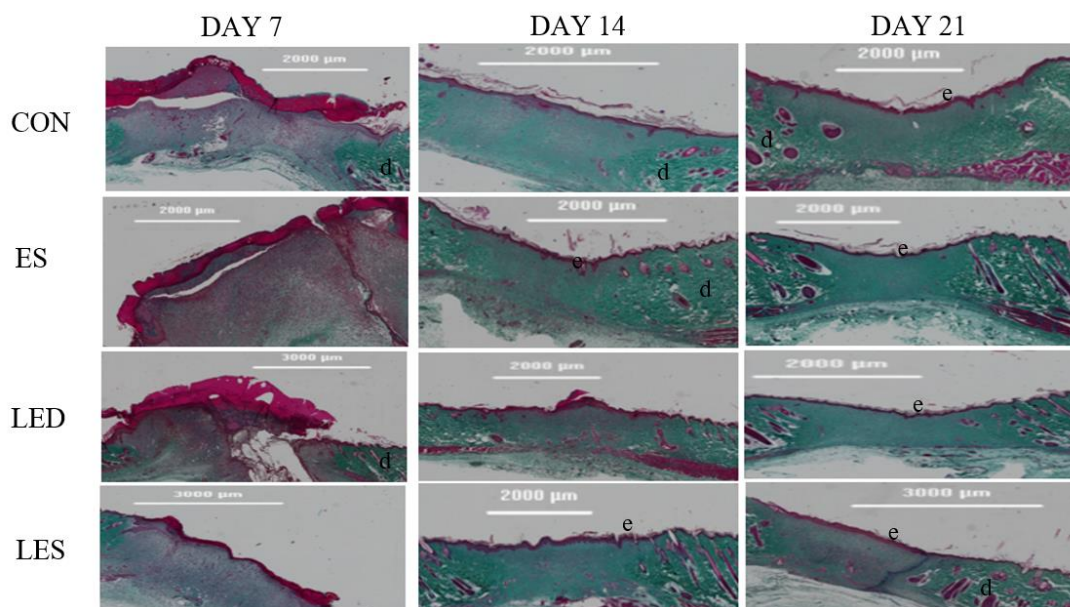


LED 21 Days

รูปที่ 3.9 (ต่อ) Hematoxylin & Eosin stain (c) กลุ่มกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้า 21 วัน (d) กลุ่มกระตุ้นด้วยแสง 21 วัน โดยบริเวณที่ถูกรักษา คือ ผนังกล้ามเนื้อหัวใจ (ET) เส้นประสีส้ม คือ บริเวณขอบของบาดแผล e คือชั้นผนังกล้ามเนื้อหัวใจ และ d คือชั้นผนังหัวใจ โดยกำลังขยายที่ใช้ในการถ่ายภาพคือ 20 เท่า

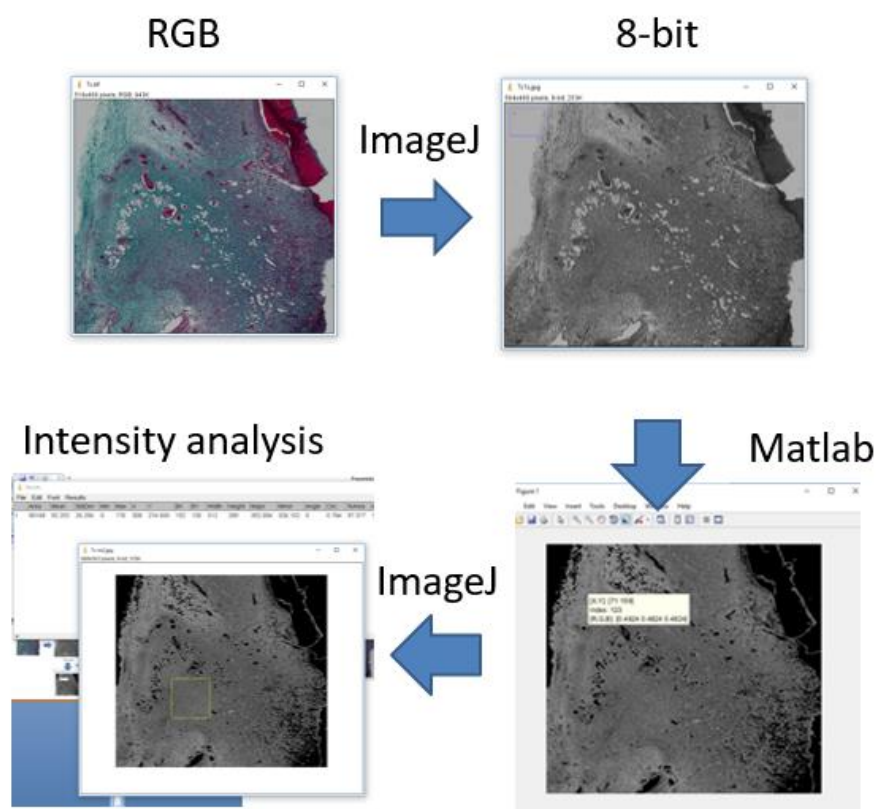
3.4 ผลจากการย้อมด้วย Masson's trichrome

การย้อมด้วย Masson's trichrome เพื่อให้ทราบถึงปริมาณของคอลลาเจนซึ่งเป็นองค์ประกอบของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (Connective tissue) โดยสีเขียวที่ย้อมติดจะแสดงถึงปริมาณของคอลลาเจนที่มี ผลที่ได้คือจากภาพในวันที่ 7 ของการทดลองปริมาณของคอลลาเจนในกลุ่มควบคุมนั้นมีการสร้างไม่เต็มพื้นที่และยังมีช่องว่างอยู่พอสมควรแต่ในกลุ่มที่มีการรักษาด้วยการกระตุ้นด้วยแสงอย่างเดียวและกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าอย่างเดียวนั้นจะมีการสร้างคอลลาเจนที่เต็มมากกว่ากลุ่มควบคุมแต่ยังมีปริมาณของสีแดงปนสีเขียวอยู่มากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าร่วมกับแสง ดังแสดงในรูปที่ 3.10 แนวตั้งที่ 1 และในวันที่ 14 ของการทดลองพบว่าแต่ละกลุ่มมีปริมาณคอลลาเจนที่ถูกสร้างมากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับวันที่ 7 ของการทดลองเนื่องจากมีพื้นที่ที่เป็นสีเขียวมากขึ้นเมื่อทำการเปรียบเทียบปริมาณคอลลาเจนที่ถูกสร้างขึ้นในแต่ละกลุ่มพบว่ากลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นมีปริมาณคอลลาเจนมากกว่ากลุ่มควบคุมอยู่เล็กน้อยเนื่องจากพื้นที่สีเขียวมีไม่แตกต่างกันมากนัก (รูปที่ 3.10 แถวแนวตั้งที่ 2) สำหรับวันที่ 21 ของการทดลองพบว่าปริมาณของคอลลาเจนแต่ละกลุ่มมีค่าใกล้เคียงกันมากเมื่อดูจากพื้นที่ที่มีสีเขียว (รูปที่ 3.10 แถวแนวตั้งที่ 3)

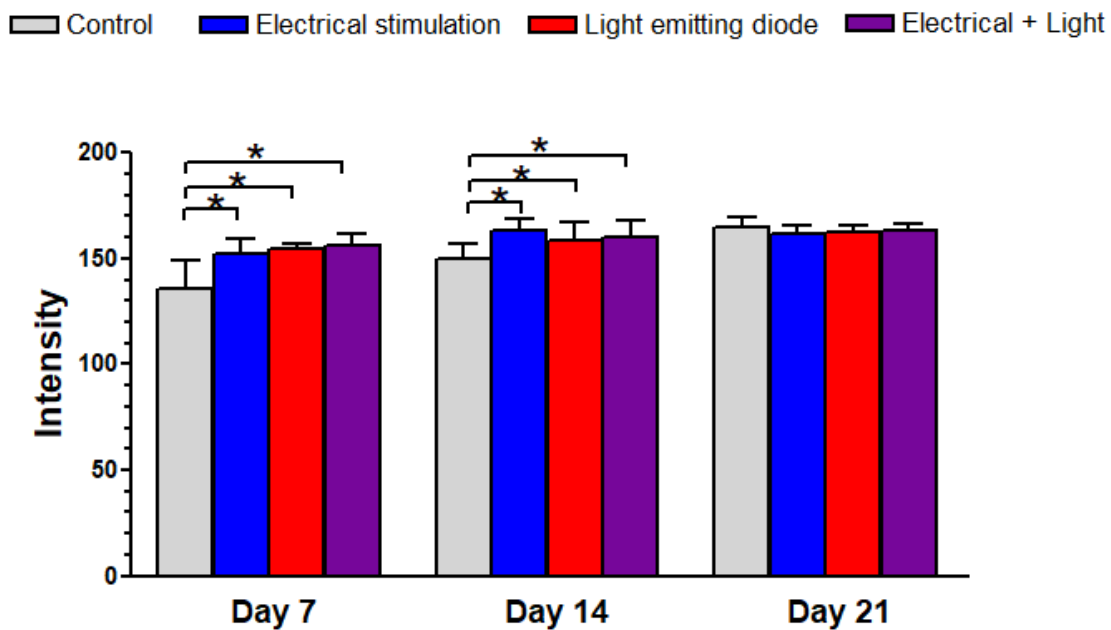


รูปที่ 3.10 ตัวอย่างภาพชิ้นเนื้อที่ย้อมด้วย Masson's trichrome ณ วันที่ 7 14 และ 21 ของการทดลองสำหรับกลุ่มควบคุม (CON) กลุ่มกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้า (ES) กลุ่มกระตุ้นด้วยแสง (LED) และกลุ่มกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าร่วมกับแสง (LES) โดยสีแดงแสดงถึงชั้นหนังกำพร้า สีเขียวแสดงถึงคอลลาเจน

เมื่อนำภาพของชิ้นเนื้อบริเวณบาดแผลที่ผ่านการย้อม Masson's trichrome มาหาปริมาณของคอลลาเจนด้วยเทคนิคการวิเคราะห์ภาพดิจิทัลด้วยโปรแกรม ImageJ ตามขั้นตอนที่แสดงดังรูปที่ 3.11 โดยเริ่มต้นจากการใช้โปรแกรม ImageJ แปลงชนิดของภาพจากรูปสี RGB เป็นภาพ 8-bit grayscale จากนั้นใช้โปรแกรม Matlab ที่เขียนขึ้นในการแปลงภาพ 8-bit grayscale เพื่อปรับค่าพิกเซล (Pixel) ของภาพให้บริเวณที่เป็นสีเขียวเด่นชัดขึ้นแล้วนำมาหาค่าของปริมาณคอลลาเจนโดยใช้โปรแกรม ImageJ แปลงผลจากตัวเลขของความเข้มของพิกเซลที่มาจากพื้นที่สีเขียวซึ่งสัมพันธ์กับปริมาณของคอลลาเจนแสดงให้เห็นว่าทุกกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นมีปริมาณของคอลลาเจนในวันที่ 7 มากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (รูปที่ 3.12) และในวันที่ 14 ของการทดลองผลจากการย้อม Masson's trichrome ก็ยังแสดงให้เห็นว่ากลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นมีปริมาณคอลลาเจนมากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่วันที่ 21 ของการทดลองในแต่ละกลุ่มมีปริมาณคอลลาเจนที่ไม่แตกต่างกันดังแสดงในรูปที่ 3.12



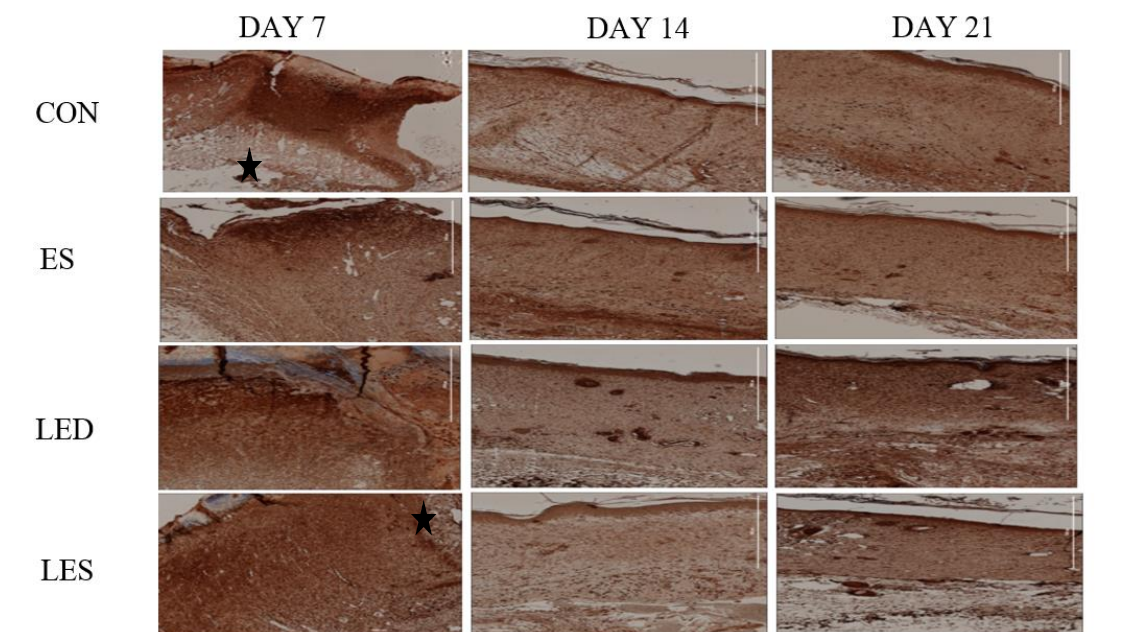
รูปที่ 3.11 ขั้นตอนการใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำหรับหาค่าปริมาณคอลลาเจนจากภาพดิจิทัลของชิ้นเนื้อที่ผ่านการย้อม Masson's trichrome



รูปที่ 3.12 ผลการตรวจสอบปริมาณของคอลลาเจน โดยใช้โปรแกรมวัดค่าความเข้มของสีจากการย้อมด้วย Masson's trichrome ในกลุ่มการทดลองแต่ละกลุ่มเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดย * หมายถึง $p < 0.05$

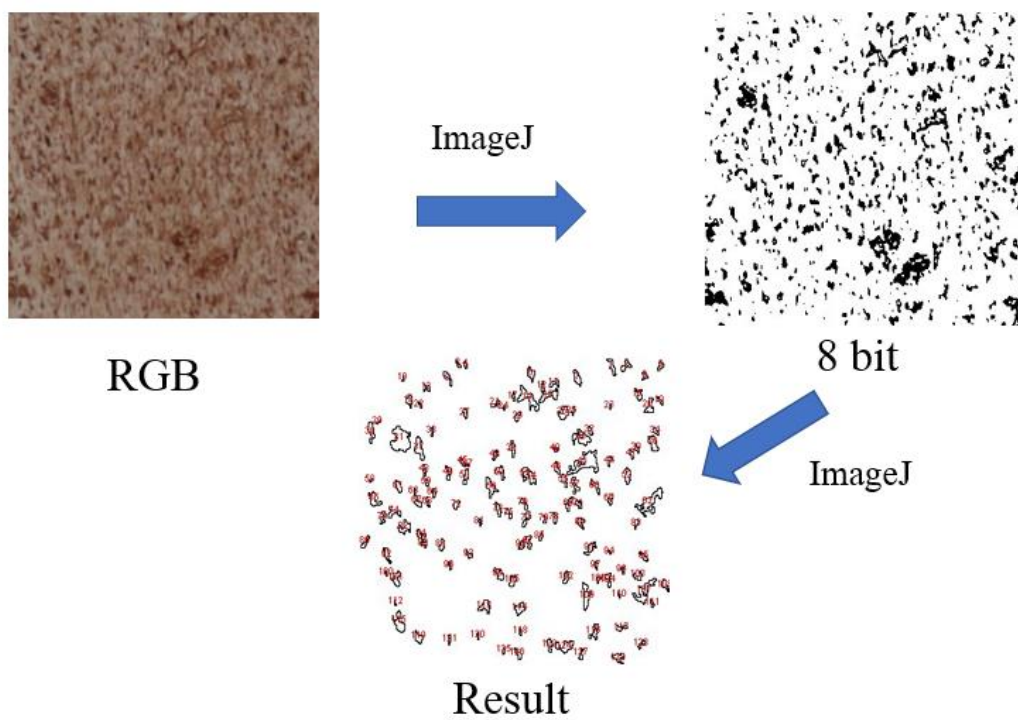
3.5 ผลการศึกษาทางอิมมูโนฮิสโตเคมี (Immunohistochemistry)

การย้อมทางอิมมูโนฮิสโตเคมีทำให้ทราบถึงปริมาณของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (Fibroblast cell) ซึ่งเป็นเซลล์ที่เกี่ยวข้องในการสร้างเนื้อเยื่อ จากรูปที่ 3.13 พบว่าสีน้ำตาลที่ย้อมติดขึ้นเนื้อแสดงให้เห็นว่าปริมาณของไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์ (Fibroblast growth factor) ในวันที่ 7 ของการทดลองในแต่ละกลุ่มค่าใกล้เคียงกัน เมื่อนำแต่ละกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่มีการกระตุ้นด้วยแสงอย่างเดียวยุติเปรียบเทียบกับกลุ่มอื่นจะพบว่าทั้ง 2 กลุ่มนี้มีช่องว่างอยู่เล็กน้อยซึ่งสามารถดูได้จากรูปที่ 3.13 ในแถวแนวตั้งที่ 1 หลังจากนั้นในวันที่ 14 จากภาพแสดงให้เห็นว่าแต่ละกลุ่มมีการสร้างไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์จนเต็มบริเวณ และมีการย้อมติดไปถึงผิวหนังกำพร้าอีกด้วยจึงแสดงให้เห็นว่าเมื่อผ่านไป 14 วันชั้นผิวหนังกำพร้าเริ่มมีการสร้างตัวจนเกือบสมบูรณ์และในวันที่ 21 ของการทดลองบริเวณที่ได้รับการย้อมเต็มไปด้วยสีน้ำตาลที่ไม่มีช่องว่างปรากฏมากเหมือนในวันที่ 7 ของการทดลอง และยังพบว่า ณ วันที่ 14 และ 21 ของการทดลองกลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าร่วมกับแสงมีการเปลี่ยนแปลงในชั้นเนื้อเยื่อ โดยมีลักษณะของเนื้อเยื่อใกล้เคียงกับเนื้อเยื่อธรรมชาติมากขึ้น เนื่องจากบริเวณชั้นหนังแท้ที่เริ่มมีช่องว่างลักษณะกลมคล้ายกับบริเวณเนื้อเยื่อปกติ

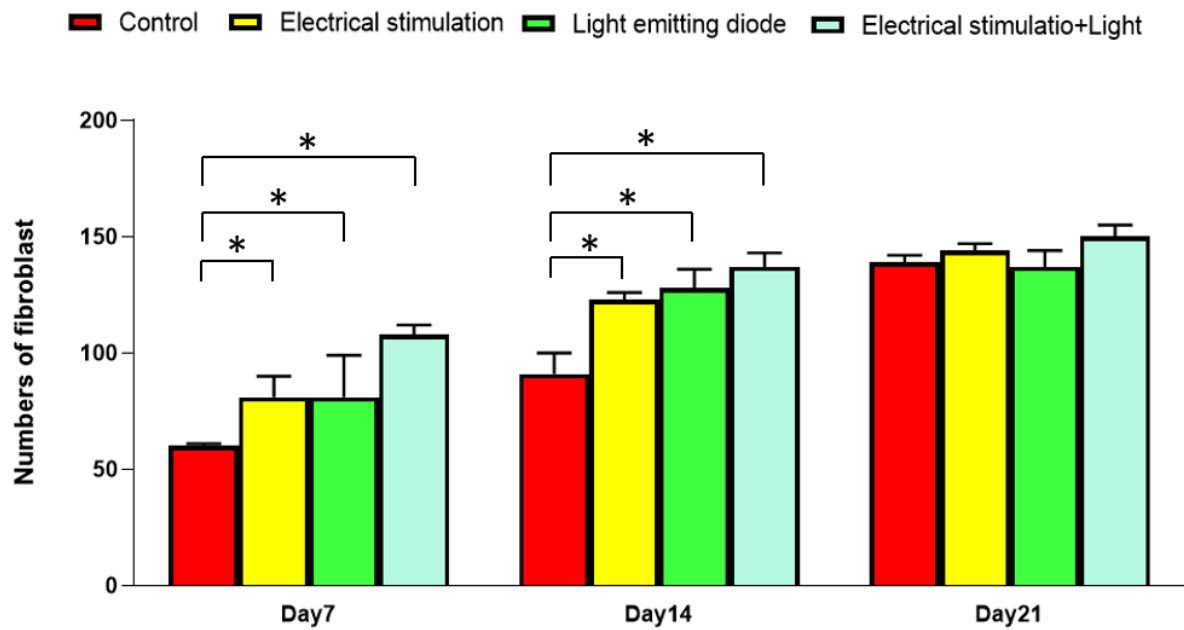


รูปที่ 3.13 ตัวอย่างภาพชิ้นเนื้อที่ย้อมทางอิมมูโนฮิสโตเคมี (Immunohistochemistry) ณ วันที่ 7 14 และ 21 ของกลุ่มควบคุม (CON) กลุ่มกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้า (ES) กลุ่มกระตุ้นด้วยแสง (LED) และกลุ่มกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าร่วมกับแสง (LES) โดยมีสเกลบาร์ 1000 ไมโครเมตร โดย ★ แสดงถึงช่องว่างภายในชิ้นเนื้อ

เมื่อนำภาพของชิ้นเนื้อบริเวณบาดแผลที่ผ่านการย้อมหาปริมาณไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์ ด้วยโปรแกรม ImageJ ตามขั้นตอนที่แสดงในรูปที่ 3.14 โดยเริ่มต้นจากการปรับค่า Threshold ของภาพเพื่อให้สิ่งที่สนใจเด่นขึ้นในที่นี้คือเซลล์ไฟโบรบลาสต์ซึ่งถูกย้อมติดสีน้ำตาลแล้วทำการแปลงภาพให้เป็นภาพ 8-bit ขาว - ดำ จากนั้นจะใช้ฟังก์ชันในการนับเซลล์ที่อยู่ในโปรแกรม ImageJ เพื่อเป็นการนับเซลล์ไฟโบรบลาสต์ซึ่งสัมพันธ์กับปริมาณไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์ที่ถูกสร้างขึ้น และพบว่าในกลุ่มควบคุมมีค่าจำนวนเซลล์ไฟโบรบลาสต์น้อยที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่มีการกระตุ้น และ ณ วันที่ 14 ของการทดลองจะพบว่าปริมาณของไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์เพิ่มมากยิ่งขึ้นในกลุ่มที่มีการกระตุ้น ทั้งนี้การเพิ่มขึ้นเป็นการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ สำหรับวันที่ 21 ของการทดลองกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นจะสร้างไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์ในปริมาณที่ใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุมดังแสดงในรูปที่ 3.15



รูปที่ 3.14 ขั้นตอนการหาปริมาณไฟโบรบลาสต์โกรทแฟคเตอร์โดยการนับจำนวนเซลล์ไฟโบรบลาสต์ด้วยโปรแกรม ImageJ ด้วยการย้อมทางอิมมูโนฮิสโตเคมี (Immunohistochemistry)



รูปที่ 3.15 จำนวนเซลล์ไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์ที่นับด้วยโปรแกรม ImageJ ในกลุ่มการทดลองแต่ละกลุ่มเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดย * หมายถึง $p < 0.05$

บทที่ 4

วิจารณ์ผลการศึกษา

4.1 การหายของบาดแผลเมื่อใช้เครื่องกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าและเครื่องกระตุ้นด้วยแสง

เครื่องกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าสามารถใช้งานได้และปรับค่าได้หลายช่วงตามความต้องการ โดยสัญญาณที่ได้เป็นแบบระลอกคลื่นซึ่งส่งผลให้มีการสั้นเล็กน้อยในการทดลอง โดยที่กระแสไฟฟ้า $10 \mu\text{A}$ ไม่เป็นอันตรายกับสัตว์ทดลอง นอกจากนี้ตัวเครื่องยังสามารถปรับค่าความถี่และช่วงเวลาได้ เพื่อให้ได้ค่าของกระแสไฟฟ้าตามช่วงที่ต้องการ โดยผลที่ได้จากการศึกษาในบทที่ 3 มีผลไปในทางเดียวกันกับรายงาน Fernanda Oliveira de G et.al (12) ซึ่งกระแสไฟฟ้าที่ใช้มีหน่วยไมโครแอมแปร์สามารถส่งผลต่อการหายของบาดแผล ด้วยการช่วยเพิ่มการทำงานของระบบการรักษาตัวเองบริเวณผิวหนัง เช่น การสร้างคอลลาเจน หรือ การเร่งการทำงานของเซลล์ที่ตามช่องของประจุของเซลล์ภายใต้ผิวหนังซึ่งสามารถทำให้ส่งผลต่อการหายของบาดแผลได้รวดเร็วยิ่งขึ้น (12)

เครื่องกระตุ้นด้วยแสงสามารถปลดปล่อยแสงที่ค่าของความยาวคลื่นได้ตามต้องการ อีกทั้งแสงที่ได้ยังเป็นแสงสีแดงไม่ทำให้เกิดการเผาไหม้บริเวณผิวหนังเนื่องจากค่าของความร้อนไม่ได้มากจนเกินไป โดยผลที่ได้จากการปรับอุปกรณ์เพื่อให้หลอดไดโอดเปล่งแสงสีแดงกระพริบน้อยที่สุดถือว่าสามารถนำมาใช้งานเพื่อทดลองดูผลที่ได้จากการรักษาด้วยการกระตุ้นด้วยแสง โดยแสงที่ใช้มีความยาวคลื่นที่ 600 นาโนเมตรขึ้นไป จะส่งผลต่อไมโทคอนเดรียภายในเซลล์บริเวณบาดแผลและผิวหนังดังรายงานของ Li et al. (7) นอกจากนี้ยังมีงานทางด้านการศึกษาการกระตุ้นด้วยแสงงานอื่นที่ได้ผลไปในทางเดียวกันกับงานของ Li et al. เช่นงานของ Nogueira VC et al.(14) ทำให้ผลที่ได้จากการทดลองคือการกระตุ้นด้วยการใช้แสงมีผลต่อการหายของบาดแผลในด้านขนาด และปริมาณเซลล์ภายใต้ผิวหนังทำได้ด้วยการกำหนดค่าความยาวคลื่นและสีของแสงที่ใช้เป็นเบื้องต้น

สำหรับระยะเวลาที่ใช้ในการกระตุ้นที่มากหรือน้อยมีผลต่อการหายของบาดแผลเล็กน้อยสอดคล้องกับการศึกษาของ Li et al. (7) ที่รายงานแสดงให้เห็นว่าเวลาที่กระตุ้นด้วยแสงเพิ่มขึ้นไม่ส่งผลให้บาดแผลหายเร็วขึ้น

นอกจากนี้จากการศึกษาก่อนหน้าแสดงให้เห็นถึงการเพิ่มและลดความต่างศักย์ไฟฟ้าล้วนมีผลต่อการหายของบาดแผล และในส่วนของการศึกษาการกระตุ้นด้วยแสงแสดงให้เห็นว่าแสงที่มีความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร มีผลต่อการกระตุ้นตัวรับสัญญาณภายใต้ผิวหนัง ส่งผลให้แสงสีแดงจากหลอดไดโอดเปล่งแสงสามารถทำให้ขนาดของบาดแผลมีขนาดเล็กลง

4.2 ผลการคำนวณพื้นที่บาดแผลจากภาพดิจิทัล

จากผลการศึกษาอัตราการหายของบาดแผลในช่วง 7 วันแรกของการทดลองแสดงให้เห็นว่าบาดแผลหายได้เร็วมากในกลุ่มที่ได้รับการรักษาเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับการรักษา เนื่องจากขนาดของบาดแผลที่คำนวณได้จากโปรแกรม ImageJ สำหรับสัตว์ทดลองในกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าพร้อมกับแสงมีขนาดเล็กลงประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ จากบาดแผลในวันแรก ในขณะที่ขนาดของบาดแผลของสัตว์ทดลองในกลุ่มควบคุมมีขนาดเล็กลงประมาณ 40 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับงานอื่นพบว่าผลที่ได้เป็นที่น่าพอใจเนื่องจากอัตราการหายของบาดแผลจะอยู่ในช่วง 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อได้รับการรักษาด้วยแสงหรือกระแสไฟฟ้าในช่วง 7 วันแรกของการทดลอง (6,7) และนอกจากนี้กลุ่มสัตว์ทดลองที่ได้รับการกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าจะมีการแห้งของบาดแผลที่รวดเร็วกว่ากลุ่มอื่นเนื่องด้วยเกิดการกระตุ้นการหายของบาดแผลซึ่งเกิดจากเซลล์ภายใต้ผิวหนังถูกกระตุ้นทำให้เกิดการเพิ่มการทำงานต่อเซลล์ภายใต้ผิวหนัง โดยทั่วไปการกระตุ้นมักส่งผลให้ DNA สามารถถูกสังเคราะห์ได้มากตามไปด้วย (12) อย่างไรก็ตามความแตกต่างของขนาดบาดแผลระหว่างกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นจะคงพบได้อย่างชัดเจนในช่วงก่อนวันที่ 14 ของการทดลองแม้จะไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ และหลังจากวันที่ 14 ไปแล้วขนาดของบาดแผลจะมีอัตราการเปลี่ยนแปลงที่ไม่แตกต่างกันระหว่างกลุ่ม ดังนั้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่กระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าพร้อมกับแสงกับกลุ่มควบคุม สามารถสรุปได้ว่าผลของการกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าพร้อมกับแสงมีผลต่ออัตราการหายตัวของบาดแผลบริเวณผิวหนังในระยะ 14 วันแรก ซึ่งสอดคล้องกับงานของ Li et al. (7) และ Basso et.al (25) โดย 2 งานนี้บาดแผลของกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นจะหายในช่วงวันที่ 11 ถึง 12 ของการทดลอง เมื่อนำกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้ผลการหายของบาดแผลในช่วงของวันที่ 13 ถึง 14 ของการทดลองหรือยังหายไม่สนิทในบางตัวอย่างของกลุ่มควบคุม เนื่องจากการสร้างตัวของผิวหนังบริเวณหนังกำพร้าที่เร็วกว่าเมื่อนำภาพของกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นมาทำการคำนวณและเมื่ออ้างอิงจากงานวิจัยอื่น ๆ ก็พบผลในการหายด้วยการใช้ภาพถ่ายมาตรวจสอบข้อมูลเช่นกัน โดยบาดแผลในกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นจะหายได้เร็วกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับการกระตุ้น (6,7,24)

4.3 ผลการย้อมด้วย Hematoxylin and Eosin

จากการศึกษาผลจากการย้อมด้วย Hematoxylin & Eosin พบว่าในกลุ่มที่มีการกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าร่วมกับแสงมีผลการเกิดใหม่ของเนื้อเยื่อภายใต้ผิวหนังที่ดีมากเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยในวันที่ 7 ของการทดลองพบว่าเนื้อเยื่อที่เต็มมากกว่ากลุ่มอื่น ๆ และในวันที่ 21 ของการทดลองผลที่ได้ยังแสดงให้เห็นว่ากลุ่มกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าร่วมกับแสงมีการเกิดช่องว่างในบริเวณของเนื้อเยื่อซึ่งมีความคล้ายคลึงกับผิวหนังบริเวณที่ไม่ได้รับบาดเจ็บ ทั้งนี้การเกิดใหม่ของเนื้อเยื่อในกลุ่มของการกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าร่วมกับแสงเกิดขึ้นเนื่องจากการเพิ่มปริมาณคอลลาเจนและลดการติดเชื่อบริเวณบาดแผล ซึ่งผลดังกล่าวเหมือนกับรายงานก่อนหน้านี้ที่พบว่า การเพิ่มขึ้นของเนื้อเยื่อในกลุ่มที่ได้รับการรักษาจะพบบริเวณที่มีสีเข้มกว่าและมีการเพิ่มขึ้นของชั้นผิวหนังส่วนนอกมากกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับการรักษา (10,12) นอกจากนี้การสร้างตัวของชั้นผิวหนังกำพร้าในกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าร่วมกับแสงได้ผลดีมากกว่ากลุ่มควบคุมอีกด้วยเมื่อสังเกตในวันที่ 7 และ 14 ของการทดลองซึ่งผลที่ได้นี้สอดคล้องกับงานวิจัยอื่น ๆ (7,10) ที่พบว่าช่วงแรกของการกระตุ้นด้วยแสงหรือกระแสไฟฟ้าจะได้ผลของชั้นผิวหนังกำพร้าที่เต็มมากกว่าเนื่องจากการเพิ่มปริมาณคอลลาเจน อันเป็นผลจากระบบการทำงานของกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าที่ส่งผลต่อการกระตุ้นเซลล์ให้ทำงานมากขึ้นและเร่งกระบวนการทำงานของประจุภายในเซลล์ นอกจากนี้แสงสีแดงที่มีความยาวคลื่น 660 นาโนเมตรก็ส่งผลต่อการทำงานของตัวรับแสงและทำให้เกิดผลตามหลักการของแสงในการกระตุ้นบาดแผลบริเวณผิวหนังให้ทำงานเพิ่มขึ้น ทั้งนี้ปรากฏการณ์ดังกล่าวมีการอธิบายไว้บางส่วนในงานวิจัยของ Li et al. (7) และ de G. de Gaspi et al. (12) ซึ่ง Li et al. ระบุว่าแสงสีแดงสามารถกระตุ้นตัวรับแสงภายในเซลล์ใต้ผิวหนังได้ดีมากที่สุด (7) จึงทำให้ผิวหนังสามารถสร้างตัวได้เร็วยิ่งขึ้น และในกลุ่มที่ได้รับการรักษายังมีพื้นที่ของการย้อมติดสีที่หนาแน่นมากกว่ากลุ่มควบคุมในช่วงวันที่ 7 และ 14 ของการทดลอง นอกจากนี้งานวิจัยของ Li et al. แสดงให้เห็นถึงการเพิ่มขึ้นของคอลลาเจนเมื่อทำการย้อมด้วยวิธี Hematoxylin & Eosin

4.4 ผลการย้อมด้วย Masson's trichrome

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าอัตราการหายของบาดแผลในกลุ่มสัตว์ทดลองที่ได้รับการกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าร่วมกับแสงมีค่าที่ดีกว่ากลุ่มควบคุม ซึ่งจากการศึกษาผลจากการย้อมด้วย Masson's trichrome พบว่ากลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าร่วมกับแสงมีปริมาณคอลลาเจนมากกว่ากลุ่มควบคุม เนื่องจากผลการย้อมพบว่าช่องว่างภายในเนื้อเยื่อผิวหนังมีปริมาณน้อยกว่าและความเข้มของสีที่ย้อมมากกว่า แต่กลุ่มที่กระตุ้นด้วยแสงเพียงอย่างเดียวในช่วง 7 วันแรกมีผลของการหายของบาดแผลไม่ได้ดีเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มการรักษาอื่น ๆ และเมื่อดูจากผลการย้อมด้วย Masson's trichrome ในวันที่ 7 ของการทดลองพบว่าเนื้อเยื่อของกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นด้วยแสงอย่างเดียวจะมีช่องว่างมากเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มการรักษาอื่น ๆ แต่หลังจากวันที่ 7 ผลของการกระตุ้นด้วยแสงเพียงอย่างเดียวกลับมามีค่าเทียบเท่าการรักษาอื่น ซึ่งผลการรักษาด้วยแสงเพียงอย่างเดียวจากงานวิจัยของ Li et al. แสดงให้เห็นว่าแสงสามารถเพิ่มปริมาณของคอลลาเจนภายใต้ผิวหนังให้มีปริมาณรวดเร็วมากกว่ากลุ่มควบคุม (7) และการใช้แสงกระตุ้นยังส่งผลต่อการงอกใหม่ของขนบริเวณผิวหนังอีกด้วย สำหรับวันที่ 14 และ 21 ของการทดลองในกลุ่มที่รักษาด้วยการกระตุ้นต่าง ๆ นั้นยังมีผลที่ดีกว่ากลุ่มควบคุม โดยดูได้จากผลการย้อมด้วย Masson's trichrome ซึ่งสามารถทำให้ทราบปริมาณของคอลลาเจนได้ (7,8) ดังนั้นเมื่อสังเกตผลการย้อมด้วย Masson's trichrome ของงานนี้และเปรียบเทียบกับงานของ Li et al. (7) และ Calisto et al. (8) พบว่าผลที่ได้ไปในทิศทางเดียวกันคือสีการย้อมของเนื้อเยื่อตัวอย่างในกลุ่มที่ได้รับการรักษาจะมีสีที่เข้มกว่ากลุ่มควบคุมที่มีสีจาง เนื่องจากการศึกษาก่อนหน้านี้มีการรายงานว่าแสงและกระแสไฟฟ้าส่งผลต่อการเพิ่มขึ้นของคอลลาเจน (7,10,12) ทำให้บริเวณบาดแผลมีผลการย้อมที่เป็นสีเขียวเข้มกว่ากลุ่มควบคุมในช่วงของการรักษา 14 วันแรก สำหรับวันที่ 21 กลุ่มที่ได้รับการรักษาแสดงให้เห็นว่าการเปลี่ยนแปลงชั้นเนื้อเยื่อไ้มีความคล้ายคลึงกับผิวหนังที่ไม่ได้รับบาดเจ็บซึ่งคือเริ่มมีช่องว่างตามชั้นเนื้อเยื่อมากกว่าวันที่ 14 ของการทดลอง เนื่องมาจากการกระตุ้นของแสงที่บริเวณไมโทคอนเดรียส่งผลต่อการเกิดไฟโบรบลาสต์ และช่วยยับยั้งการติดเชือบริเวณบาดแผล (7) สังเกตได้จากบริเวณเนื้อเยื่อที่ย้อมของกลุ่มที่กระตุ้นด้วยแสงเพียงอย่างเดียวมีสีแดงน้อยกว่ากลุ่มควบคุมจึงสามารถสรุปเบื้องต้นได้ว่าระบบการอักเสบของกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นด้วยแสงเพียงอย่างเดียวใช้ระยะเวลาสั้นลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมเนื่องจากพื้นที่สีเขียวซึ่งสัมพันธ์กับการสร้างคอลลาเจนที่มากกว่าดังนั้นพื้นที่สีแดงคือส่วนที่ยังไม่ได้รักษาตัวอย่างสมบูรณ์ (5-7)

4.5 ผลจากการย้อมด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี

จากการศึกษาผลการย้อมด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี แสดงให้เห็นถึงการเกิดขึ้นของเซลล์ไฟโบรบลาสต์บริเวณภายใต้ผิวหนัง โดยสังเกตจากภาพการย้อมจะมีจุดสีดำเกิดขึ้นซึ่งคือนิวเคลียสของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ เมื่อผ่านไปในช่วงของวันที่ 7 ของการทดลองทำให้สามารถเปรียบเทียบผลจากแต่ละกลุ่มได้โดยกลุ่มควบคุมจะพบลักษณะดังกล่าวน้อยที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับการรักษาจากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่ากระแสไฟฟ้า 10 ไมโครแอมป์ สามารถกระตุ้นให้เกิดการเพิ่มการทำงานของช่องไอออนบริเวณผิวหนัง ทำให้เพิ่มการสร้าง DNA มากยิ่งขึ้น (8,12) และแสงสีแดงที่มีความยาว 600 นาโนเมตรส่งผลต่อการเพิ่มขึ้นของไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์ ซึ่งเป็นพารามิเตอร์หนึ่งที่มีผลต่อการหายของบาดแผล (5-7) ดังนั้นผลที่ได้ต่อการสร้างเซลล์ผิวหนังจึงสังเกตได้อย่างเด่นชัดในภาพที่ได้จากการย้อมอิมมูโนฮิสโตเคมีเพื่อดูไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์ และในวันที่ 14 ของการทดลองจะเห็นได้ว่าในกลุ่มที่ได้รับการรักษายังคงมีลักษณะที่กล่าวข้างต้นมากกว่ากลุ่มควบคุมและเมื่อถึงวันที่ 21 ของการทดลองลักษณะดังกล่าวของทุกกลุ่มที่ได้รับการรักษาจะเริ่มลดน้อยลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ทั้งนี้เนื่องมาจากเมื่อถึงระยะการเรียงตัวของเซลล์จะทำให้เกิดการสลายตัวของเซลล์ผิวหนัง (13) ทำให้ผลจากการย้อมเพื่อดูไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์ ที่ได้ในช่วงวันที่ 21 ของการทดลอง ในกลุ่มที่ได้รับการรักษามีค่าความเข้มของการย้อมใกล้เคียงกลุ่มควบคุม แต่อย่างไรก็ตามลักษณะที่ได้จากภาพแสดงให้เห็นถึงความใกล้เคียงของผิวหนังบริเวณบาดแผลในกลุ่มที่ได้รับการรักษาเปรียบเทียบกับผิวหนังปกติพบว่ามีความใกล้เคียงกันมากยิ่งขึ้นเมื่อดูจากผลภาพการย้อม

บทที่ 5

บทสรุป

5.1 ผลสรุป

วัตถุประสงค์ของการศึกษาในครั้งนี้คือ ประดิษฐ์เครื่องต้นแบบของการรักษาบาดแผลที่เกิดขึ้นบริเวณผิวหนังโดยการกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าร่วมกับการกระตุ้นด้วยแสงในสัตว์ทดลองที่สามารถนำไปใช้เป็นพื้นฐานสำหรับการทำเครื่องมือที่ใช้กับผู้ป่วยได้ นอกจากนี้เพื่อศึกษาผลของการใช้งานร่วมกันระหว่างการกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าและการกระตุ้นด้วยแสงต่อการหายของบาดแผลเมื่อเปรียบเทียบกับบาดแผลที่หายตามธรรมชาติ

จากวัตถุประสงค์ของการทดลองและการทดลองผลที่ได้ แสดงให้เห็นว่าการสร้างเครื่องต้นแบบทั้งสองเครื่องสามารถสร้างออกมาได้ตรงตามความต้องการ และเครื่องกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าสามารถส่งผ่านกระแสไฟฟ้าได้ตามต้องการคือช่วง 10 ไมโครแอมป์ สามารถปรับค่าต่าง ๆ ได้เพื่อให้เครื่องสามารถส่งผ่านกระแสไฟฟ้าได้หลาย ๆ ค่าซึ่งตัวเครื่องไม่สร้างความร้อนต่อสัตว์ทดลอง และไม่เป็นอันตรายจนถึงชีวิตเมื่อใช้กับสัตว์ทดลอง นอกจากนี้เนื่องจากตัวเครื่องกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าสามารถปรับค่าของความถี่ได้จึงทำให้กระแสไฟฟ้าที่ได้มีความรุนแรงในการกระตุ้นบาดแผลเนื่องจากเป็นระบบแบบลูกคลื่นดังนั้นเครื่องกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าที่ได้จึงสามารถนำไปใช้และทำให้ผลการทดลองที่ได้นั้นเป็นไปตามความต้องการคือสามารถกระตุ้นการหายของบาดแผลบริเวณผิวหนังได้อย่างรวดเร็วเมื่อนำผลไปเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับการรักษา และในส่วนของเครื่องกระตุ้นด้วยแสงสามารถปลดปล่อยแสงเป็นแสงสีแดงขนาดความยาวคลื่น 660 นาโนเมตรซึ่งตรงตามความต้องการและค่าของพลังงานที่ได้จากเครื่องกระตุ้นด้วยแสงก็เป็นตามความต้องการเช่นกันและแสงจากเครื่องก็ไม่ส่งผลร้ายต่อผิวหนังเช่น ไม่เกิดความร้อนจนผิวหนังไหม้ นอกจากนี้แสงยังสามารถเพิ่มกระบวนการรักษาตัวของบาดแผลบริเวณผิวหนังได้อีกด้วยดังนั้นเครื่องกระตุ้นทั้งสองเครื่องถ้าปรับค่าให้เหมาะสมอาจจะสามารถนำไปทดลองใช้กับผู้ป่วยที่มีบาดแผลเปิดบริเวณผิวหนังในระดับ 0 ถึง ระดับ 2 แล้วช่วยให้ดีขึ้นได้เนื่องจากเครื่องกระตุ้นที่ประดิษฐ์ขึ้นเหล่านี้ไม่ส่งผลกระทบร้ายแรงต่อผิวหนังของสัตว์ทดลอง

สำหรับการใช้กระแสไฟฟ้าร่วมกับแสงเพื่อการกระตุ้นนั้นแสดงให้เห็นว่าเมื่อใช้งานร่วมกันสามารถส่งผลต่อการหายของบาดแผลที่รวดเร็วมากยิ่งขึ้นเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มรักษาอื่น และผลที่ได้ทำให้ทราบอีกว่าเมื่อนำวิธีการกระตุ้นทั้งสองวิธีมาใช้งานร่วมกันสามารถช่วยในส่วนของอาการแสบของบาดแผล และการลดลงของพื้นที่บาดแผลแต่ไม่ได้เด่นมากจนเห็นความแตกต่างมากมายในการเปรียบเทียบผลกับกลุ่มการทดลองที่ได้รับการกระตุ้นวิธีเดียว หาก

เปรียบเทียบกับบาดแผลที่หายตามธรรมชาติแล้วบาดแผลจากการกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าร่วมกับแสงจะเห็นได้ว่าอัตราการหายของบาดแผลที่ได้รับการกระตุ้นร่วมกันจากกระแสไฟฟ้าและแสงที่มีอัตราที่เร็วกว่าอย่างเห็นได้ชัด โดยการยืนยันจากผลจากการตรวจสอบขนาดของบาดแผล และภาพของเนื้อเยื่อใต้ชั้นผิวหนังทั้งปริมาณคอลลาเจน ไฟโบรบลาส โกรทแฟกเตอร์ และการเกิดผิวหนังชั้นใน ดังนั้นจากการศึกษานี้สรุปได้ว่าการใช้การกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าร่วมกับแสงสีแดงจากหลอดไดโอดเปล่งแสงสามารถช่วยให้อัตราการหายของบาดแผลที่ผิวหนังเร็วยิ่งขึ้นแม้ว่าจะเร็วกว่าการใช้การกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าหรือแสงเพียงอย่างเดียวไม่มากแบบมีนัยสำคัญทางสถิติก็ตาม แต่ก็มีประสิทธิภาพของการช่วยให้บาดแผลหายได้เร็วยิ่งขึ้น

5.2 ข้อเสนอแนะสำหรับงานในอนาคต

การศึกษาวิจัยในการรักษาบาดแผลโดยการกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าร่วมกับการกระตุ้นด้วยแสงในครั้งนี้พบว่า ชนิดและระดับของกระแสไฟฟ้าและความยาวคลื่นของแสงสีแดงมีผลต่อการหายของบาดแผล อย่างไรก็ตามยังมีปัจจัยอื่น ๆ ที่มีผลต่อการหายของบาดแผลที่น่าสนใจศึกษาเพิ่มเติมเช่น ระยะเวลาในการกระตุ้น พลังงานในการกระตุ้น การใช้การรักษาอื่นร่วมกับการรักษาด้วยการกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้า กระตุ้นด้วยแสง และการใช้คลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าในการกระตุ้น เป็นต้น นอกจากนี้สามารถศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับกลไกการหายของบาดแผลในเชิงโมเลกุลซึ่งเกี่ยวข้องกับโปรตีนที่ส่งเสริมการหายของบาดแผลเพื่อนำเสนอความสัมพันธ์ระหว่างวิธีการรักษาด้วยการกระตุ้นรูปแบบต่าง ๆ และการเปลี่ยนแปลงเชิงโมเลกุลที่เกิดขึ้นให้มีความเข้าใจมากยิ่งขึ้นก่อนจะนำไปศึกษาวิจัยต่อยอดเพื่อการรักษาบาดแผลในอนาคตต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. Rasche H. Haemostasis and thrombosis: an overview. *Eur Heart J Suppl.* 2001;3(suppl_Q):Q3–7.
2. Versteeg HH, Heemskerk JW, Levi M, Reitsma PH. New fundamentals in hemostasis. *Physiol Rev.* 2013;93(1):327–58.
3. Midwood KS, Williams LV, Schwarzbauer JE. Tissue repair and the dynamics of the extracellular matrix. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004;36(6):1031–7.
4. Enoch S, Price P. Cellular, molecular and biochemical differences in the pathophysiology of healing between acute wounds, chronic wounds and wounds in the aged. *World Wide Wounds.* 2004;13:1–17.
5. Passarini Junior JR, Gaspi FO de G de, Neves LMG, Esquisatto MAM, Santos GMT dos, Mendonça FAS. Application of *Jatropha curcas* L. seed oil (Euphorbiaceae) and microcurrent on the healing of experimental wounds in Wistar rats. *Acta Cir Bras.* 2012;27(7):441–7.
6. Koca Kutlu A, Çeçen D, Gürgen SG, Sayın O, Çetin F. A comparison study of growth factor expression following treatment with transcutaneous electrical nerve stimulation, saline solution, povidone-iodine, and lavender oil in wounds healing. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2013;2013.
7. Li Y, Zhang J, Xu Y, Han Y, Jiang B, Huang L, et al. The Histopathological Investigation of Red and Blue Light Emitting Diode on Treating Skin Wounds in Japanese Big-Ear White Rabbit. *PloS One.* 2016;11(6):e0157898.
8. Calisto FCF da S, Calisto SL da S, Souza AP de, França CM, Ferreira AP de L, Moreira MB. Use of low-power laser to assist the healing of traumatic wounds in rats. *Acta Cir Bras.* 2015;30(3):204–8.
9. Chaves ME de A, Araújo AR de, Piancastelli ACC, Pinotti M. Effects of low-power light therapy on wound healing: LASER x LED. *An Bras Dermatol.* 2014;89(4):616–23.

10. Thakral G, LaFontaine J, Najafi B, Talal TK, Kim P, Lavery LA. Electrical stimulation to accelerate wound healing. *Diabet Foot Ankle*. 2013;4(1):22081.
11. Passarini Junior JR, Gaspi FO de G de, Neves LMG, Esquisatto MAM, Santos GMT dos, Mendonça FAS. Application of *Jatropha curcas* L. seed oil (Euphorbiaceae) and microcurrent on the healing of experimental wounds in Wistar rats. *Acta Cir Bras*. 2012;27(7):441–7.
12. de Gaspi FO de G, Foglio MA, de Carvalho JE, Santos GMT, Testa M, Passarini JR, et al. Effects of the topical application of hydroalcoholic leaf extract of *Oncidium flexuosum* Sims.(Orchidaceae) and microcurrent on the healing of wounds surgically induced in Wistar rats. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2011;2011.
13. Das S, Baker AB. Biomaterials and nanotherapeutics for enhancing skin wound healing. *Front Bioeng Biotechnol*. 2016;4:82.
14. Nogueira VC, Coelho NPM de F, Barros TL de, Silva SMM de S, Martins M, Arisawa EAL. Biomodulation effects of LED and therapeutic ultrasound combined with semipermeable dressing in the repair process of cutaneous lesions in rats. *Acta Cir Bras*. 2014;29(9):588–95.
15. Mercandetti M, Cohen A. Wound healing: healing and repair. *Emedicine Com*[Internet] 2008[Cite 2018 Dec 1]; 38: Available from <https://emedicine.medscape.com/article/1298129-overview>.
16. John Maynard PM Ostomy and Wound Care. How Wounds Heal: The 4 Main Phases of Wound Healing[Internet];2015 [Cite 2018 Dec 1]. Available from <http://www.shieldhealthcare.com/community/wound/2015/12/18/how-wounds-heal-the-4-main-phases-of-wound-healing/>
17. Cardoso M dos PC, Albuquerque A de O, Girão VCC, Pompeu MM de L, Silva CISM, Azevedo OGR de, et al. Preconditioning with mono and polyunsaturated fatty acids and low-intensity electrical stimulation. Effects on skin repair in rats. *Acta Cir Bras*. 2015;30(2):107–14.

18. Schreiner L, Santos TG dos, Souza ABA de, Nygaard CC. Electrical stimulation for urinary incontinence in women: a systematic review. *Int Braz J Urol*. 2013;39(4):454–64.
19. Gürgen SG, Sayın O, Çetin F, Yücel AT. Transcutaneous electrical nerve stimulation (TENS) accelerates cutaneous wound healing and inhibits pro-inflammatory cytokines. *Inflammation*. 2014;37(3):775–84.
20. Kim TH, Cho H, Lee SM. High-voltage pulsed current stimulation enhances wound healing in diabetic rats by restoring the expression of collagen, α -smooth muscle actin, and TGF- β 1. *Tohoku J Exp Med*. 2014;234(1):1–6.
21. Zhao M. Electrical fields in wound healing—an overriding signal that directs cell migration. Elsevier; 2009. p. 674–82.
22. Carvalho AFM de, Feitosa MCP, Coelho NPM de F, Rebêlo VCN, Castro JG de, Sousa PRG de, et al. Low-level laser therapy and *Calendula officinalis* in repairing diabetic foot ulcers. *Rev Esc Enferm USP*. 2016;50(4):628–34.
23. Leite SN, Andrade TAM de, Masson-Meyers D dos S, Leite MN, Enwemeka CS, Frade MAC. Phototherapy promotes healing of cutaneous wounds in undernourished rats. *An Bras Dermatol*. 2014;89(6):899–904.
24. Nayak S, Nalabothu P, Sandiford S, Bhogadi V, Adogwa A. Evaluation of wound healing activity of *Allamanda cathartica*. L. and *Laurus nobilis*. L. extracts on rats. *BMC Complement Altern Med*. 2006;6(1):12.
25. Basso FG, Oliveira CF, Kurachi C, Hebling J, de Souza Costa CA. Biostimulatory effect of low-level laser therapy on keratinocytes in vitro. *Lasers Med Sci*. 2013;28(2):367–74.

ภาคผนวก ก
อุปกรณ์การวิจัย

ภาคผนวก ก

ก 1 อุปกรณ์การวิจัย

- กล้องถ่ายภาพดิจิทัล 9.1 ล้านพิกเซล รุ่น A950 ยี่ห้อ ฌำ
- เข็มฉีดยาขนาด 1 ml
- กรรไกรผ่าตัด
- ครีมกำจัดขน ยี่ห้อ Veet
- 10% neutral buffered formalin
- 10% povidone–iodine
- 70% isopropyl alcohol
- Thiopental sodium
- 0.9% Normal saline
- Electrode ยี่ห้อ 3M รุ่น 9643

ก 2 เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย

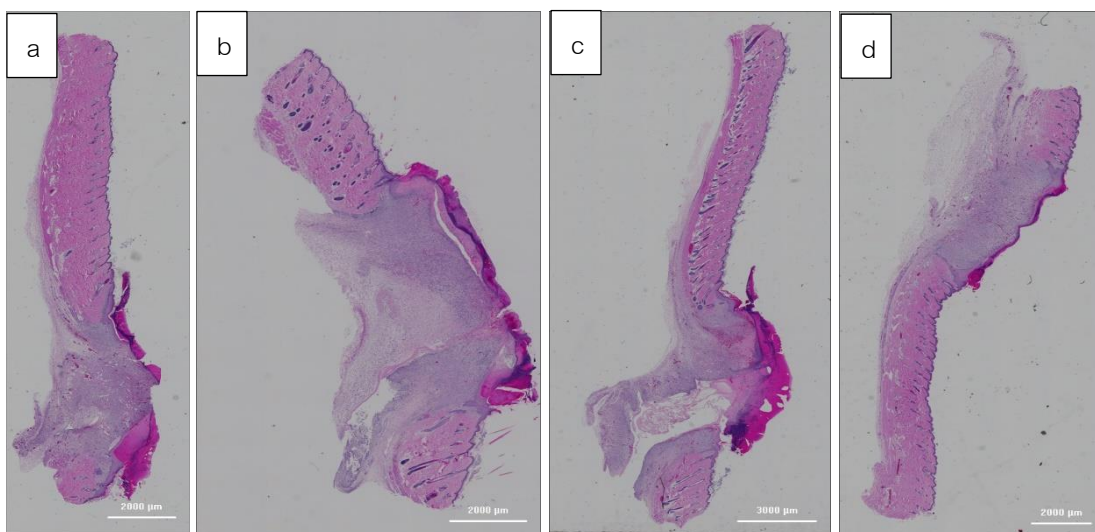
- เครื่องกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าที่ประดิษฐ์ขึ้น
- เครื่องกระตุ้นด้วยแสงที่ประดิษฐ์ขึ้น
- คอมพิวเตอร์ core i3 HDD 1 TB และ RAM 4 GB
- เครื่อง BioTek Imaging รุ่น Lionheart LX
- Multimeter รุ่น X830 ยี่ห้อ CE
- Digital Optical Power Meter Series PM100 D ยี่ห้อ THORLABS



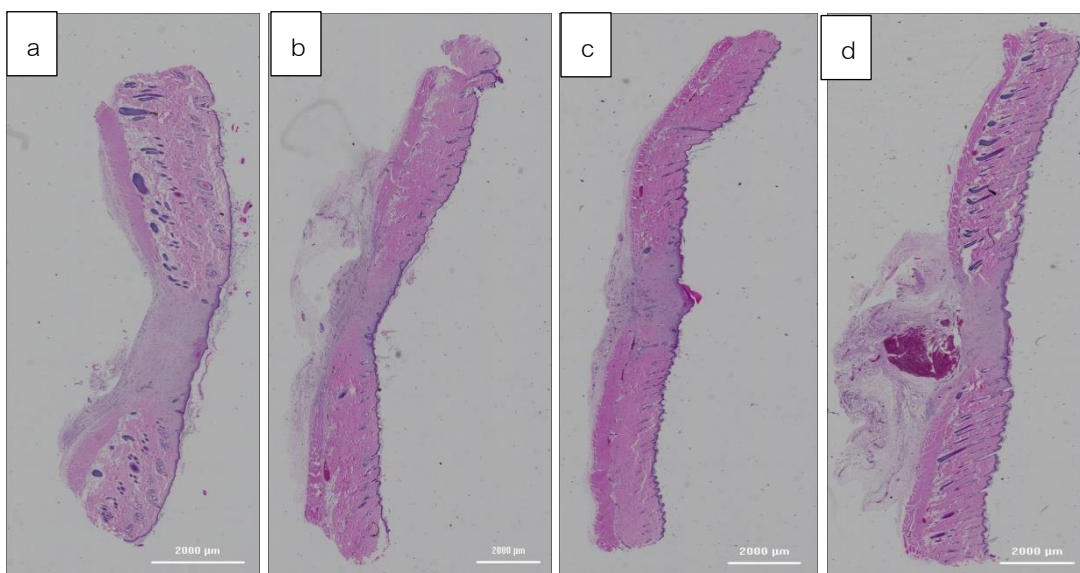
รูปที่ ก 1 วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษา (ก) อุปกรณ์สำหรับชุดถ่ายภาพขนาดแฟลช (ข) กรรไกรผ่าตัด (ค) เครื่อง BioTek Imaging (ง) Multimeter (จ) เครื่องกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้า (ฉ) Digital Optical Power Meter Series PM100D (ช) เครื่องกระตุ้นด้วยแสง

ภาคผนวก ข
ภาพสไลด์จากการย่อ

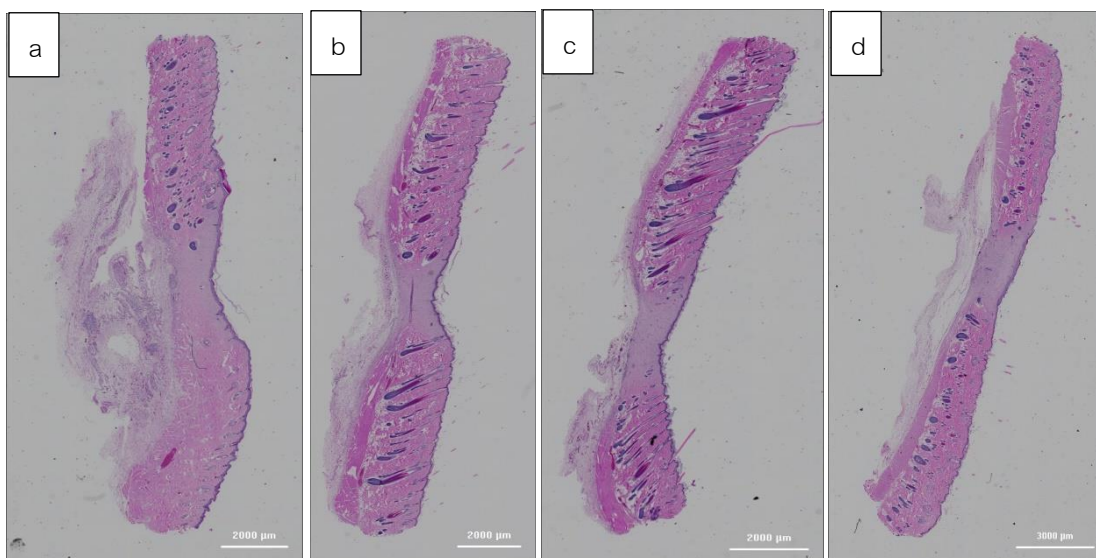
ภาคผนวก ข



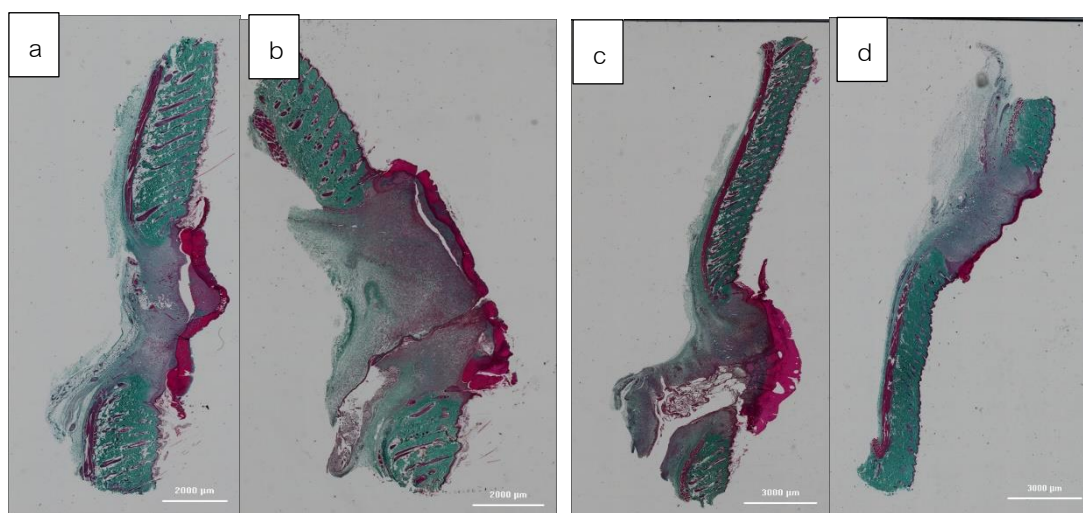
รูป ข 1 ภาพจากสไลด์การย้อมด้วย Hematoxylin & Eosin ในกลุ่มทดลองแต่ละกลุ่ม (a) กลุ่มควบคุม (b) กลุ่มกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้า (c) กลุ่มกระตุ้นด้วยแสง และ (d) กลุ่มกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าร่วมกับแสง 7 วัน โดยใช้เลนส์ใกล้วัตถุกำลังขยาย 20 เท่า



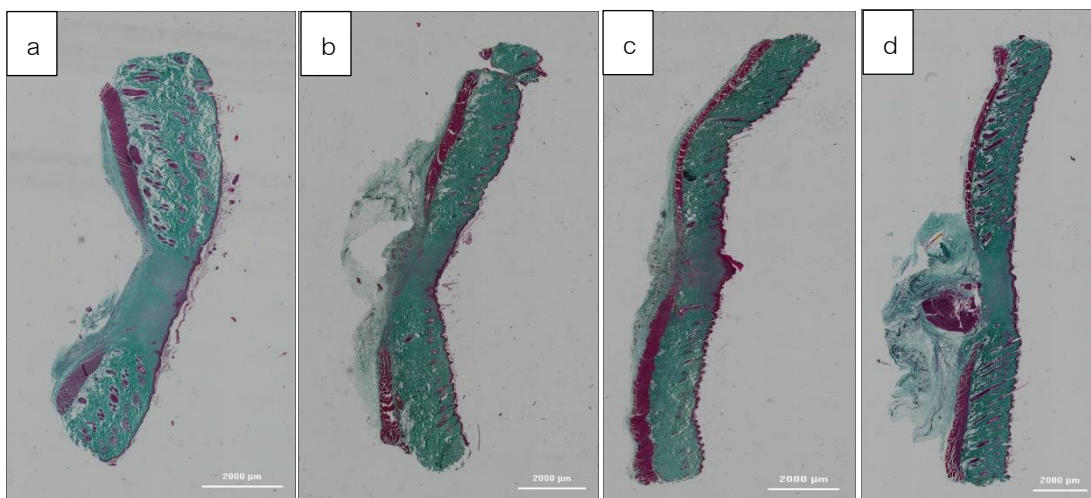
รูป ข 2 ภาพจากสไลด์การย้อมด้วย Hematoxylin & Eosin ในกลุ่มทดลองแต่ละกลุ่ม (a) กลุ่มควบคุม (b) กลุ่มกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้า (c) กลุ่มกระตุ้นด้วยแสง และ (d) กลุ่มกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าร่วมกับแสง 14 วัน โดยใช้เลนส์ใกล้วัตถุกำลังขยาย 20 เท่า



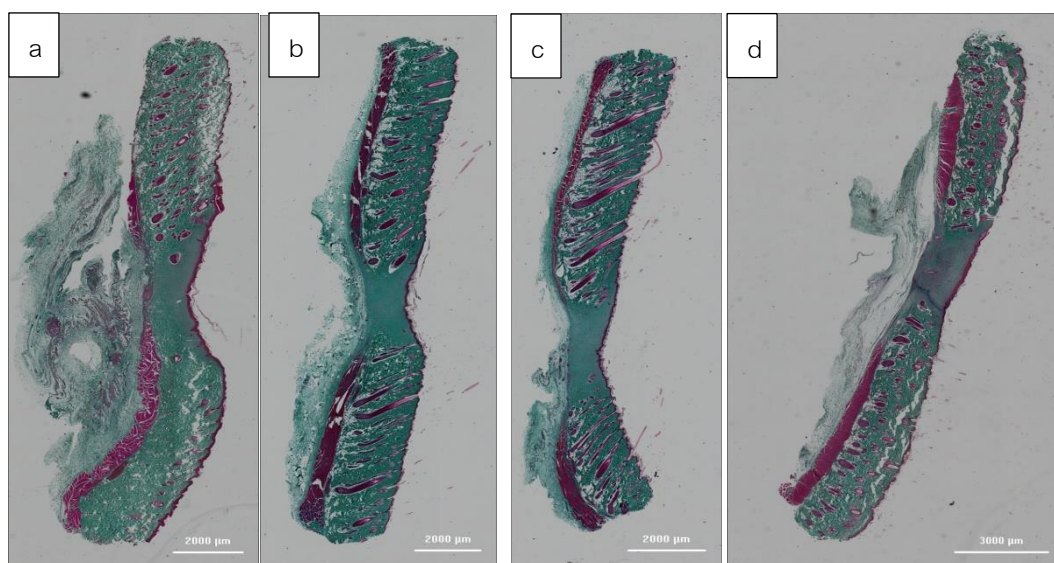
รูป ข 3 ภาพจากสไลด์การย้อมด้วย Hematoxylin & Eosin ในกลุ่มทดลองแต่ละกลุ่ม (a) กลุ่มควบคุม (b) กลุ่มกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้า (c) กลุ่มกระตุ้นด้วยแสง และ (d) กลุ่มกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าร่วมกับแสง 21 วัน โดยใช้เลนส์ใกล้วัตถุกำลังขยาย 20 เท่า



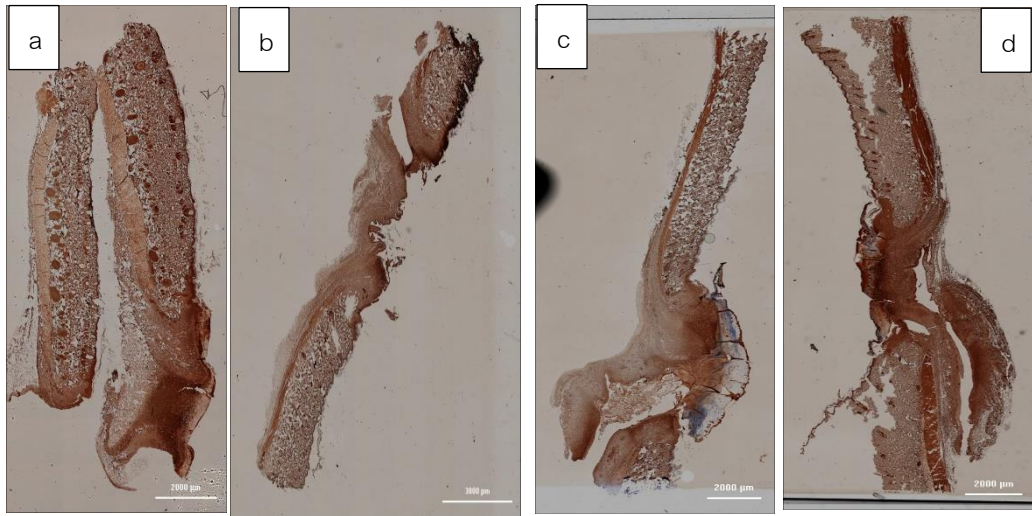
รูป ข 4 ภาพจากสไลด์การย้อมด้วย Masson's trichrome ในกลุ่มทดลองแต่ละกลุ่ม (a) กลุ่มควบคุม (b) กลุ่มกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้า (c) กลุ่มกระตุ้นด้วยแสง และ (d) กลุ่มกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าร่วมกับแสง 7 วัน โดยใช้เลนส์ใกล้วัตถุกำลังขยาย 20 เท่า



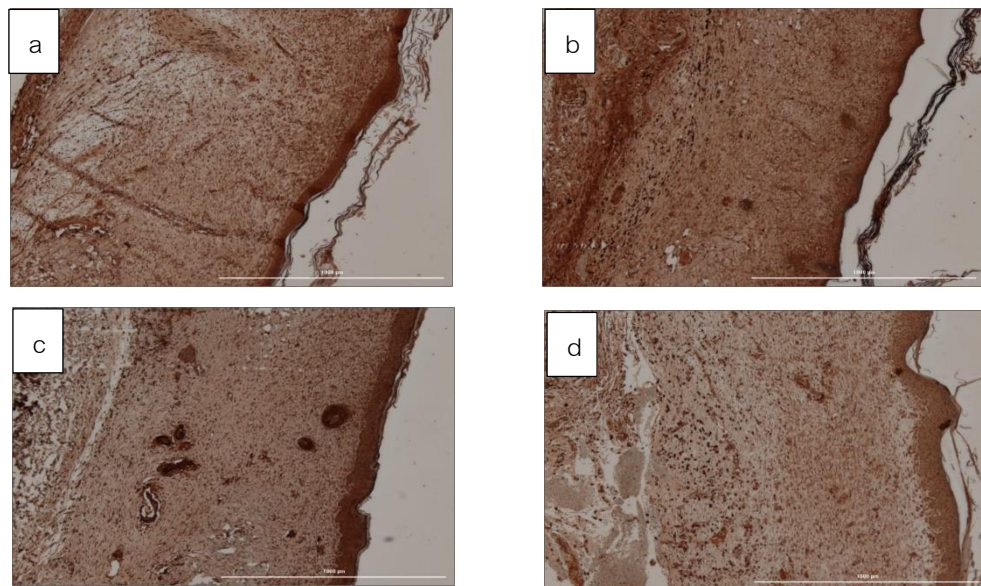
รูป ข 5 ภาพจากสไลด์การย้อมด้วย Masson's trichrome ในกลุ่มทดลองแต่ละกลุ่ม (a) กลุ่มควบคุม (b) กลุ่มกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้า (c) กลุ่มกระตุ้นด้วยแสง และ (d) กลุ่มกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าร่วมกับแสง 14 วัน โดยใช้เลนส์ใกล้วัตถุกำลังขยาย 20 เท่า



รูป ข 6 ภาพจากสไลด์การย้อมด้วย Masson's trichrome ในกลุ่มทดลองแต่ละกลุ่ม (a) กลุ่มควบคุม (b) กลุ่มกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้า (c) กลุ่มกระตุ้นด้วยแสง และ (d) กลุ่มกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าร่วมกับแสง 21 วัน โดยใช้เลนส์ใกล้วัตถุกำลังขยาย 20 เท่า



รูป ข 7 ภาพจากสไลด์การย้อมด้วย Immunohistochemical ในกลุ่มทดลองแต่ละกลุ่ม (a) กลุ่มควบคุม (b) กลุ่มกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้า (c) กลุ่มกระตุ้นด้วยแสง และ (d) กลุ่มกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าร่วมกับแสง 7 วัน โดยใช้เลนส์ใกล้วัตถุกำลังขยาย 20 เท่า



รูป ข 8 ภาพจากสไลด์การย้อมด้วย Immunohistochemical ในกลุ่มทดลองแต่ละกลุ่ม (a) กลุ่มควบคุม (b) กลุ่มกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้า (c) กลุ่มกระตุ้นด้วยแสง และ (d) กลุ่มกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าร่วมกับแสง 14 วัน โดยใช้เลนส์ใกล้วัตถุกำลังขยาย 20 เท่า และซูมภาพ

ภาคผนวก ค

Proceeding

ภาคผนวก ค

Proceeding

Title Wound area measurement using image processing analysis

Author : Maemmoth Chuongsakun and Surapong Chatpun

Program Institute of Biomedical Engineering, Faculty of Medicine,

Institute Prince of Songkla University, Songkhla 90110, Thailand

Abstract

Wounds are physical damages or injuries which cause an opening or break of the skin tissues. The healing potential is usually evaluated from the change of wound area or wound diameter during the inspection period. This study aimed to create the computer algorithm to assist the wound area measurement. The algorithm was based on the image processing technique. Digital image of wound was converted to grayscale image and black and white (B&W) image, respectively. Morphological operations were then applied to B&W image such as dilating filling, cutting and eroding. Image segmentation was performed for wound boundary detection and wound area was then measured. Our algorithm was tested with two groups of images; simple geometries and wounds. The accuracy of wound area measurement was determined by comparing our algorithm with ImageJ software. The results showed that it had high accuracy when testing with simple geometries (>96%). The accuracy of wound measurement was quite high (>91%) but there was an image that could not be determined wound area. Our results showed that the accuracy of area measurement depended on the quality of digital image. It can be concluded that this algorithm will reduce the human work for wound area measurement and it might reduce the interobserver variability.

Keywords: wound, area measurement, image analysis, ImageJ, morphological Operation

Introduction

Wounds are physical damages or injuries which cause an opening or break of the skin tissues. In the repairing process of wound healing, there are four stages which involve homeostasis, inflammation, proliferation and maturation or remodeling (Rhett et al.,2008; Velnar et al., 2009). There are many techniques that have been implemented to accelerate wound healing process. Vacuum- assisted closure technique removed chronic edema and enhanced formation of granulation tissue leading to efficacious wound closure (Argenta et al.,1997). Electrical stimulation has been applied for wound healing and several studies showed that the electrical stimulation could increase rate of healing (Rouabhia et al.,2013; Houghton et al.,2010 ; Sebastian et al.,2011 ; Kloth .,2014). Light therapy using light-emitting diode (LED) is a new technique to enhance wound healing (Adamskaya et al.,2011; De Sousa et al.,2010; Minatel et al.,2009). The healing potential is usually evaluated from the change of wound area or wound diameter during the inspection period (Cardinal et al.,2008; Wood et al.,2014). There are both manual and automatic methods to measure wound area. Nayak et al. used transparency paper and a permanent marker to record wound size and then they used graph paper to measure wound area (Nayak et al.,2009). In other study, wounds were photographed, transferred to computer and measured with special size analysis software (Atiba et al.,2011). Furthermore, an open source software such as ImageJ was used to trace the outline of wound and to calculate the wound area (Chang et al.,2011). Zordan and colleague wrote MATLAB algorithm to perform texture segmentation to measure the wound area (Zordan et al.,2011). Therefore, the computer- assisted analysis for wound size is still a challenge for biomedical research.

Objectives

- 1) This study aimed to create the computer algorithm to assist the wound area measurement and compared the results with the open source image processing program.

Research Methodology

The process of our algorithm to measure the wound area is generally described as a diagram in Figure 1. The image was firstly converted from RGB to grayscale and then it was converted to black and white image. After that, morphological operations i.e. dilation, filling, cutting and erosion were applied to image as a step of image processing. Image segmentation was then performed to trace the edge of area or wound. Finally, area was determined with the area calculation code. We tested the efficiency of the algorithm by determine the accuracy of area measurement. Therefore, the measured area using our algorithm was compared with the result determined by ImageJ (version 1.46r). The accuracy of area measurement has been calculated as presented in equation 1.

$$\% \text{ accuracy} = 100 - \left(\frac{|Area_{algorithm} - Area_{ImageJ}|}{Area_{ImageJ}} \times 100 \right) \dots\dots\dots (1)$$

There were two groups of images used to determine the efficiency of the algorithm. First group contained images of known geometry whereas the second group contained images of animal wounds. All images in our study were obtained from online sources.

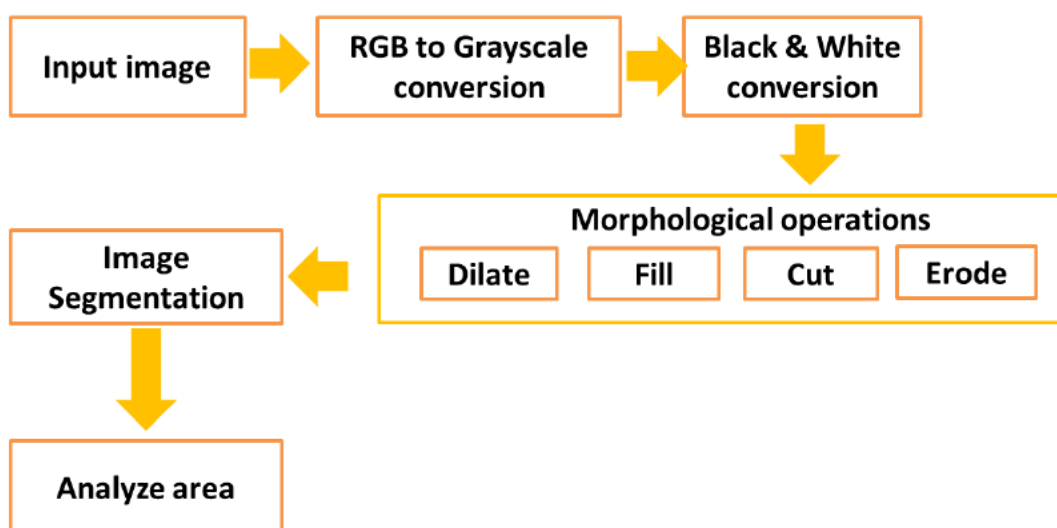


Figure 1 Diagram of image analysis processes to determine wound area

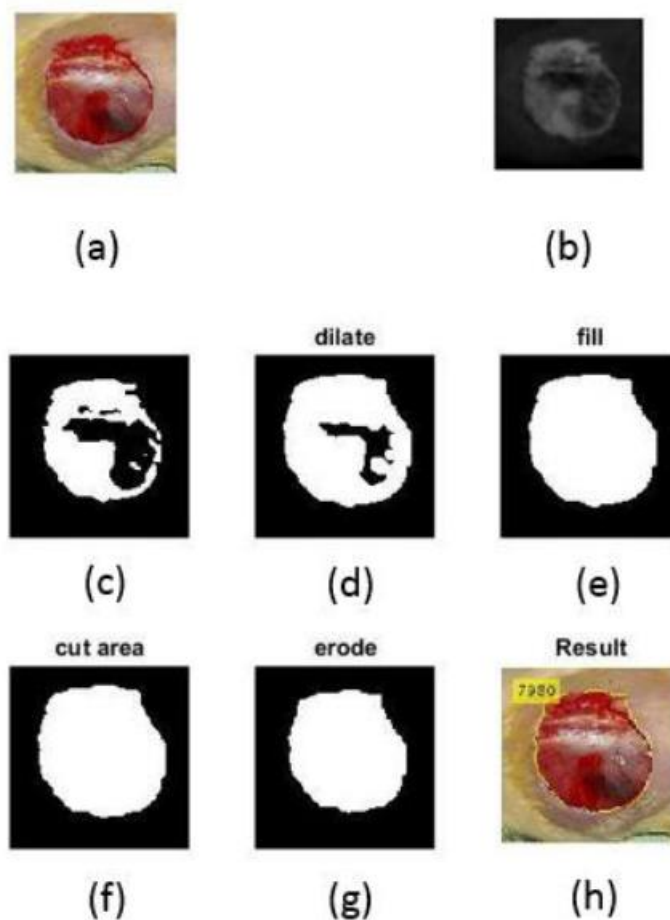


Figure 2 Example of images after processes to determine the wound area: (a) original image, (b) grayscale image, (c) black and white image, (d) image after dilation, (e) image after filling, (f) image after cutting, (g) image after erosion and (h) image after tracing

Results/Conclusion

In the first group of images, using simple geometries, the differences in the area measurement using ImageJ and our computer-assisted algorithm are showed in Table 1. Furthermore, the accuracy of measurement had been determined and presented in Table 1. The accuracy for the images in the first group is in a range of 96.1%-99.9 %. In the second group of images, wound image was processed according to our algorithm. The images resulted from the image processing are presented in Figure 2. Then, the wound areas and measurement accuracy were calculated as showed in Table 2. The accuracy for the images in the second group is in a range of 91.0%-97.7%.

However, we found that our algorithm could not determine area for the image which has many voids after black and white conversion as shown in last row in Table 2.

Table 1 Area of given geometries and the accuracy of area measurement using the computer-assisted algorithm and ImageJ












Image	Measured Area (pixel)		Difference of area (pixel)	Accuracy (%)
	ImageJ	Computer-assisted algorithm		
	10,525	10,940	415	96.1
	14,199	14,676	477	96.7
	19,106	19,104	2	99.9
	7,473	7,674	201	97.3
	1,2801	1,2761	40	99.7

Table 2 Area of animal wounds and the accuracy of wound area measurement using the computer-assisted algorithm and ImageJ

Image	Measured Area (pixel)		Difference of area (pixel)	Accuracy (%)
	ImageJ	Computer-assisted algorithm		
	7,315	7,980	665	91.0
	13,323	13,686	363	97.3
	924	903	21	97.7
	10,987	11,274	287	97.4
	-	28,010	-	-
	41,999	-	-	-

Discussion

We have created an algorithm that determines the area of digital wound image. It was found that our algorithm provided high accuracy of test images contained different sizes of wound. We notice that images with light reflection have lower accuracy than images without light reflection. Furthermore, the contrast between the object and background can influence the image processing (Lopez-Molina et al.,2013). There was a study showed that it is difficult to recognize the images of human chronic wounds because of the variability of the wound bed and the inhomogeneity of the patient skin (Papazoglou et al.,2010). In this study, it was noticed in this study that ImageJ also could not give the value of wound area if the wound (object) and the skin (background) was not clearly distinguishable. That means the quality of image plays a role for wound detection. In addition, image noise also causes the error in an image processing. Therefore, it is necessary to have an image pre-processing to enhance a quality of image such as noise filtering, contrast adjustment and histogram modification (You et al.,2008; Adel et al. , 2008; Geetha et al. ,2014). Currently, our algorithm is not completely developed for wound measurement. It is still a challenge to improve this algorithm to have an automatic image quality enhancement and a boundary of wound detection. Moreover, it should have a function to determine the percent of wound change from two images of wound at the certain points in time. This algorithm will reduce the human work for wound measurement and it might reduce the inter-observer variability.

Recommendations

Using the computer- assisted program can facilitate the wound measurement and reduce the variation of inter-observer. Our results showed that the accuracy of area measurement depends on the quality of image. Therefore, it should be concerned before taking a digital photograph of wound. It is also necessary to verify the repeatability of area measurement for different conditions of wounds such as dirty wound bed, a large color contrast with surrounding tissues and wound with inflammation.

ประวัติผู้เขียน

ชื่อสกุล นาย แมมมอธ ชู่อองสกุล

รหัสประจำตัวนักศึกษา 5710320017

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิศวกรรมศาสตรบัณฑิต	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2557

ทุนการศึกษา

ทุนบัณฑิตศึกษา คณะแพทยศาสตร์

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

M. Chuongsakun and S. Chatpun, “Wound Area Measurement Using Image Processing Analysis”

In Proceeding of the 7th national and international Graduate Study Conference “ Thailand 4.0 Creative Innovation for Sustainable Development “ Bangkok, Thailand, July 20-21,2017.