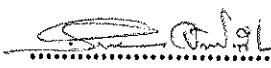


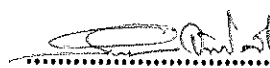
ชื่อวิทยานิพนธ์ เปรียบเทียบประสิทธิภาพของโคโคซานจากกระดองปลาหมึกและ
เปลือกกุ้งต่อการห้ามเลือด การสมานแผล และความปลอดภัย
ในการนำไปใช้

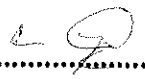
ผู้เขียน นางสาวมณฑา จำเริญรักษ์
สาขาวิชา ชีวเคมี


คณะกรรมการที่ปรึกษา

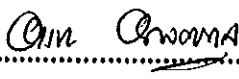
คณะกรรมการสอบ

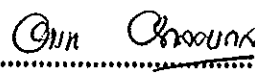
.....ประธานกรรมการ
(ดร.อุตสาห์ จันทรอำไพ)

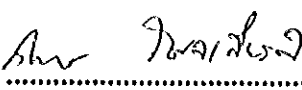
.....ประธานกรรมการ
(ดร.อุตสาห์ จันทรอำไพ)

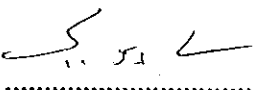
.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.นงพร โต้วณะ)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.นงพร โต้วณะ)


.....กรรมการ
(อาจารย์อารยา อุดลตระกูล)

.....กรรมการ
(อาจารย์อารยา อุดลตระกูล)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิไลวรรณ โชติเกียรติ)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุทธรวัฒน์ เบญจกุล)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยฉบับนี้
เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมี


.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.ปิติ ทฤษฏีคุณ)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์	เปรียบเทียบประสิทธิภาพของโคโตซานจากกระดองปลาหมึกและเปลือกกุ้งต่อการห้ามเลือด การสมานแผล และความปลอดภัยในการนำไปใช้
ผู้เขียน	นางสาวมณฑา จำเจริญรักษ์
สาขาวิชา	ชีวเคมี
ปีการศึกษา	2544

บทคัดย่อ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีเป้าหมายเพื่อประเมินศักยภาพในการนำโคโตซานไปประยุกต์ใช้ทางการแพทย์โดยเน้นคุณสมบัติที่เกี่ยวข้องกับการห้ามเลือด (hemostasis) การสมานแผล (wound healing) และความปลอดภัยในการใช้ ทำการเปรียบเทียบระหว่างโคโตซาน 2 แหล่งคือ จากกระดองปลาหมึกกล้วย (*Loligo formosana*) และเปลือกกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) ที่ผลิตขึ้นเองในห้องปฏิบัติการ และทำการวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีและฟิสิกส์ ให้ทราบแน่นอนเช่น น้ำหนักโมเลกุล (viscosity averaged molecular weight) ระดับการกำจัดหมู่อะซิติก (degree of deacetylation) การละลาย (solubility) รวมทั้งปริมาณเถ้า (ash) และไนโตรเจน (nitrogen) โคโตซานแต่ละแหล่งที่นำมาศึกษาเตรียมเป็นสารละลายจากตัวอย่าง 2 รูป คือ รูปผงโดยละลายใน 1% กรดอะซิติก และรูปสปันจ์ซึ่งเตรียมโดยการนำโคโตซานในกรดอะซิติกไปทำ freeze-dried แล้วละลายด้วย 0.9% NaCl

ผลการทดสอบในหนูทดลอง (*in vivo*) พบว่าตัวอย่างสารละลายโคโตซานจากกระดองปลาหมึกและเปลือกกุ้งทั้ง 2 รูป สามารถเร่งให้เลือดจากการเจาะเส้นเลือดที่หาง (tail vein) ด้วย lancet หยุดไหลได้เร็วขึ้น ตัวอย่างที่มีประสิทธิภาพสูงสุดคือสารละลายที่เตรียมจากเปลือกกุ้งความเข้มข้น 4 มก./มล. ซึ่งเร่งให้เลือดหยุดไหลได้เร็วขึ้น 52% เมื่อเทียบกับชุดควบคุม จากการทดสอบในหลอดทดลอง (*in vitro*) โดยใช้ whole blood เม็ดเลือดแดง เม็ดเลือดขาว และเกล็ดเลือด แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ อิเล็กตรอนแบบส่องกราดพบว่าสารละลายโคโตซานทำให้เกิดการเกาะกลุ่มกัน (hemagglutination) ของเซลล์เม็ดเลือดแดงและเกล็ดเลือด แต่ไม่มีผลกับเม็ดเลือดขาว แสดงว่ากระบวนการที่ทำให้เลือดหยุดไหลเกิดขึ้นโดยไม่ผ่านวิถีการแข็งตัวของเลือดปกติ (clotting cascade pathway) เมื่อทดสอบกับเลือดของสัตว์ต่างชนิดกันคือ กระจ่าง และ

วีว พบว่าอัตราการเกิดการเกาะกลุ่มของเซลล์เม็ดเลือดด้วยโคโตซานขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการคือ ความเข้มข้น แหล่งที่มา รูปแบบที่ใช้ รวมทั้งชนิดของสัตว์ทดลอง

ผลการเปรียบเทียบศักยภาพในการส่งเสริมการสมานแผลซึ่งทดสอบโดยหยดสารละลายโคโตซานตัวอย่างชนิดต่าง ๆ ลงบนแผลบริเวณหลังหนูทดลองที่ผ่าตัดด้วยมาตรฐานเดียวกัน สังเกตลักษณะการสมานแผลด้วยสายตาดูตลอดระยะเวลา 21 วัน ตัดบริเวณแผลมาศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาที่ระยะเวลา 10 และ 21 วัน หลังการผ่าตัด โดยวิเคราะห์ลักษณะการเชื่อมติดกันของ epithelial cell การเรียงตัวของคอลลาเจนไฟเบอร์ จำนวนไฟโบรบลาสต์ ไฟโบรไซต์ lymphocyte macrophage เส้นเลือดฝอย และ hair follicles ผลการทดลองยืนยันว่าโคโตซานจากทั้งสองแหล่งมีคุณสมบัติส่งเสริมการสมานแผลได้จริง อย่างไรก็ตามจากการเปรียบเทียบพบว่าโคโตซานจากกระดองปลาหมึกในรูปผงที่ละลายใน 1.0% กรดอะซิติก และในรูปสปันจ์ที่ละลายใน 0.9% NaCl มีประสิทธิภาพสูงที่สุด และรองลงมา ตามลำดับ นอกจากนี้โคโตซานในรูปสารละลายมีประสิทธิภาพในการส่งเสริมการสมานแผลได้ดีกว่ารูปผง

จากการทดสอบความปลอดภัยในการใช้โดยฉีดสารละลายโคโตซานเข้าใต้ผิวหนังของหนูทดลองพบว่าเนื้อเยื่อบริเวณที่ฉีดสารละลายดังกล่าวเป็นเวลา 60 วัน มี lymphocyte และ macrophage กระจายอยู่จำนวนมาก แสดงว่าเนื้อเยื่อเกิดปฏิกิริยาของกระบวนการย่อยสลายโคโตซานอย่างช้า ๆ แต่ไม่ทำให้หนูทดลองเกิดอาการเป็นไข้ (pyrogenic effect)

Thesis Title Comparison for the Effectiveness of Chitosan from Squid Pen and Prawn Shell on Hemostasis, Wound Healing Properties and Safety

Author Miss Monta Jumreanruk

Major Program Biochemistry

Academic Year 2001

Abstract

This study aimed to evaluate the potential use of chitosan in medicine, especially regarding hemostasis, wound healing properties and its safety. Comparisons were carried out between two sources, namely, squid pen (*Loligo formosana*) and prawn shell (*Penaeus monodon*). The chitosan chemical and physical properties such as molecular weight, degree of deacetylation, solubility, as well as nitrogen and ash contents were characterised. Sample solutions from each source were examined in two forms, i.e. powder dissolved in 1.0% acetic acid and sponge prepared by freez-drying the chitosan solution then dissolved in 0.9% NaCl.

In vivo studies for hemostatic properties were carried out by puncturing the tail vein of rat with lancet. Bleeding time was then measured after applying the chitosan solutions. Results indicated that all the tested solutions exhibited hemostasis potential. The most effective was the one prepared from sponge of prawn shell (concentration of 4 mg/ml), which reduced bleeding time by 52% when compared with that of the control group. *In vitro* studies were conducted in titer plate by mixing the test solutions with whole blood, red blood cells, white blood cells and platelets from a rat. The mixtures were then examined under a light microscope and scanning electron microscope (SEM). These clearly showed that chitosan did not accelerate hemostasis by the common

clotting cascade pathway but rather by aggregation of red blood cells and platelets. Also it did not exert any effect with white blood cells. Apart from rats, blood samples from other animals, i.e. rabbit and cow, were compared. Results revealed that the rate of hemostasis by chitosan depends on several factors such as source, form, concentration and species of experimental animal.

Wound healing potential was evaluated from dorsal skin incision of a standard size and position in rat, following by application of the chitosan solutions. The wounds were observed and dissected at day 10 and 21 after incision, and then histologically analysed. Several tissue reaction parameters were investigated, including the arrangement of epithelial cells, arrangement and deposition of collagen fibers, number of fibroblasts, fibrocytes, macrophages, capillary vessels and hair follicles. These verified that chitosan from both sources promoted wound healing. The powder form from squid pen dissolved in 1.0% acetic acid showed the highest potential while the second was the form of sponge dissolved in 0.9% NaCl. In addition, the most effective form for chitosan was solution rather than powder.

The safety of using chitosan was evaluated by subcutaneous injection of the solutions in rat, after which the tissues were dissected and histologically examined. Although chronic inflammation still remained 60 days after injection, the polymer was gradually degraded and absorbed without any pyrogenic effect.

กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณ ดร.อุตสาห์ จันทร์อำไพ ประธานกรรมการที่ปรึกษา วิทยาลัยนิพนธ์ที่กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำทั้งในด้านการเรียน การทำวิจัย สนับสนุนทุนวิจัย และการเขียนวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์และขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.นงพร โตวิวัฒน์ อาจารย์อารยา อุดุลตระกูล และรองศาสตราจารย์ นพ.อภิณพ จันทร์วิทัน กรรมการที่ปรึกษาวิทยาลัย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิไลวรรณ โชติเกียรติ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุทธวิวัฒน์ เบญจกุล กรรมการสอบวิทยานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ให้ทุนอุดหนุน ในการทำวิทยานิพนธ์จนสำเร็จลุล่วง

ขอกราบขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร.เวดิน นพินิตย์ และขอขอบคุณ คุณสากล สุวลักษณ์ และคุณอารมย์ สมบัติมาก รวมถึงเจ้าหน้าที่ประจำภาควิชากายวิภาคศาสตร์ ที่ให้คำปรึกษาด้านเนื้อเยื่อวิทยา และอนุเคราะห์เครื่องมือและอุปกรณ์ในการทดลองทาง เนื้อเยื่อวิทยาเป็นอย่างดี รวมถึงเทคนิคทางจุลทรรศน์อิเล็กตรอน และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ ประจำเรือนเลี้ยงสัตว์ทดลอง คณะวิทยาศาสตร์ทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือและให้ความ สะดวกในการทำวิจัยอย่างดีเยี่ยมจนสำเร็จลุล่วง

ขอขอบคุณคณาจารย์ภาควิชาชีวเคมีทุกท่านที่ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ให้ คำแนะนำต่างๆ ที่เป็นประโยชน์ รวมทั้งเจ้าหน้าที่ประจำภาควิชาชีวเคมีทุกท่านที่ให้บริการ ดียอดเยี่ยมมาตลอด และขอขอบคุณบริษัท ห้องเย็นโชติวัฒน์หาดใหญ่ จำกัด (มหาชน) จังหวัดสงขลา และ บริษัท ห้องเย็นเทพพิทักษ์ จำกัด จังหวัดปัตตานี ที่อนุเคราะห์ งบประมาณและวัสดุดิบในการศึกษาครั้งนี้ คือ เป็ลือกุ้งและกระดองปลาหมึก

ขอกราบขอบพระคุณ คุณอุณ-ประไพ จำเริญรักษ์ คุณพ่อ คุณแม่ ด้วยความเคารพ อย่างสูง ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือในทุก ๆ ด้าน ตลอดจนเป็นกำลังใจที่สำคัญยิ่ง ขอขอบคุณพี่สาว พี่ชาย ที่ช่วยเหลือทั้งด้านเงินทุนในการศึกษาและเป็นกำลังใจตลอดมา

ขอขอบคุณ คุณอรวรรณ พรหมสังคะ คุณโสภา ทวีคณะโชติ และพี่ ๆ เพื่อน ๆ น้อง ๆ ทุกคนที่คอยให้การช่วยเหลือและเป็นกำลังใจที่ดีตลอดมา

มณฑา จำเริญรักษ์

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(1)
Abstract	(3)
กิตติกรรมประกาศ	(5)
สารบัญ	(6)
รายการตาราง	(7)
รายการรูป	(9)
ตัวย่อและสัญลักษณ์	(12)
1. บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
การตรวจเอกสาร	4
วัตถุประสงค์	37
2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ	38
3. ผลและวิจารณ์	59
4. สรุป	134
เอกสารอ้างอิง	136
ภาคผนวก	144
ประวัติผู้เขียน	146

รายการตาราง

ตารางที่	หน้า
1 คุณสมบัติการหมุนระนาบแสงโพลาไรด์ของโคตินจาก <i>L. lessoniana</i> , <i>L. formosana</i> และ <i>P. monodon</i> ที่ละลายใน dimethylacetamide ที่มี 5% ลิเทียมคลอไรด์ ที่เวลาเริ่มต้นและหลังจากเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 14 วัน	15
2 ผลผลิตจากการสกัดโคตินและโคโตซานจากกระดองปลาหมึกกล้วย (<i>L. formosana</i>) และจากเปลือกกุ้งกุลาดำ (<i>P. monodon</i>)	59
3 ปริมาณไนโตรเจนในเปลือกกุ้งและกระดองปลาหมึกซึ่งเป็นวัตถุดิบเริ่มต้นในโคตินและโคโตซานที่เตรียมในห้องปฏิบัติการ	60
4 ปริมาณเถ้าที่ได้จากตัวอย่างชนิดต่าง ๆ	61
5 น้ำหนักโมเลกุล และ ระดับการกำจัดหมู่อะซิติดของโคโตซานที่เตรียมจากกระดองปลาหมึกและเปลือกกุ้งกุลาดำ	62
6 ปริมาณความชื้นจากตัวอย่างชนิดต่าง ๆ	63
7 ปริมาณความชื้นที่สามารถดูดยึดไว้ได้	64
8 การละลายของสปันจ์โคโตซาน	70
9 เปรียบเทียบปริมาณของโปรตอน (μmole) ในสารละลายสปันจ์โคโตซานจากเปลือกกุ้งและกระดองปลาหมึกก่อนอบและหลังอบที่ 100 °ซ, 92 ชั่วโมง	71
10 การละลายของสปันจ์โคโตซานจากเปลือกกุ้งและกระดองปลาหมึกก่อนและหลังอบที่ 100 °ซ, 92 ชั่วโมง ในน้ำกลั่นที่ผ่านการกำจัดอออน พีเอช 7.0	73
11 เปรียบเทียบระยะเวลาการแข็งตัวของเลือดโดยการทดสอบระยะเวลาการไหลของเลือด (bleeding time) ในสัตว์ทดลองโดยใช้สารละลายโคโตซานที่เตรียมจากสปันจ์โคโตซานจากกระดองปลาหมึกและเปลือกกุ้งที่ความเข้มข้น 4 และ 8 มก./มล.	75
12 ผลการศึกษาการแข็งตัวของเลือดโดยใช้สารละลายสปันจ์โคโตซาน	76
13 ผลการทดสอบการเกิดการเกาะกลุ่มของเซลล์ต่าง ๆ ในเลือดด้วยสารละลายโคโตซาน	78

รายการตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
14 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติจากการทดสอบทางเนื้อเยื่อวิทยาของการศึกษาตำแหน่งของการทำแผลบริเวณหลังของหนูแรทได้แก่ กลาง ซ้าย และขวา เป็นเวลา 10 วัน	86
15 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติจากการทดสอบทางเนื้อเยื่อวิทยาของการศึกษาตำแหน่งของการทำแผลบริเวณหลังของหนูแรทได้แก่ กลาง ซ้าย และขวา เป็นเวลา 21 วัน	87
16 ผลการตรวจทางเนื้อเยื่อวิทยาจากแผลเดียวกันซึ่งแบ่งตำแหน่งของแผลเป็น 3 ส่วน ได้แก่ proximal, middle และ distal หลังผ่าตัด 10 และ 21 วัน	88
17 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติจากการทดสอบทางเนื้อเยื่อวิทยาของหนูแรทที่ใช้ผงโคโคซานละลายใน 1% กรดอะซิติก ครบ 10 วัน	93
18 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติจากการทดสอบทางเนื้อเยื่อวิทยาของหนูแรทที่ใช้ผงโคโคซานละลายใน 1% กรดอะซิติก ครบ 21 วัน	97
19 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติจากการทดสอบทางเนื้อเยื่อวิทยาของหนูแรทที่ใช้โคโคซานในรูปสปันจ์ละลายใน 0.9% NaCl ครบ 10 วัน	103
20 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติจากการทดสอบทางเนื้อเยื่อวิทยาของหนูแรทที่ใช้โคโคซานในรูปสปันจ์ละลายใน 0.9% NaCl ครบ 21 วัน	109
21 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติจากการทดสอบทางเนื้อเยื่อวิทยาของหนูแรทที่ใช้โคโคซานและโคตินในรูปผง ครบ 21 วัน	114
22 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติจากการทดสอบความเป็นพิษโดยการฉีดสารละลายโคโคซานเข้าใต้ผิวหนัง (subcutaneous) ครบ 40 วัน	124
23 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของการทดสอบความเป็นพิษโดยการฉีดสารละลายโคโคซานเข้าใต้ผิวหนัง (subcutaneous) ครบ 61 วัน	128
24 ผลของโคโคซานต่ออุณหภูมิร่างกายหนูที่ฉีดสารละลายโคโคซานเข้าใต้ผิวหนังบริเวณต้นคอ	131
25 น้ำหนักตัวของหนูที่เปลี่ยนแปลงหลังฉีดสารละลายโคโคซานเข้าใต้ผิวหนัง	132

รายการรูป

รูปที่		หน้า
1	โครงสร้างทางเคมีของโคติน ไคโตซาน และเซลลูโลส	5
2	ความสัมพันธ์ระหว่างความหนืด ความเข้มข้นต่าง และระยะเวลาในการกำจัดหมู่อะซิติก	11
3	แสดงลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาของ chronic inflammation ของเยื่อบุโพรงจมูก	27
4.1	แสดงกลไกการป้องกันการเกิดลิ่มเลือดของเซลล์บุผนังหลอดเลือดชั้นใน	32
4.2	แสดงกลไกการห้ามเลือดส่วนที่ประกอบด้วยปฏิกิริยาของปัจจัยการแข็งตัวของเลือดใน intrinsic, extrinsic และ common pathway, เกล็ดเลือด และระบบการละลายลิ่มเลือด	34
4.3	แสดงกลไกการห้ามเลือด	36
5	การทดสอบ Hemagglutination	49
6	แสดงตำแหน่งแผลผ่าตัดบนแผ่นหลังหนูทดลองจำนวน 5 แผล	52
7	แสดงตำแหน่งของการทำแผลบนหลังหนูทดลองจำนวน 3 แผล	52
8	แสดงตำแหน่งของการตัดแบ่งภายในแผลเดียวกันโดยแบ่งเป็น proximal, middle และ distal	53
9	แสดงการฉีดสารละลายตัวอย่างเข้าใต้ผิวหนัง (subcutaneous) เพื่อศึกษาการทำให้ระคายเคืองใต้ผิวหนัง	58
10	เปรียบเทียบลักษณะพื้นผิวของผงไคโตซานภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)	65
11	การดูความชื้นกลับของสปันจ์ไคโตซานหลังอบจนน้ำหนักคงที่	67
12	ลักษณะพื้นผิวของสปันจ์ไคโตซานภายใต้กล้อง stereomicroscope	68
13	ลักษณะพื้นผิวภาคตัดขวางของสปันจ์ไคโตซานภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด	69
14	แสดงสปันจ์ไคโตซานจากเปลือกกุ้งและกระดองปลาหมึกก่อนและหลังอบ	72

รายการรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
15	แสดงลักษณะของเซลล์เม็ดเลือดแดงก่อนและหลังการเติมสารละลายโคโตซานจากการย้อมด้วย Wright' s stain	79
16	แสดงลักษณะของเซลล์เม็ดเลือดขาวก่อนและหลังจากเติมสารละลายโคโตซานจากการย้อมด้วย Wright' s stain	80
17	แสดงลักษณะของเกล็ดเลือดก่อนและหลังการเติมสารละลายโคโตซานจากการย้อมด้วย Wright' s stain	81
18	ลักษณะของเม็ดเลือดแดงก่อนและหลังการเติมสารละลายโคโตซานภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด	83
19	ลักษณะของเกล็ดเลือดก่อนและหลังการเติมสารละลายโคโตซานภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด	84
20	แสดงแผลหลังผ่าตัดหลังจากใช้โคโตซานที่ละลายใน 1% กรดอะซิติกเป็นเวลา 3, 10 และ 21 วัน	90
21	แสดงลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาของการสมานแผลที่ทำการผ่าตัดบริเวณผิวหนังบนหลังของหนูแรทหลังจากใช้โคโตซานที่ละลายใน 1% กรดอะซิติกเป็นเวลา 10 วัน โดยการย้อมด้วยสี H&E	91
22	แสดงลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาของการสมานแผลที่ทำการผ่าตัดบริเวณผิวหนังบนหลังของหนูแรทหลังจากใช้โคโตซานที่ละลายใน 1% กรดอะซิติกเป็นเวลา 21 วัน โดยการย้อมด้วยสี H&E	95
23	แสดงแผลผ่าตัดหลังจากใช้สปีนจ์โคโตซานที่ละลายใน 0.9% NaCl เป็นเวลา 3, 10 และ 21 วัน	100
24	แสดงลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาของการสมานแผลที่ทำการผ่าตัดบริเวณผิวหนังบนหลังของหนูแรทหลังจากใช้สปีนจ์โคโตซานที่ละลายใน 0.9% NaCl เป็นเวลา 10 วัน ย้อมด้วยสี H&E	101

รายการรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
25	แสดงลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาของการสมานแผลที่ทำการผ่าตัดบริเวณผิวหนังบนหลังของหนูแรทหลังจากใช้สปีนจ์โคโตซานที่ละลายใน 0.9% NaCl เป็นเวลา 21 วัน ย้อมด้วยสี H&E	107
26	แสดงแผลผ่าตัดหลังจากใช้โคตินและโคโตซานในรูปผงเป็นเวลา 3 และ 21 วัน	110
27	แสดงลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาของการสมานแผลที่ทำการผ่าตัดบริเวณผิวหนังบนหลังของหนูแรทหลังจากใส่ผงโคตินและโคโตซานเป็นเวลา 21 วัน ย้อมด้วยสี H&E	111
28	แสดงอาการอักเสบซึ่งเกิดขึ้นรอบ ๆ บริเวณที่ฉีดสารละลายโคโตซานตัวอย่างชนิดต่าง ๆ เข้าได้ผิวหนังบริเวณต้นคอหนูแรทเป็นเวลา 40 วัน	121
29	แสดงการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาที่บริเวณผิวหนังหนุทดลองหลังการฉีดสารละลายโคโตซานตัวอย่างชนิดต่าง ๆ เข้าได้ผิวหนังเป็นเวลา 40 วัน	122
30	แสดงอาการอักเสบซึ่งเกิดขึ้นรอบ ๆ บริเวณที่ฉีดสารละลายโคโตซานตัวอย่างชนิดต่าง ๆ เข้าได้ผิวหนังบริเวณต้นคอหนูแรทเป็นเวลา 61 วัน	125
31	แสดงการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาที่บริเวณผิวหนังหนุทดลองหลังการฉีดสารละลายโคโตซานตัวอย่างชนิดต่าง ๆ เข้าได้ผิวหนังเป็นเวลา 61 วัน	126

ตัวย่อและสัญลักษณ์

กก.	= กิโลกรัม
อง	= องศาเซลเซียส
ซม.	= เซนติเมตร
น.น.	= น้ำหนัก
มก.	= มิลลิกรัม
มม.	= มิลลิเมตร
มส.	= มิลลิลิตร
%	= percentage
α -	= alpha
β -	= beta
cm	= centimeters
cps	= centipoits
Cd	= collagen fiber deposit
Cf	= collagen fiber form
D	= degree
dl	= decilite
Ep	= epithelial cell
Fb	= fibroblast
Fc	= fibrocyte
γ -	= gamma
g	= gram, gravity
hrs	= hours
η	= intrinsic viscosity
kDa	= kilodalton
Lm	= lymphocyte
Mc	= macrophage

ตัวย่อและสัญลักษณ์ (ต่อ)

μg	= microgram
μl	= microlite
μmole	= micromole
mg	= milligram
mM	= millimolar
Moit	= moisture
M	= molar
Mus	= muscle
SEM	= scanning electron microscope
Vc	= vascular capillary
Mv	= viscosity everage molecular weight

1. บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

ปัจจุบันประเทศไทยเป็นผู้ส่งออกอาหารทะเลระดับนำของโลก จึงมีเศษวัสดุเหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตโดยเฉพาะอย่างยิ่งเปลือกกุ้ง และกระดองปลาหมึกในปริมาณมาก แม้ว่าเปลือกกุ้งสามารถนำไปใช้เป็นส่วนผสมของอาหารสัตว์แต่นับว่ายังมีมูลค่าต่ำ นอกจากนั้นจากการสำรวจโรงงานผลิตอาหารทะเลแช่แข็งระยะหลังพบว่ามีผู้รับซื้อกระดองปลาหมึกเพื่อส่งออกไปขายต่างประเทศในรูปวัตถุดิบแต่ก็ซื้อด้วยราคาต่ำเช่นกัน

เปลือกและกระดองสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังซึ่งทำหน้าที่เป็นโครงสร้างห่อหุ้มอวัยวะภายในมีส่วนประกอบสำคัญ 3 ชนิดคือ ไคติน โปรตีน และ แคลเซียมคาร์บอเนต ไคตินเป็นสารโพลีเมอร์ที่เกิดจากการเชื่อมต่อของหน่วยย่อย (monomer) คือ N-acetyl-D-glucosamine ด้วยพันธะ β (1-4) glycosidic สารดังกล่าวนี้นอกจากพบในเปลือกกุ้งและกระดองปลาหมึกแล้วยังพบได้ในโครงสร้างภายนอก (exoskeleton) ของ ปู กุ้ง แมลง รวมทั้งผนังเซลล์ของรา และ แบคทีเรีย ปริมาณที่พบในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดอาจแตกต่างกัน กระดองปลาหมึกประกอบด้วยไคตินประมาณ 36% (Sornprasit, 1997) และเปลือกกุ้งกุลาดำประกอบด้วยไคตินประมาณ 37% (Benjakul and Sophanodora, 1993)

การนำไคตินไปใช้ประโยชน์มีขอบเขตจำกัดเนื่องจากเป็นสารที่ไม่ละลายในน้ำในสารละลายกรดและด่าง รวมทั้งตัวทำละลายอินทรีย์ทั่วไป แต่ถ้านำไคตินมากำจัดหมู่อะซิติกออกจากโมเลกุลจะได้อนุพันธ์ที่มีหมู่เอมิโนอิสระ ($-NH_2$) เรียกว่าไคโตซาน (chitosan) ซึ่งละลายได้ในตัวทำละลายที่เป็นกรดตั้งนั้นจึงสามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้กว้างขวาง Sornprasit (1997) รายงานว่าสามารถเตรียมไคโตซานจากกระดองปลาหมึกได้ 27% และจากเปลือกกุ้ง 21% ของน้ำหนักแห้ง (สุทธวัฒน์ เบญจกุล, 2533)

ไคโตซานที่ผลิตขึ้นอาจมีคุณสมบัติทางเคมีและฟิสิกส์แตกต่างกันในช่วงกว้าง ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับปัจจัยสำคัญ 3 ประการคือ ขนาดของโมเลกุล (molecular weight) ระดับการกำจัดหมู่อะซิติกออกจากโครงสร้างของไคติน (degree of deacetylation) และ แหล่งที่มาของไคติน นอกจากนั้นไคโตซานยังสามารถนำไปใช้เป็นส่วนตั้งต้นเพื่อสังเคราะห์

อนุพันธ์ได้อีกหลายชนิด (Muzzarelli, 1985) จากความหลากหลายของคุณสมบัติดังกล่าว จึงมีการศึกษาเพื่อนำไคโตซานและอนุพันธ์ไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ อย่างกว้างขวาง เช่น ใช้เป็นอาหารเสริมเพื่อลดระดับไขมันและโคเลสเตอรอลในเลือด การผลิตเครื่องสำอาง แรงตกตะกอนน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม เป็นส่วนผสมในอุตสาหกรรมผลิตเยื่อกระดาษ (Nicol, 1991) นอกจากนี้มีรายงานทางการแพทย์แสดงให้เห็นว่าไคโตซานจากเปลือกกุ้งและกระดองปูมีคุณสมบัติช่วยเร่งการหยุดไหลของเลือด (hemostasis) (Brandenberg *et al.*, 1984) และ เร่งการสมานแผล (wound healing) (Balassa and Prudden, 1978)

ผลการทดลองทั้งในหลอดทดลอง (*in vitro*) และในสัตว์ทดลอง (*in vivo*) แสดงให้เห็นว่าไคโตซานมีคุณสมบัติช่วยเร่งการแข็งตัวของเลือด Malette *et al.* (1983) รายงานว่าเมื่อเติมสารละลาย 2% ไคโตซานซึ่งละลายใน 2% กรดอะซิติกลงในตัวอย่างเลือดสุนัขสภาพต่างกันคือ defibrinated blood, heparinized blood และ washed red blood cell มีผลทำให้เกิดการรวมกลุ่มของเม็ดเลือด (coagulation) เร็วขึ้น แสดงว่าไคโตซานทำให้เลือดแข็งตัวด้วยกลไกที่แตกต่างจากการแข็งตัวของเลือดทั่วไป และเมื่อนำมาทดสอบกับแผลผ่าตัดที่ infrarenal aorta ของสุนัขก็พบว่าสามารถเร่งให้เลือดหยุดไหลได้เร็วขึ้น นอกจากนี้ผลสรุปที่สอดคล้องกันนี้ยังปรากฏรายงานในสัตว์ชนิดอื่นเช่น แผลผ่าตัดที่ลิ้นกระต่าย (Klokkevold *et al.*, 1991, 1992) แผลผ่าตัดในสมองของแมว (Brandenberg *et al.*, 1984) รวมทั้งตัวอย่างเลือดของคน วัว สุกร แพะ แกะ ลิง และหนู (Rao and Sharma, 1997) แต่รายงานเหล่านี้ไม่ได้ทำการศึกษาอิทธิพลความเข้มข้นของไคโตซานว่ามีผลต่ออัตราเร่งในการทำให้เลือดแข็งตัว และไม่ปรากฏรายละเอียดว่ามีผลกระทบต่อเม็ดโลหิตขาวหรือเกล็ดเลือดหรือไม่

ผลการทดลองจากหลายคณะแสดงให้เห็นว่าไคตินและไคโตซานมีคุณสมบัติช่วยเร่งการสมานแผล (wound healing) Balassa และ Prudden (1978) ทดสอบคุณสมบัติรูปแบบต่าง ๆ มาใช้รายงานการใช้ผ้าก๊อชปิดแผลที่เคลือบด้วย regenerated chitin จากเปลือกกรอบหัวของพวก crustacean หรือจาก fungal mycelia สามารถเร่งการสมานแผลเกิดขึ้นได้เร็วขึ้น Malette *et al.* (1983) แสดงให้เห็นว่าเมื่อใช้ไหมซึ่งเคลือบด้วยไคโตซานเพื่อเย็บแผลผ่าตัดเส้นเลือด aorta ในสุนัขทำให้แผลหายเร็วขึ้น ที่บริเวณแผลมีการสร้างกล้ามเนื้อเรียบมาห่อหุ้มไว้ และมีเส้นเลือดฝอยแทรกอยู่ระหว่างชั้นของกล้ามเนื้อหลังการทดลอง 1 เดือน

van der Lei and Wildevuur (1989) รายงานว่าเมื่อใช้ polytetrafluoroethylene (PTFE) จุ่มแช่โคโตซานแล้วนำมาซับที่แผลผ่าตัดในหนูทดลองสามารถเร่งการสมานแผลและเร่งการแข็งตัวของเลือดบริเวณเส้นเลือดฝอยได้ นอกจากนี้ Biagini *et al.* (1991) รายงานว่าเมื่อนำ *N*-carboxybutyl chitosan ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของโคโตซานที่ได้จากโคตินของ Alaskan king crab ที่ละลายน้ำเคลือบบนแผ่นเมมเบรนแล้วนำไปทดลองใช้กับผู้ป่วยที่ทำศัลยกรรมพลาสติกบริเวณขา มีผลทำให้แผลหายภายใน 7 วันหลังการทดลอง

Rao และ Sharma (1997) ศึกษาความเป็นพิษของโคโตซานจากเปลือกกุ้งโดยใช้วิธีมาตรฐานซึ่งกำหนดโดย U.S. Pharmacopeia XXI และ Canadian standards ผู้ทำการทดลองรายงานว่าเมื่อฉีดสารละลายโคโตซานเข้าไปในเส้นเลือดหนูทดลองไม่พบอาการผิดปกติใด ๆ ตลอดระยะเวลา 72 ชั่วโมงหลังการฉีด เมื่อนำไปทดสอบการระคายเคืองที่ตากระต่ายและผิวหนังหนูตะเภาก็ไม่พบอาการผิดปกติใด ๆ และเมื่อนำโคโตซานในรูปแผ่นฟิล์มฝังไว้ที่กล้ามเนื้อของกระต่ายไม่พบว่าโคโตซานเป็นสารที่ก่อให้เกิดอาการไข้ (pyrogen)

Sornprasit (1997) รายงานว่าโคโตซานที่ผลิตจากเปลือกกุ้ง (*Penaeus monodon*) ซึ่งมีโครงสร้างเชิงผลึกเป็นแบบแอลฟา (α) และ กระจดองปลาหมึกสองสายพันธุ์ (*Loligo formosana* และ *Loligo lessoniana*) ซึ่งมีโครงสร้างเชิงผลึกเป็นแบบเบต้า (β) มีคุณสมบัติต่างกันหลายด้าน เช่น ความสามารถในการดูดซับน้ำ การดูดซับโลหะ รวมทั้งอัตราเร็วในการถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์ โคติเนสและโคโตไบเอส

ปัจจุบันยังไม่ปรากฏรายงานการนำโคโตซานจากกระจดองปลาหมึกไปประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์ ดังนั้นงานวิทยานิพนธ์นี้จึงมุ่งเน้นที่จะศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของโคโตซานจากกระจดองปลาหมึกและเปลือกกุ้งที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการห้ามเลือด ผลกระทบต่อเม็ดโลหิตแดง เม็ดโลหิตขาว และเกล็ดเลือด การสมานแผล และความปลอดภัยในการนำไปใช้ เพื่อเป็นพื้นฐานสำหรับการนำไปประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์ต่อไปในอนาคต และเนื่องจากยังไม่ปรากฏข้อมูลเกี่ยวกับความเป็นพิษของโคโตซานที่มีโครงสร้างเชิงผลึกเป็นแบบเบต้า จึงได้ทำการทดสอบในการศึกษานี้ด้วย

การตรวจเอกสาร

1. ไคตินและไคโตซาน

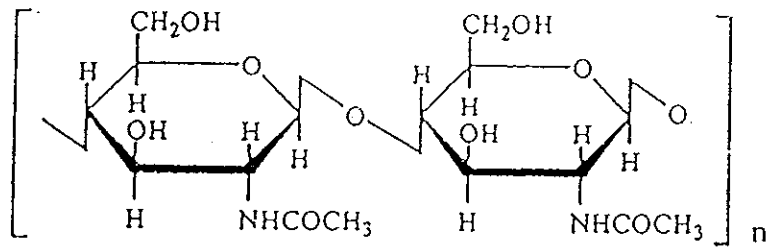
1.1 แหล่งของไคตินในธรรมชาติ

Muzzarelli (1977) กล่าวว่า Henri Braconnot เป็นผู้รายงานการค้นพบไคตินเป็นครั้งแรกในปี ค.ศ. 1811 โดยสกัดจากเชื้อราจึงเรียกว่า fungine ต่อมาปรากฏรายงานอีกหลายชิ้นแสดงให้เห็นว่าไคตินพบกระจายอยู่ทั่วไปทั้งในสัตว์ ฟืช และ จุลินทรีย์ เป็นสารซึ่งทำหน้าที่เป็นโครงสร้างเสริมความแข็งแรงกับเนื้อเยื่อหรือเซลล์เช่นเดียวกับเซลล์ลูโลสในพืช คอลลาเจน คอลดรอยตินซัลเฟต และ เคราตินในสัตว์ เป็นส่วนประกอบสำคัญในเปลือกนอก (exoskeleton) ของสัตว์กลุ่ม Artropod เช่น แมลง บู่ กุ้ง กิ้ง เคน หรืออาจพบได้ที่เนื้อเยื่อผิวหนังของระบบทางเดินอาหาร กระดองของสัตว์ในวงค์ mollusks เช่นปลาหมึก ในเปลือกหอยก็พบไคตินเป็นส่วนประกอบสำคัญเช่นกัน ในพืชพบได้ที่ผนังเซลล์เช่นเดียวกับเชื้อราและแบคทีเรีย นอกจากนี้ยังพบที่ extracellular fiber ของไดอะตอม ประมาณการกันว่าไคตินเป็นสารโพลีเมอร์ชีวภาพที่มีมากเป็นอันดับสอง รองจากเซลลูโลส (Bullock *et al.*, 2000)

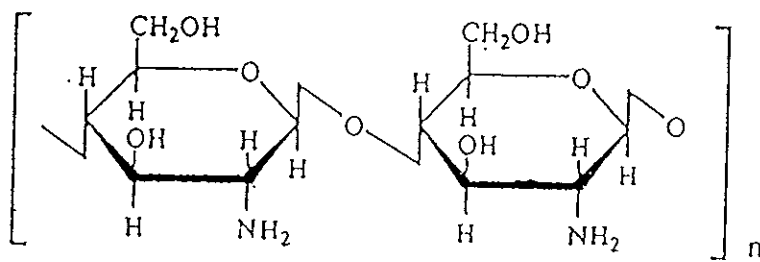
1.2 โครงสร้างทางเคมี ภายภาพและ สารประกอบเชิงซ้อนของไคตินและไคโตซาน

รูปที่ 1 แสดงให้เห็นว่าไคตินเป็นโพลีเมอร์ของ N-acetyl-D-glucosamine เชื่อมต่อด้วยพันธะไกลโคซิดิกชนิดเบต้า 1,4 (β -1- \rightarrow 4 glycosidic bond) เช่นเดียวกับเซลลูโลส มีโครงสร้างทางเคมีต่างกันที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 2 โดยไคตินจะเชื่อมต่อกับหมู่อะซีตาไมด์ (acetamide group) ในขณะที่เซลลูโลสเชื่อมต่อกับหมู่ไฮดรอกซิล (-OH group) จากลักษณะการเรียงตัวของหน่วยย่อยเช่นนี้ทำให้ปลายข้างหนึ่งของโพลีเมอร์มีคาร์บอนเป็นตำแหน่งที่ 6 ในขณะที่ปลายอีกข้างหนึ่งเป็นคาร์บอนตำแหน่งที่ 1 Muzzarelli (1977) รายงานว่าไคตินเป็นของแข็งสีขาวมีรูปร่างไม่แน่นอน ผลึกมีลักษณะเป็นสะเก็ด (flaky) และเป็นมัด (fibrous)

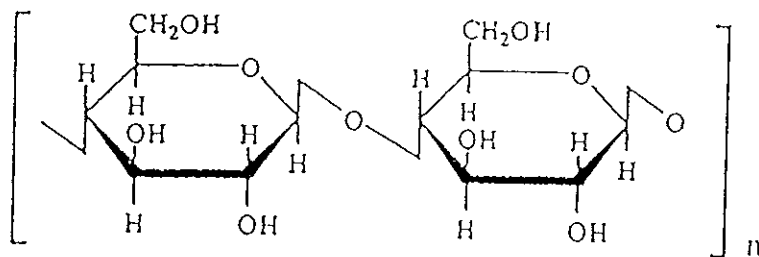
นอกจากการเกาะเกี่ยวระหว่างโมเลกุลแล้วไคตินในธรรมชาติยังเกาะเกี่ยวกับสารชีวโมเลกุลอื่นเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนโดยเฉพาะอย่างยิ่งโปรตีนและแร่ธาตุ หรืออาจมีส่วนประกอบของน้ำตาล โพลีฟีนอล เมลานิน คาโรทีนอยด์ และแอสตราแซนทีน ปนอยู่เล็กน้อยเมื่อนำไคตินมาทำปฏิกิริยากับด่างเข้มข้น หมู่อะซิติดในโครงสร้างของไคตินจะถูกกำจัดออกไปเกิดเป็นผลิตภัณฑ์ที่เรียกว่าไคโตซาน (chitosan) ดังนั้นจึงถือได้ว่าไคโตซานเป็นอนุพันธ์ชนิดหนึ่งของไคติน (รูปที่ 1)



chitin



chitosan



cellulose

รูปที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของไคติน ไคโตซาน และเซลลูโลส

ที่มา : ตัดแปลงจาก Brine (1984)

1.3 การเตรียมโคตินและโคโคซาน

1.3.1 การเตรียมโคติน

เนื่องจากโคตินในธรรมชาติอยู่ในรูปสารประกอบเชิงซ้อนโดยมีโปรตีนและแร่ธาตุเป็นส่วนประกอบสำคัญ ดังนั้นการสกัดด้วยวิธีทางเคมีจึงต้องผ่าน 2 ขั้นตอนสำคัญคือ การกำจัดแร่ธาตุ (demineralization) โดยใช้สารละลายกรด และการกำจัดโปรตีน (deproteinization) โดยใช้สารละลายด่าง และเนื่องจากพันธะไกลโคซิดิกจะถูกทำลายได้ทั้งในสภาพกรดและด่าง ดังนั้นสภาวะของปฏิกิริยาในกระบวนการสกัดที่แตกต่างกันจึงมีผลทำให้คุณสมบัติและคุณภาพของโคตินที่สกัดได้แตกต่างกันด้วย (Muzzarelli, 1977; Ashford *et al.*, 1977)

1.3.1.1 การกำจัดแร่ธาตุ

เปลือกนอกของสัตว์ในวงศ์ crustaceans มีแร่ธาตุเป็นส่วนประกอบประมาณ 30-35% องค์ประกอบส่วนใหญ่คือแคลเซียมคาร์บอเนตซึ่งเมื่อทำปฏิกิริยากับกรดแก่ (strong acid) เช่น HCl (กรดไฮโดรคลอริก) ก็จะถูกเปลี่ยนให้อยู่ในรูปที่ละลายน้ำ จึงสามารถแยกออกจากของผสมได้โดยการกรองหรือตกตะกอน ปัจจัยสำคัญที่ส่งผลกระทบต่อคุณสมบัติ ทั้งทางเคมีและทางกายภาพของโคตินที่ผลิตได้คือ ชนิดและความเข้มข้นของกรด อุณหภูมิ และ ระยะเวลาการทำปฏิกิริยา (Johnson and Peniston, 1982) ทั้งนี้เนื่องจากระดับการทำลายพันธะไกลโคซิดิกเกิดขึ้นแตกต่างกัน ในบางกรณีจึงเปลี่ยนไปใช้กรดอ่อน (weak acid) หรือ สารละลาย EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) แทนเพื่อแก้ปัญหาดังกล่าว สภาวะของปฏิกิริยาสำหรับกระบวนการกำจัดแร่ธาตุจากแหล่งวัตถุดิบต่างชนิดกันซึ่งรวบรวมไว้โดย Muzzarelli (1977) รวมทั้งผลงานวิจัยระยะต่อมาสรุปได้ดังนี้

Hackman (1954 อ้างโดย Muzzarelli, 1977) สกัดโคตินจากเปลือกกุ้งมังกร (lobster) อบแห้งโดยใช้ 2 M HCl ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 ชั่วโมง พบว่าโคตินที่ได้มีค่าเป็นองค์ประกอบน้อยมากจนตรวจวัดไม่ได้

Horowitz *et al.* (1957 อ้างโดย Muzzarelli, 1977) ใช้เปลือกกุ้งมังกรที่ผ่านการกำจัดแคลเซียมคาร์บอเนตออกแล้ว มาสกัดแร่ธาตุโดยใช้สารละลายกรดฟอร์มิคเข้มข้น 90% ที่อุณหภูมิห้อง

Takeda และ Abe (1962 อ้างโดย Muzzarelli, 1977) และ Takeda และ Katsuura (1964 อ้างโดย Muzzarelli, 1977) กำจัดแร่ธาตุในกระดองปู (king crab) โดยใช้สารละลาย EDTA pH 10 ที่อุณหภูมิห้อง

Broussignac (1968 อ้างโดย Muzzarelli, 1977) กำจัดแร่ธาตุในกระดองปูโดยใช้ 1.37 M HCl ปริมาณมากเกินไป ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าได้ผลิตผลประกอบด้วยเถ้า 0.4-0.5%

สุทธวัฒน์ เบญจกุล (2533) กำจัดแร่ธาตุจากเปลือกกุ้งแช่บัว (*Penaeus indicus*) ที่ผ่านการกำจัดโปรตีนแล้วด้วย 1.25 M HCl ที่อุณหภูมิห้อง (27-30 °C) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ใช้อัตราส่วนระหว่างสารตัวอย่างและสารละลายกรด 1:10 (น.น.:ปริมาตร) พบว่าไคตินที่ได้ประกอบด้วยเถ้า 0.18%

1.3.1.2 การกำจัดโปรตีน

การแยกโปรตีนซึ่งเกาะเกี่ยวอยู่กับไคตินส่วนใหญ่ดำเนินการได้ 2 วิธีคือ สกัดโปรตีนออกไปด้วยสารละลายต่างและย่อยสลายด้วยเอนไซม์ สภาวะของปฏิกิริยาสำหรับกระบวนการกำจัดโปรตีนจากแหล่งวัตถุดิบต่างชนิดกันซึ่งรวบรวมไว้โดย Muzzarelli (1977) และผลงานวิจัยระยะต่อมาสรุปได้ดังนี้

Whistler และ BeMiller (1962 อ้างโดย Muzzarelli, 1977) กำจัดโปรตีนจากกระดองปูโดยใช้ตัวอย่างสด 500 กรัม ใน 10% NaOH (2.50 M) เป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิห้องโดยเปลี่ยนน้ำใหม่ทุกวัน ล้างจนเป็นกลางด้วยน้ำ กำจัดสารสีด้วย 95% เอทานอล ปริมาตร 6 ลิตร ตามด้วยอะซิโตน 1 ลิตร, เอทานอล 2.5 ลิตร และชั้นสุดท้ายล้างด้วยอีเทอร์ 500 มล. จากนั้นนำไปทำให้แห้งภายใต้การลดความดัน นำไคตินแห้งไปแช่ใน 37% HCl ที่อุณหภูมิ -20 °C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ล้างด้วยน้ำจนเป็นกลาง ได้ไคติน 20% และมีไนโตรเจน 7.1%

Anderson *et al.* (1978) แยกโปรตีนจาก Antarctic krill (*Euphausia superba*) โดยใช้ 3.5% NaOH (0.88M) ที่อุณหภูมิ 90-95 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ใช้อัตราส่วนระหว่างวัตถุดิบต่อสารละลายต่าง 1:10 (น.น.:ปริมาตร)

No *et al.* (1989) รายงานว่าวิธีกำจัดโปรตีนจากเปลือกกุ้งก้ามกราม (crawfish) ที่ดีที่สุดคือ ใช้ 3% NaOH (0.75 M) ที่อุณหภูมิ 65 °C กวนเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ใช้อัตราส่วนระหว่างสารตัวอย่างและสารละลายต่าง 1:10 (น.น.:ปริมาตร)

สุทธวัฒน์ เบญจกุล (2533) นำเปลือกกุ้ง (*Penaeus indicus*) อบแห้งที่ผ่านการบดให้มีขนาด 1.4-2.0 มิลลิเมตร มากำจัดโปรตีนด้วย 2.0% NaOH (0.50 M) ที่อุณหภูมิ 100 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ใช้อัตราส่วนระหว่างเปลือกกุ้งและสารละลายต่าง 1:10 (น.น.:ปริมาตร)

Kandaswamy (1978) เตรียมโคตินจากกระดองปลาหมึก (*Loligo indica*) โดยกำจัดโปรตีนด้วย 1.0 M NaOH (4%) ที่อุณหภูมิ 100 °ซ เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ได้โคติน 42-46%

Sornprasit (1997) เตรียมโคตินจากกระดองปลาหมึกสองสายพันธุ์ (*L. lessoniana* และ *L. formosana*) ซึ่งกำจัดโปรตีนด้วย 1.0 M NaOH ใช้อัตราส่วนระหว่างวัตถุดิบต่อสารละลายต่าง 1:13 (น.น.:ปริมาตร) ที่อุณหภูมิ 50 °ซ เป็นเวลา 5 ชั่วโมง ได้โคติน 36%

Takeda และ Abe (1962 อ้างโดย Muzzarelli, 1977) และ Takeda และ Katsuura (1964 อ้างโดย Muzzarelli, 1977) ทำการย่อยโปรตีนจากกระดองปู (King crab) ด้วยเอนไซม์เช่น proteinase จากปลาทูน่า ที่ pH 8.6 อุณหภูมิ 37.5 °ซ, papain ที่ pH 5.5-6.0 อุณหภูมิ 37.5 °ซ หรือ จากแบคทีเรีย ที่ pH 7.0 อุณหภูมิ 60 °ซ เป็นเวลา 60 ชั่วโมง พบว่าโคตินที่ได้ยังคงมีส่วนประกอบของโปรตีน 5% นอกจากนั้นยังมีการนำเอนไซม์ตัวอื่นมาใช้ได้อีก โดย Broussignac (1968 อ้างโดย Muzzarelli, 1977) นำกระดองปูที่ผ่านการกำจัดแร่ธาตุแล้วไปกำจัดโปรตีนโดยใช้เอนไซม์ papain, pepsin หรือ trypsin

1.3.2 การเตรียมโคโตซาน

การเตรียมโคโตซานจากโคตินดำเนินการโดยกำจัดหมู่อะซิติกที่จับอยู่กับคาร์บอนตำแหน่งที่ 2 ของโคตินออกไป กระบวนการนี้เรียกว่า deacetylation ซึ่งวิธีทางเคมีทำได้โดยนำโคตินไปทำปฏิกิริยากับสารละลาย NaOH เข้มข้น (40-45%; 10.0-12.5 M) ที่อุณหภูมิสูง จากการศึกษาพบว่า การปรับเปลี่ยนคุณลักษณะของโคตินซึ่งเป็นสารตั้งต้น และการใช้สภาวะของปฏิกิริยาต่างกันทำให้คุณสมบัติทางเคมีและฟิสิกส์ของผลิตภัณฑ์โคโตซานที่ได้มีความหลากหลายเหมาะแก่การนำไปประยุกต์ใช้ในงานด้านต่าง ๆ แตกต่างกันไป สภาวะของปฏิกิริยาสำหรับการเตรียมโคโตซานจากแหล่งวัตถุดิบต่างชนิดกันซึ่งรวบรวมไว้โดย Muzzarelli (1977) รวมทั้งผลงานวิจัยระยะต่อมาสรุปได้ดังนี้

1) ขนาดของวัตถุดิบ

Muzzarelli (1977) กล่าวว่าอัตราเร็วในการกำจัดหมู่อะซิติกและความหนืดของโคโตซานที่ผลิตได้จากโคตินที่มีขนาด 180-850 ไมโครเมตร หรือ 20-80 mesh มีค่าใกล้เคียงกัน Bough *et al.* (1978) เตรียมโคโตซานจากเปลือกกุ้งบดขนาด 1, 2 และ 6.4 มิลลิเมตร พบว่าโคโตซานที่เตรียมจากเปลือกกุ้งบดขนาดเล็กจะมีความหนืดและน้ำหนักโมเลกุลสูงกว่าขนาดใหญ่

2) สภาวะของปฏิกิริยาในการกำจัดแร่ธาตุและโปรตีน

Madhavan และ Ramachandran (1974 อ้างโดย Muzzarelli, 1977) แสดงให้เห็นว่าการเตรียมโคโคซานจากโคตินซึ่งกำจัดเกลือแร่ด้วย HCl ความเข้มข้นสูงกว่า 1.25 M มีผลทำให้ความหนืดของโคโคซานลดลงซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Muzzarelli (1977) สรุปได้ว่าสภาวะของปฏิกิริยาในขั้นตอนการกำจัดโปรตีนด้วยด่างมีผลกระทบต่อคุณสมบัติของโคโคซานน้อยกว่าในขั้นตอนการกำจัดแร่ธาตุโดยใช้กรด

3) ระยะเวลาของปฏิกิริยาในการกำจัดหมู่อะซิติก

Nud' ga *et al.* (1970) และ Namazaki และ Kito (1975 อ้างโดย Muzzarelli, 1977) รายงานว่าระยะเวลาในการกำจัดหมู่อะซิติกระหว่าง 1-6 ชั่วโมง ไม่มีผลต่อระดับการกำจัดหมู่อะซิติกจากโมเลกุลของโคติน แต่ถ้าใช้เวลาเกิน 6 ชั่วโมง มีผลทำให้โคโคซานที่ได้มีความหนืดลดลง 10 เท่าของค่าสูงสุด Muzzarelli (1977) จึงแนะนำว่าการใช้ 50% NaOH (12.5 M) ที่อุณหภูมิ 118°C เวลา 30 นาที น่าจะเพียงพอสำหรับการเตรียมโคโคซานที่มีความหนืดสูง ต่อมา Bough *et al.* (1978) ศึกษาระยะเวลาในการกำจัดหมู่อะซิติกโดยใช้ 50% NaOH อัตราส่วนโคตินต่อด่าง 1:5 หรือ 1:10 (น.น.:ปริมาตร) เป็นเวลา 5 และ 15 นาที ที่อุณหภูมิ $145-150^{\circ}\text{C}$ ภายใต้บรรยากาศไนโตรเจน พบว่าการกำจัดหมู่อะซิติกที่ใช้ระยะเวลาสั้นจะได้โคโคซานที่มีความหนืดและน้ำหนักโมเลกุลสูงกว่าที่ใช้เวลานาน

Kurita *et al.* (1993) เตรียมโคโคซานจากกระดองปลาหมึก (*Ommastrephes bartrani*) โดยนำโคตินมาทำปฏิกิริยากับ 40% NaOH (10.0M) ที่อุณหภูมิ 80°C ภายใต้บรรยากาศของไนโตรเจน เป็นเวลา 3 และ 6 ชั่วโมง อัตราส่วนของโคตินต่อสารละลายด่าง เท่ากับ 1:20 (น.น.:ปริมาตร) ได้โคโคซานที่มีค่าระดับการกำจัดหมู่อะซิติก (degree of deacetylation) 80 และ 97% ตามลำดับ Sornprasit (1997) เตรียมโคโคซานจากกระดองปลาหมึกสองสายพันธุ์ (*L. formosana* และ *L. lessoniana*) โดยการกำจัดหมู่อะซิติกด้วย 50% NaOH อัตราส่วนด่างต่อโคติน 1:15 (น.น.:ปริมาตร) ที่อุณหภูมิ 60°C ภายใต้บรรยากาศไนโตรเจนเป็นเวลา 5 ชั่วโมง ได้โคโคซาน 27%

นพรัตน์ มะเห (2541) เตรียมโคโคซานจากเปลือกกุ้งกุลาดำมาทำการกำจัดหมู่อะซิติกโดยการทำปฏิกิริยากับ 50% NaOH ที่อุณหภูมิ 100°C ภายใต้สุญญากาศเป็นเวลา 1 ชั่วโมง อัตราส่วนระหว่างโคตินและสารละลายด่าง 1:30 (น.น.:ปริมาตร) ล้าง

ด้วยน้ำกรองจนเป็นกลาง ดำเนินการซ้ำอีกครั้งเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการกำจัดหมู่อะซิติก โดยใช้อัตราส่วนโคตินต่อสารละลายต่างเท่ากับ 1:5 (น.น.:ปริมาตร) เป็นเวลา 30 นาที มีระดับการกำจัดหมู่อะซิติกเป็น 97.20%

4) ความเข้มข้นต่างในปฏิกิริยาการกำจัดหมู่อะซิติก

จากการกำจัดหมู่อะซิติกภายใต้ระบบที่มีต่างเข้มข้นทำให้โปรตีนทั้งหมด และ กรดอะมิโนละลายออกมา ทำให้ได้โคโตซานที่ปนเปื้อนสารอนินทรีย์น้อยมากซึ่งทราบได้จากปริมาณเถ้าที่วัดได้มีน้อยกว่า 0.04% (Sornprasit, 1997)

Wu และ Bough (1978) ศึกษาอิทธิพลความเข้มข้นของ NaOH ที่ใช้ ทำปฏิกิริยา 3 ระดับคือ 35, 40 และ 50% (8.75, 10.00, 12.50 M) และระยะเวลาต่อการกำจัดหมู่อะซิติก ที่อุณหภูมิ 100 °C พบว่า เมื่อใช้ต่างความเข้มข้นสูงขึ้นและระยะเวลาการทำปฏิกิริยานานขึ้นทำให้ความหนืดของโคโตซานลดลงทั้งที่ระดับความเข้มข้นของต่าง 40 และ 50% สำหรับที่ความเข้มข้น 35% ความหนืดของผลิตภัณฑ์ค่าสูงสุดเมื่อใช้ระยะเวลาการทำปฏิกิริยา 21 ชั่วโมง (รูปที่ 2) โดยให้เหตุผลว่าความเข้มข้นของต่างที่เพิ่มขึ้นอาจมีผลต่อการทำลายโครงสร้างหรืออาจทำให้โมเลกุลของโคโตซานสั้นลง

5) สภาพบรรยากาศของปฏิกิริยา

เนื่องจากปฏิกิริยาการกำจัดหมู่อะซิติกทำที่อุณหภูมิสูง จึงมีโอกาสเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) ขึ้นได้ สภาพบรรยากาศของปฏิกิริยาการกำจัดหมู่อะซิติกที่ปรากฏในรายงานมี 3 แบบคือ ดำเนินการภายใต้บรรยากาศของไนโตรเจน, บรรยากาศปกติ และสุญญากาศ

Rigby (1936) และ Walfrom *et al.* (1958) อ้างโดย Muzzarelli (1977) รายงานวิธีกำจัดหมู่อะซิติกจากโคตินโดยใช้ 40% NaOH ที่อุณหภูมิ 115 °C 6 ชั่วโมง ภายใต้บรรยากาศไนโตรเจน พบว่าสามารถกำจัดหมู่อะซิติกได้ 82%

Muzzarelli (1977) และ Bough *et al.* (1978) รายงานว่าการกำจัดหมู่อะซิติกภายใต้สภาพบรรยากาศของก๊าซเฉื่อย เช่นไนโตรเจนจะได้โคโตซานที่มีความหนืดสูงกว่าการทำปฏิกิริยาในสภาพบรรยากาศปกติที่มีออกซิเจน

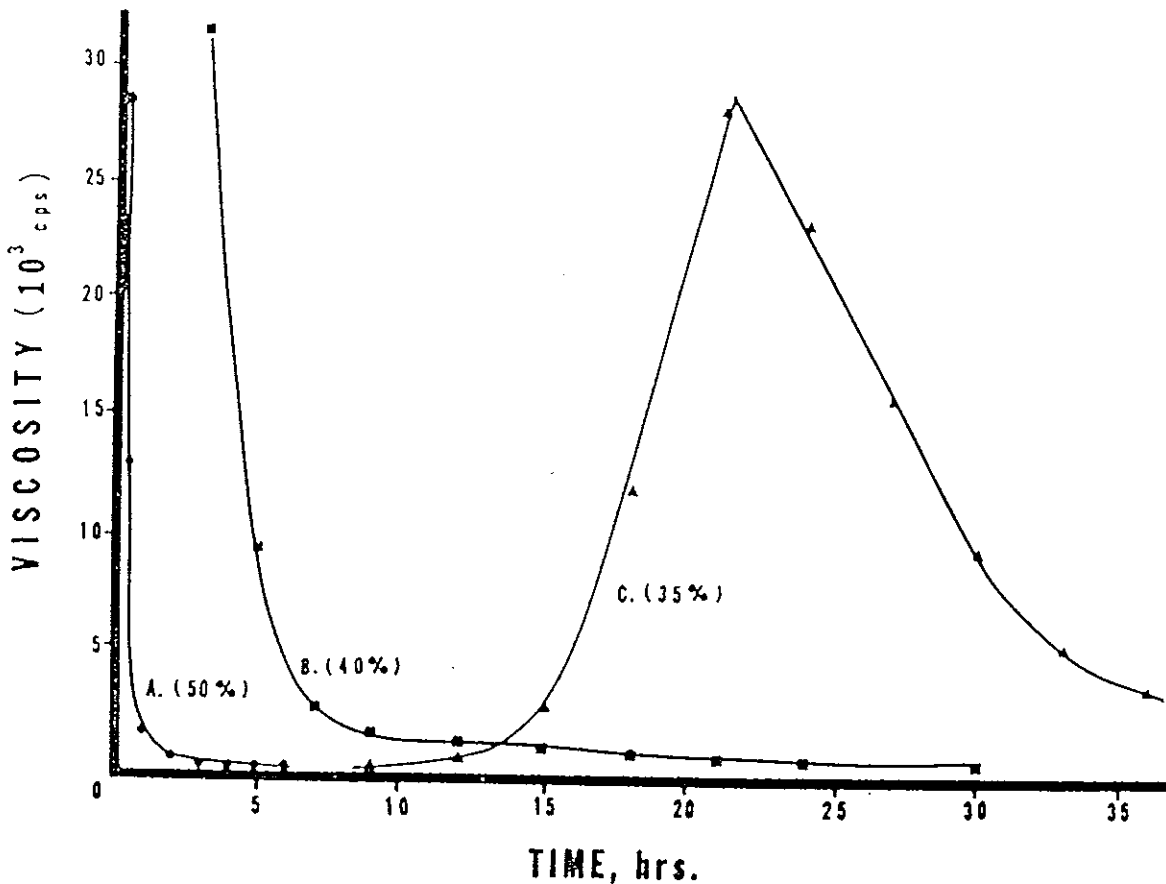
Kurita (1986) กำจัดหมู่อะซิติกภายใต้บรรยากาศปกติแต่เติมไฮโดรฟีนอลให้ไปจับกับออกซิเจนเพื่อหลีกเลี่ยงการทำลายพันธะไกลโคซิดิกที่เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันที่นำมาซึ่งการลดลงของน้ำหนักโมเลกุล

สุทรวัดน์ เบญจกุล (2533) เปรียบเทียบการกำจัดหมู่อะซิติกของโคตินจากเปลือกกุ้งแช่บ้วยด้วย 50% NaOH ที่อุณหภูมิ 100 °C ภายใต้สภาวะสุญญากาศและ

ภายใต้บรรยากาศของก๊าซไนโตรเจน เป็นเวลา 30 นาที อัตราส่วนระหว่างโคตินและสารละลายต่างเท่ากับ 1:5 (น.น.:ปริมาตร) พบว่าโคโตซานที่เตรียมได้จากทั้งสองสภาวะมีความหนืดใกล้เคียงกัน

6) การฟอกสี

Moorjani et al. (1975 อ้างโดย Muzzarelli, 1977) พบว่าการฟอกสีโดยใช้ 0.5% ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ มีผลทำให้โคโตซานมีความหนืดลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ที่ไม่ผ่านการฟอกสี



รูปที่ 2 ความสัมพันธ์ระหว่างความหนืด ความเข้มข้นต่างและระยะเวลาในการกำจัดหมู่อะซิติล

A: 50% NaOH, B: 40% NaOH, C: 35% NaOH

ที่มา : Wu และ Bough (1978)

1.4 คุณสมบัติของโคโตซาน

ปัญหาสำคัญในการผลิตโคโตซานคือผลิตภัณฑ์ที่ได้มักมีคุณสมบัติทั้งทางเคมีและกายภาพไม่แน่นอน แม้ว่าจะใช้วัตถุดิบจากแหล่งเดียวกันทั้งนี้เกิดจากปัจจัยหลัก 2 ประการคือ ระดับการกำจัดหมู่อะซิติกและน้ำหนักโมเลกุลที่แตกต่างกันของโคโตซาน

1.4.1 ระดับการกำจัดหมู่อะซิติก (degree of deacetylation)

โคโตซานที่มีระดับการกำจัดหมู่อะซิติกสูงยิ่งทำให้มีอะมิโนอิสระสามารถจับโปรตอนทำให้เกิดประจุบวกที่พีเอชเป็นกลางมากขึ้น ปัจจัยดังกล่าวนี้มีอิทธิพลต่อคุณสมบัติทางเคมีและทางกายภาพของโพลีเมอร์ การวัดค่าระดับการกำจัดหมู่อะซิติกของโคโตซานอาจดำเนินการได้หลายวิธีเช่น UV- spectroscopy (Castle *et al.*, 1984; Muzzarelli and Rocchetti, 1985) IR spectroscopy (Sannan *et al.*, 1978) mass spectrometry (Hayes and Devies, 1978) conductometric titration (Kurita *et al.*, 1993) colorimetric methods (Neugebauer and Brzezinski, 1989; Curotto and Aros, 1993; Clarke and Knowles, 1994) และใช้เอนไซม์ (Nanjo *et al.*, 1991)

Muzzarelli (1985) พัฒนาเทคนิคการวัดระดับการกำจัดหมู่อะซิติกของโคโตซานด้วย UV - spectroscopy โดยการอ่านค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายโคโตซานในกรดอะซิติกจาก first derivative absorption spectra ที่ความยาวคลื่น 202 นาโนเมตร เพราะที่ความยาวคลื่นนี้เป็นจุดที่การดูดกลืนแสงของกรดอะซิติกมีค่าคงที่ไม่ขึ้นกับความเข้มข้น (isobestic point) จึงไม่มีผลรบกวนต่อการดูดกลืนแสงของ N-glucosamine ผู้วิจัยกล่าวว่าเป็นวิธีที่ดีที่สุดเพราะเป็นวิธีที่ง่าย มีความแน่นอน และไม่ทำลายสารตัวอย่าง และรายงานว่าระดับการกำจัดหมู่อะซิติกของโคตินและโคโตซานทั่วไปมีค่าประมาณ 10 และ 60% ตามลำดับ สำหรับโคโตซานที่กำจัดหมู่อะซิติกได้ค่อนข้างสมบูรณ์มีค่าอยู่ในช่วง 90-100% Anonymous (1989 อ้างโดย สุทรวัฒน์ เบญจกุล, 2533) กล่าวว่าโคโตซานที่ผลิตขายในตลาดมีค่าระดับการกำจัดหมู่อะซิติกอยู่ในช่วง 70-90%

Sornprasit (1997) เตรียมโคโตซานจากโคตินที่ได้จากกระดองปลาหมึกด้วยวิธีดังกล่าวข้างต้น เมื่อนำผลิตภัณฑ์มาวิเคราะห์ระดับการกำจัดหมู่อะซิติกด้วย UV - spectroscopy พบว่ามีค่าสูงกว่า 90%

1.4.2 น้ำหนักโมเลกุล

ขนาดของโพลีเมอร์เป็นปัจจัยสำคัญอีกประการหนึ่งที่กำหนดคุณสมบัติทางเคมีและกายภาพของโคตินและโคโตซาน ตั้งแต่ขั้นตอนในการเตรียมโคตินและโคโตซาน ทำให้ได้น้ำหนักโมเลกุลที่แตกต่างกัน เนื่องจากโคตินหรือโคโตซานที่เตรียมขึ้นแต่ละครั้งมีขนาดโมเลกุลต่างกันได้ในช่วงกว้าง การบ่งขนาดหรือน้ำหนักโมเลกุลอาจแสดงเป็นค่า number averaged molecular weight (M_n), weight averaged molecular weight (M_w) และ viscosity averaged molecular weight (M_v) อย่างไรก็ตาม Chang (1980) อ้างโดย Sornprasit, 1997) กล่าวว่า M_v และ M_w มีค่าใกล้เคียงกัน ดังนั้นจึงใช้แทนกันได้

การวิเคราะห์หาค่าน้ำหนักโมเลกุลของโคตินและโคโตซานอาจทำได้หลายวิธีเช่น การวัดค่า light scattering (Hackman and Goldberg, 1974 อ้างโดย Sornprasit, 1997), membrane osmometry, viscometry และ high-performance liquid chromatography (Wu *et al.*, 1976; Domard and Rinaudo, 1983)

Bough *et al.* (1978) กล่าวว่าค่าน้ำหนักโมเลกุลของโคตินและโคโตซานที่เตรียมได้ ขึ้นอยู่กับปัจจัย 2 ประการ คือ ลักษณะของวัตถุดิบและสภาวะของปฏิกิริยาแต่ละขั้นตอนที่ใช้ เช่น ในการกำจัดแร่ธาตุเพื่อสกัดโคติน ถ้าใช้กรดที่ความเข้มข้นสูง ใช้เวลานานขึ้นและทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิที่สูงขึ้น ทำให้โคตินที่ได้มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำลง และในการเตรียมโคโตซานถ้ากำจัดหมู่อะซิติกโดยใช้ด่างที่ความเข้มข้นสูงขึ้น ใช้เวลานานขึ้น อุณหภูมิสูงขึ้น และทำในบรรยากาศเปิดที่มีก๊าซออกซิเจนอยู่ มีผลทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำลงเช่นกัน

Hackman และ Goldberg (1974 อ้างโดย Sornprasit, 1997) รายงานเกี่ยวกับการกำจัดแร่ธาตุจากเปลือกกุ้งที่มีขนาด 150 mesh โดยใช้กรดอะซิติกเข้มข้น 1 M (3.0%) และกำจัดโปรตีน 2 ครั้ง ด้วย 1 M NaOH ที่ 100 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ได้โคโตซานมีน้ำหนักโมเลกุล 1.306×10^6 ดาลตัน

Lee (1974 อ้างโดย Muzzarelli, 1977) ศึกษาผลของวิธีการหาค่าน้ำหนักโมเลกุลของเบต้าโคตินและโคโตซาน เพื่อเปรียบเทียบกับแอลฟาโคติน โดยใช้กระดองปลาหมึก *Loligo species* ทำการกำจัดโปรตีนด้วย pronase และล้างด้วย 5 M NaOH (20%) 3 ครั้ง แล้วแบ่งโคตินมาทำการกำจัดหมู่อะซิติกใน 45% NaOH (11.3 M) ภายใต้บรรยากาศที่มีก๊าซไนโตรเจน 3 ช่วงเวลา ที่อุณหภูมิ 140 °C เมื่อวัดค่าน้ำหนักโมเลกุลของโคตินและโคโตซานที่ 40, 60 และ 80 นาที เป็น 2.5×10^5 , 7.25×10^5 , 4.92×10^5 และ

2.35x10⁵ ดาลตัน ตามลำดับ จะสังเกตได้ว่าเมื่อเวลาในการกำจัดหมู่อะซิติกเพิ่มขึ้นทำให้น้ำหนักโมเลกุลของโคโคซานลดลง Muzzarelli (1985) รายงานว่าน้ำหนักโมเลกุลของโคตินในธรรมชาติ โคตินและโคโคซานที่ผลิตขายเป็น 1x10⁶, 1-5x10⁵ และ 1-5x10⁵ ดาลตัน ตามลำดับ

Sornprasit (1997) ทำการเตรียมโคโคซานจากวิธีข้างต้นได้โคโคซานที่มีน้ำหนักโมเลกุล 9.5x10⁶ ดาลตัน

1.4.3 คุณสมบัติทางกายภาพของโคติน

Rudall (1963 อ้างโดย Muzzarelli, 1977) กล่าวว่าผลการศึกษาโดย X-ray crystallography พบว่า โคตินที่สกัดออกมามีการเกาะเกี่ยวกันระหว่างโมเลกุล (intermolecular interactions) ด้วยพันธะไฮโดรเจน (H-bond) ทำให้เกิดโครงสร้างทางกายภาพแตกต่างกัน 3 รูปแบบ คือ α , β และ γ รูปแบบ α (แอลฟา) เกิดจากการเรียงตัวของโมเลกุลแบบสลับ (antiparalell) คือปลายของโมเลกุลหนึ่งเป็นคาร์บอนตำแหน่งที่ 6 เกาะเกี่ยวกับอีกโมเลกุลหนึ่งซึ่งเรียงตัวให้ปลายเป็นคาร์บอนตำแหน่งที่ 1 และเป็นเช่นนี้สลับกันไป พันธะไฮโดรเจนภายในโมเลกุลและระหว่างโมเลกุลมีความแข็งแรง โคตินรูปแบบนี้พบในธรรมชาติมากที่สุดเช่น เปลือกกุ้ง กระจูดปู เปลือกนอกของแมลง รูปแบบ β (เบต้า) เกิดจากการเรียงตัวแบบขนาน (paralell) คือปลายข้างหนึ่งของทุกโมเลกุลเป็นคาร์บอนตำแหน่งที่ 6 มีพันธะไฮโดรเจนที่ไม่แข็งแรง โคตินรูปแบบนี้ส่วนใหญ่พบในกระดองปลาหมึก รูปแบบ γ (แกมมา) เกิดจากการเกาะเกี่ยวระหว่างสองโมเลกุลซึ่งมีปลายเป็นคาร์บอนตำแหน่งที่ 6 สลับกับอีกโมเลกุลหนึ่งซึ่งมีปลายเป็นคาร์บอนตำแหน่งที่ 1 และเป็นเช่นนี้สลับกันไป โคตินรูปแบบนี้พบในธรรมชาติไม่มากนัก เช่น รังไหมและเชื้อราบางชนิด

Kandaswamy (1978) ทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเบต้าโคตินจากกระดองปลาหมึก (*L. indica*) และ Polychaete anneals (*Nereis diversicolor*) ไปเป็นแอลฟาโคติน ซึ่งประสบผลสำเร็จโดยใช้การรมด้วยไอของกรดไนตริก หรือกรดอะซิติกเข้มข้น 6 M หลังจากนั้นทำการกำจัดหมู่อะซิติกทำให้ค่า acetyl content ลดลงจาก 9.62 เป็น 7.40% และ จาก 9.57 เป็น 7.60% และทำให้อยู่ในรูปของแอลฟาโคติน ในทางตรงข้ามจะไม่มี การเปลี่ยนแปลงทั้งค่าของ acetyl content และรูปแบบเมื่อใช้แอลฟาโคตินที่ได้จากเปลือกปู (*Neptunes sanguinolentus*)

1.4.4 การหมุนระนาบแสงโพลาไรซ์ของโคติน

เนื่องจากโครงสร้างหน่วยย่อยของโคตินเป็น N-acetylglucosamine ประกอบด้วยอะตอมคาร์บอนจำนวนหนึ่งที่เรียงตัวแบบไม่สมมาตร จึงมีคุณสมบัติที่ทำให้เกิดการหมุนระนาบแสงโพลาไรซ์ Sornprasit (1997) รายงานว่าสารละลายโคตินจากกระตองปลาหมึกทั้งสองชนิด (*L. lessoniana* และ *L. formosana*) มีการหมุนแสงระนาบเดียวไปทางซ้าย (lavoratory) และไม่เปลี่ยนแปลงการหมุนตลอดระยะเวลาการเก็บที่อุณหภูมิห้องนาน 2 สัปดาห์ ซึ่งสอดคล้องกับการหมุนระนาบแสงของโคตินจากแมงดาทะเลที่รายงานโดย Austin *et al.* (1981) ในขณะที่โคตินจากเปลือกกุ้งมีการหมุนแสงระนาบเดียวไปทางขวา (dextrorotatory) มีมุมของการหมุนเป็น $+98.82 \text{ degree cm}^2\text{g}^{-1}$ ระหว่างการเก็บ 4 วันแรก แต่หลังการเก็บไว้ 7 วันการหมุนระนาบแสงโพลาไรซ์จะเปลี่ยนไปเป็นทางซ้าย โดยมีมุมการหมุนเป็น $-98.82 \text{ degree cm}^2\text{g}^{-1}$ และค่าไม่เปลี่ยนแปลงหลังจากนั้น (ตารางที่ 1) เช่นเดียวกับโคตินตัวอื่นที่เตรียมโดยวิธี harsher treatment มีการหมุนแสงระนาบเดียวไปทางขวา ความจำเพาะของการหมุนระนาบแสงของสารละลายโคตินจะเปลี่ยนไปตามเวลาการเก็บ นอกจากการหมุนระนาบแสงโพลาไรซ์ของโคตินที่ขึ้นกับอะตอมของคาร์บอนที่ไม่สมมาตรแล้วยังขึ้นกับโครงสร้างที่เป็นแบบเกลียวด้วย

ตารางที่ 1 คุณสมบัติการหมุนระนาบแสงโพลาไรซ์ของโคตินจาก *L. lessoniana*, *L. formosana* และ *P. monodon* ที่ละลายใน dimethylacetamide ที่มีลิเทียมคลอไรด์เข้มข้น 5% ที่เวลาเริ่มต้นและหลังจากเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 14 วัน

Spicies	$[\alpha]_D^{25}$	
	เริ่มต้น	14 วัน
<i>L. lessoniana</i>	-96.57	-96.57
<i>L. formosana</i>	-96.58	-96.58
<i>P. monodon</i>	+98.82	-98.82

ที่มา : Sornprasit (1997)

1.5 คุณสมบัติบางประการของโคตินและโคโตซาน

1.5.1 การละลาย

โคตินเป็นโพลีเมอร์ที่ไม่ละลายน้ำและตัวทำละลายอินทรีย์ทั่วไปเช่น chloroform, methanol, ethanol, hexane, ether ไม่ละลายในกรด-ด่างเจือจาง และด่างเข้มข้น แม้มีรายงานว่าโคตินละลายได้ในกรดเข้มข้นเช่น มีเทนซัลโฟนิก กรดซัลฟูริก และกรดฟอร์มิก รวมทั้งเกลือเข้มข้นและร้อน เช่น lithium thiocyanate, lithium oxide, hexafluoroisopropanol, hexafluoroacetone sesquihydrate หรือสารละลายผสมเช่น trichloroacetic acid กับ methylene chloride และ chloral hydrate (Brine and Austin, 1975 อ้างโดย Muzzarelli, 1977) แต่มีผลทำให้พันธะไกลโคซิดิกถูกทำลายได้ และเมื่อตั้งทิ้งไว้นาน ๆ อาจมีการดึงเอาหมู่อะซิติกออกไปด้วย (Kong, 1975; Tokura, *et al.*, 1983)

Ashford *et al.* (1977) รายงานว่าเมื่อนำโคตินใส่ลงในสารละลายต่างที่เป็นเย็นจะเกิดการพองตัวเนื่องจากระยะระหว่างสายโซ่ในโครงสร้างกว้างออก ไฮโดรเจนอิสระถูกแทนที่ด้วย Na^+ และเมื่อตั้งทิ้งไว้นาน ๆ อาจเกิดปฏิกิริยากำจัดหมู่อะซิติกออกไปบางส่วน นอกจากนั้นโคตินสามารถพองตัวได้ในสารละลาย อินทรีย์ที่มีขั้ว เช่น dimethyl sulfoxide, dimethylformamide, pyridine และ hexamethylphosphoramide (Kurita *et al.*, 1993)

โคโตซานเป็นโพลีเมอร์ที่ไม่ละลายน้ำเช่นกันแต่ละลายได้ในตัวทำละลายกรดอ่อน เช่น กรดอะซิติก กรดฟอร์มิก กรดมาลิก กรดมาโลนิก กรดโพธิออนิก และกรดซัคซินิกเข้มข้น 5% และสามารถละลายได้ในกรดอื่น ๆ ที่ความเข้มข้นสูงขึ้น เช่น กรดออกซาลิก กรดซิดิก กรดไพรูวิก หรือกรดทาร์ทาริก อย่างไรก็ตามความสามารถในการละลายถึงจุดอิ่มตัวในกรดแต่ละชนิดมีระดับแตกต่างกัน (Ashford *et al.*, 1977)

1.5.2 คุณสมบัติการดูดซับความชื้น

Muzzarelli และ Jeuniaux (1976) กล่าวว่าผิวของโคตินยอมให้น้ำซึมผ่านได้น้อยกว่าเซลลูโลสแต่มีความสามารถในการดูดซับความชื้นได้ดีกว่าเซลลูโลส (Knorr, 1983) ปริมาณการดูดซับมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับคุณสมบัติทางเคมีและกายภาพของโคตินและโคโตซาน เมื่อเปรียบเทียบระหว่างโคตินและโคโตซานพบว่าโคโตซานมีความสามารถในการดูดซับความชื้นได้มากกว่าโคติน (Knorr, 1982) ความสามารถในการดูดซับความชื้นของโคตินและโคโตซานเท่ากับ 230-440 % (น.น.:น.น.)

Filar และ Wirick (1978) รายงานว่าจุดสมมูลย์ในการดูดความชื้นของโคโตซานขึ้นอยู่กับความชื้นสัมพัทธ์แต่ไม่ขึ้นกับน้ำหนักโมเลกุล

Kurita *et al.*, (1993) เปรียบเทียบการดูดซับความชื้นระหว่างโคตินและโคโตซานที่มีโครงสร้างแบบเบต้าจากกระดองปลาหมึก (*Ommastrephes bartrami*) และโครงสร้างแบบแอลฟาจากเปลือกกุ้ง (*P. japonicus*) พบว่าโคตินจากกระดองปลาหมึกมีความสามารถในการดูดซับความชื้นได้มากกว่าโคตินจากเปลือกกุ้งทั้งนี้อาจเนื่องจากผลึกโคตินที่มีโครงสร้างแบบเบต้ามีการเรียงตัวอยู่แบบหลวม ๆ จึงทำให้ดูดซับความชื้นได้มากกว่า

Sornprasit (1997) เปรียบเทียบความสามารถในการดูดความชื้นของกระดองปลาหมึกบดแห้ง, โคติน และโคโตซานจากกระดองปลาหมึกสองสายพันธุ์ (*L. lessoniana* และ *L. formosana*) พบว่าระดับความชื้นที่กระดองปลาหมึกบดแห้งและโคตินสามารถดูดซับได้จนอิ่มตัวเป็น 15 และ 21% ตามลำดับ ในขณะที่โคโตซานสามารถดูดซับได้น้อยกว่าโคตินซึ่งอยู่ในช่วง 17-20% ขึ้นอยู่กับสภาวะของปฏิกิริยาในการเตรียมโคโตซาน โดยเฉพาะอย่างยิ่งถ้าใช้ระยะเวลาในการกำจัดหมู่อะซิเตชันานขึ้นผลิตผลที่ได้จะมีคุณสมบัติในการดูดความชื้นลดลง ทั้งนี้อาจเนื่องจากความแตกต่างของความแน่นของโครงสร้างโคโตซาน

2. ประโยชน์ของโคตินและโคโตซาน

ปัจจุบันมีการนำโคตินและโคโตซานไปประยุกต์ใช้อย่างแพร่หลาย ซึ่งขึ้นอยู่กับคุณสมบัติทางเคมีและกายภาพของโคตินและโคโตซานที่เตรียมได้ เช่น ใช้เป็น stationary phase สำหรับโครมาโตกราฟี ใช้ในกระบวนการบำบัดน้ำเสีย การผลิตกระดาษ ในทางการแพทย์ และชีวเคมี สามารถนำโคตินและโคโตซานใช้เร่งการสमानแพลและการห้ามเลือด เป็นต้น ทั้งนี้ปรากฏในรายงานผลการทดลองดังต่อไปนี้

2.1 การประยุกต์ใช้ทางด้านโครมาโตกราฟี

Muzzarelli (1977) กล่าวว่าโคตินหรือโคโตซานสามารถนำมาใช้เป็น stationary phase ชนิด anion exchanger

Ivata และ Nakabayashi (1974 อ้างโดย Muzzarelli, 1977) ทดลองใช้โคตินเป็น stationary phase สำหรับการแยกสารมีสีออกจากชา กาแฟ น้ำผลไม้ สารสกัดจากเห็ดแห้ง คาราเมล น้ำตาลและอื่น ๆ หรืออาจใช้เป็น stationary phase

สำหรับโครมาโตกราฟีชนิดอื่นเช่น chelation chromatography, ligand-exchanger chromatography และ affinity chromatography

2.2 การประยุกต์ใช้ทางด้านอุตสาหกรรม

2.2.1 ใช้บำบัดน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม

น้ำเสียที่ปล่อยออกมาจากกระบวนการผลิตของโรงงานอุตสาหกรรมต่าง ๆ นับเป็นปัจจัยสำคัญในการสร้างมลพิษให้กับสิ่งแวดล้อม โดยเฉพาะอย่างยิ่งสำหรับโลกในปัจจุบันที่มีการขยายตัวของอุตสาหกรรมต่าง ๆ เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ส่วนประกอบในน้ำเสียที่มีผลกระทบต่อระบบนิเวศน์มีความหลากหลายขึ้นอยู่กับกระบวนการผลิตของอุตสาหกรรมนั้น ๆ อาจเป็นสารอินทรีย์โดยเฉพาะอย่างยิ่งโลหะหนัก เช่น คอปเปอร์ นิกเกิล โครเมียม สังกะสี พรอท และแคดเมียม รวมทั้งโลหะกัมมันตรังสี หรือสารอินทรีย์ เช่น โปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต เป็นต้น ดังนั้นจึงมีการนำโคโตซานมาใช้ด้วยสาเหตุ 3 ประการดังนี้คือ

1. เนื่องจากโคโตซานมีคุณสมบัติสามารถดูดซับโลหะ (chelator) ได้ จึงมีการนำไปใช้ในการกำจัดโลหะหนัก Muzzarelli และ Isolati (1971 อ้างโดย Muzzarelli, 1977) รายงานว่าโคโตซานสามารถกำจัด methyl mercury acetate ออกจากน้ำเสียของโรงงานอุตสาหกรรมที่มีกรดอะซิติกและอะซิโตนอยู่เล็กน้อย Bough (1976) และ Knorr (1984) รายงานประสิทธิภาพของโคโตซานต่อการบำบัดน้ำเสียจากโรงงานผลิตอาหาร รวมถึงประสิทธิภาพในการดึงน้ำออกจากตะกอน ผู้วิจัยแสดงให้เห็นว่าการใช้โคโตซานเข้าไปจับกับโพลีเมอร์ของ cation หรือ multivalent inorganic salts เช่น aluminium sulfate หรือ ferric sulfate มีประสิทธิภาพในการตกตะกอนได้ดีกว่าสารสังเคราะห์ และพบว่าประสิทธิภาพการตกตะกอนขึ้นกับประจุ โครงสร้าง และน้ำหนักโมเลกุล

2. เนื่องจากโคโตซานมีคุณสมบัติเป็น polyelectrolyte เช่นเดียวกับ polyacrylamide โดยกลไกการทำงานเกิดขึ้นระหว่างประจุต่อประจุระหว่างอนุภาคและ polyelectrolyte polymer (Green and Kramer, 1979) จึงมีคุณสมบัติเป็น flocculant สามารถตกตะกอนเซลล์ โปรตีน และโมเลกุลขนาดเล็ก โดยโคโตซานช่วยเพิ่มความหนืดของสารละลายทำให้สามารถแยกสารที่ทำให้เกิดความขุ่นในสารละลายออกได้ง่าย

นอกจากนั้นยังมีการนำอนุพันธ์ของโคโตซานมาใช้ในการตกตะกอนด้วย เช่น โคโตซานอะซิเตตใช้ในการตกตะกอนโปรตีนแขวนลอย พบว่ามีการจับกลุ่มกันอย่าง

รวดเร็วขององค์ประกอบแขวนลอยภายใน และสามารถแยกส่วนที่จับกลุ่มนั้นออกจากของเหลวได้ง่าย และได้สารละลายที่ใสกลับมา ปริมาณของโคโคซานที่ใช้เติมลงในสารแขวนลอยขึ้นกับความมากน้อยของปริมาณสารแขวนลอยในของเหลว นั้น ๆ โดยปกติในการตกตะกอนสารแขวนลอยจะเติมโคโคซานประมาณ 0.2-10% ของน้ำหนักแห้งของตะกอนที่เกิดขึ้น (Muzzarelli, 1977)

3. คุณสมบัติเด่นอีกประการหนึ่งของโคโคซานคือ เป็น natural polymer สามารถย่อยสลายได้ (biodegradable) จึงไม่สะสมในธรรมชาติเหมือนกับโพลีเมอร์สังเคราะห์ชนิดอื่น (Green and Kramer, 1979)

2.2.2 ด้านอุตสาหกรรมการผลิตกระดาษ

Nicol (1991) กล่าวว่า การเติมโคโคตินเพียง 1% โดยน้ำหนักลงในเยื่อกระดาษจะเพิ่มความทนทานของกระดาษ เร่งอัตราเร็วในการแยกน้ำออกจากเยื่อกระดาษ และเพิ่มปริมาณของเส้นใยที่เหลือเมื่อทำแผ่นกระดาษแล้ว ดังนั้นผู้ผลิตสามารถใช้เยื่อที่ราคาถูกลง และลดปริมาณเส้นใยกระดาษโดยไม่ต้องลดคุณภาพได้ พร้อมทั้งประหยัดพลังงานที่ใช้ในการตีเยื่อกระดาษได้มากถึง 90 % นอกจากนี้โคโคตินยังช่วยให้พิมพ์สลายลงบนกระดาษได้ง่ายขึ้นด้วย กระดาษที่ผสมโคโคตินจะมีความแข็งแรงขณะเปียกดีมากขึ้น ซึ่งเป็นข้อดีสำหรับนำมาทำผ้าอ้อมแบบใช้แล้วทิ้ง ถุงช้อปปิ้ง และกระดาษเช็ดมือ

2.2.3 ด้านอุตสาหกรรมเครื่องหนัง

Babu *et al.* (1975 อ้างโดย Muzzarelli, 1977) รายงานว่าเมื่อเติมโคโคซานลงไปเป็นส่วนผสมใน tanning drum ที่มีสารสกัดจากเปลือก wattle ซึ่งเป็นขั้นตอนสำคัญสำหรับกระบวนการฟอกหนัง มีผลทำให้หนังมีคุณภาพดีขึ้นคือ เพิ่มความเรียบสม่ำเสมอของพื้นผิว และเนื้อหนังยึดติดกันแน่นขึ้น

2.2.4 ใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง

Nicol (1991) กล่าวว่ามีการนำโคโคตินไปใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางมาตั้งแต่ ปี 1969 บริษัทผลิตเครื่องสำอางในประเทศเยอรมัน (wella) ทำการวิจัยเกี่ยวกับการนำโคโคซานไปใช้เป็นส่วนผสมของแชมพูสระผมมานานกว่า 10 ปี นอกจากนั้นบริษัทของญี่ปุ่นและเยอรมันทำการพัฒนาโคโคซานให้เป็นอนุพันธ์ที่สามารถละลายน้ำได้เพื่อนำมาใช้เป็นส่วนผสมของเครื่องสำอางสำหรับบำรุงผมและผิวพรรณ อนุพันธ์ของโคโคซานบางชนิดสามารถนำไปใช้แทน hyaluronic acid ในการผลิตครีม โลชั่น และครีมนวดผม จากการที่โคโคซานมีคุณสมบัติที่สามารถยึดเกาะกับสารอื่นได้แน่น จึงสามารถนำมาใช้เป็นส่วนผสมของสเปรย์แต่งผมและน้ำยาเคลือบเล็บ ในประเทศอิตาลีมี

ผู้ผลิตเครื่องสำอางหลายชนิดจากอนุพันธ์ของไคโตซานคือ N-carboxybutyl chitosan (firm-forming) ภายใต้ชื่อทางการค้าว่า Evalsan R โดยนำมาผลิตเป็นแชมพู โฟม อาบน้ำ สบู่เหลว ยาสีฟัน สบู่เหลวสำหรับเฉพาะที่ และครีมแต่งหน้า

2.3 การประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์และชีวเคมี

2.3.1 การลดปริมาณโคเลสเตอรอลและไตรไขมัน

มีการนำไคโตซานไปใช้อย่างแพร่หลายทางด้านโภชนาการและเทคโนโลยีอาหาร Furda (1980) รายงานการใช้ไคโตซานเป็นตัวจับไขมันโดยเติมลงในอาหาร Knorr (1982) ศึกษาประสิทธิภาพในการทำให้เกิดอิมัลชันของไคติน ไคโตซานและผลึกไคตินขนาดเล็ก พบว่าไคตินและไคโตซานไม่ทำให้เกิดอิมัลชัน แต่ผลึกไคตินขนาดเล็กทำให้เกิดอิมัลชันได้ดี Sugano *et al.* (1980) ให้หนูทดลองกินอาหารที่มีโคเลสเตอรอลสูง (0.5%) และมีไคโตซานผสมอยู่ 2-5% เป็นเวลา 20 วัน พบว่าระดับโคเลสเตอรอลในพลาสมาของหนูลดลงลงอย่างมีนัยสำคัญ (25-30%) โดยไม่มีผลกระทบต่ออาการกินอาหาร การเจริญเติบโตและระดับไตรกลีเซอไรด์ในพลาสมา (plasma triglyceride)

Nagyvary *et al.* (1979 อ้างโดย Muzzaletti, 1985) รายงานว่าไคโตซานในรูปที่ละลายน้ำได้ (ไคโตซานอะซิเตต) เป็นสารช่วยลดการดูดซึมไขมันในร่างกายได้ดีกว่าเพคติน

Razdan *et al.* (1997) ทำการทดลองผสมไคโตซาน (89% deacetylated chitin) 3% ลงในอาหารไก่กระหวงเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีเพคติน 3% และอาหารชุดควบคุม เป็นเวลา 5 และ 11 วัน พบว่าไก่ที่ได้รับไคโตซานเข้าป็นน้ำหนักลดลงอย่างมีนัยสำคัญ และหลังการทดลอง 12 วัน พบว่าระดับโคเลสเตอรอลในพลาสมา และความเข้มข้นของ HDL-cholesterol มีค่าลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของเพคตินและชุดควบคุม นอกจากนั้นอัตราส่วนระหว่าง plasma HDL-cholesterol ต่อโคเลสเตอรอลรวมสำหรับไก่ที่ได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของไคโตซานมีค่าเพิ่มขึ้น ในขณะที่ไก่ซึ่งได้รับอาหารที่มีเพคตินเป็นส่วนผสมมีค่าไม่แตกต่างจากชุดควบคุม

Lehoux และ Grandin (1993) เปรียบเทียบประสิทธิภาพของไคโตซานที่มีขนาดต่างกันต่อการลดระดับโคเลสเตอรอลในเลือด พบว่าไคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุล 70 kDa มีประสิทธิภาพสูงกว่าที่น้ำหนักโมเลกุล 750 kDa และเมื่อนำตัวอย่างที่มีน้ำหนักโมเลกุล 70 kDa ผสมลงในอาหารสำหรับเลี้ยงหนูทดลองด้วยปริมาณ 2.5, 5.0 และ 7.5% พบว่าหนูที่ได้รับอาหารซึ่งมีส่วนผสมของไคโตซาน 7.5% เป็นเวลา 3 สัปดาห์ พบว่าไม่มี

ผลกระทบต่อการเปลี่ยนแปลงระดับของ HDL-cholesterol ในเลือด นอกจากนั้นน้ำหนัก
 ตัวของสัตว์ทดลองก็เพิ่มขึ้นตามปกติ

Nauss *et al.* (1983 อ้างโดย Muzzarelli, 1985) กล่าวว่าโคโตซานมี
 คุณสมบัติการเป็นสารช่วยลดระดับโคเลสเตอรอลและลดไขมันได้เนื่องจากสามารถจับกับ
 micelle และ bile salts ได้อย่างมีประสิทธิภาพจึงมีผลต่อกระบวนการย่อยและการ
 ดูดซึมไขมันโดยรวม จากการทดลองพบว่าสามารถจับกับ bile salts ได้ 4-12 เท่าของ
 น้ำหนัก ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับ pH และคุณสมบัติของโคโตซานที่ใช้ แรงยึดเหนี่ยวที่เกิดขึ้นอาจ
 เป็นไปได้ทั้งแรงยึดเหนี่ยวระหว่างประจุ (ionic interactions) และ hydrophobic
 interaction

เป็นที่น่าสังเกตว่าโคโตซานที่กินเข้าไปจะเข้าไปเกาะเกี่ยวกับ micelle และ
 bile salts จึงไม่เพียงแต่ลดปริมาณการดูดซึมโคเลสเตอรอล กลีเซอไรด์และไขมันอื่น ๆ
 จากอาหารเท่านั้น แต่จะมีผลกระทบต่อกรดไขมันอื่นโดยเฉพาะอย่างยิ่งวิตามิน
 ที่ละลายในไขมัน เช่น วิตามิน A, D, E และ K อีกด้วย ดังนั้นการนำโคโตซานมาใช้เป็น
 ยาลดระดับโคเลสเตอรอลในเลือดและยาลดความอ้วนจึงต้องศึกษาผลกระทบที่ไม่พึง
 ประสงค์ดังกล่าวนี้ด้วย

2.3.2 ใช้เร่งการสมานแผล (wound healing)

การเร่งการสมานแผลมีความจำเป็นสำหรับผู้ป่วยที่มีอาการแผลหายช้า
 กว่าปกติเช่นผู้ป่วยโรคเบาหวาน หรือแผลไฟไหม้น้ำร้อนลวก กลุ่มยาที่นำมาใช้บรรเทา
 อาการดังกล่าวนี้ในปัจจุบันคือ cortisone

Muzzarelli (1977) กล่าวว่ากระดูกอ่อน (cartilage) ของสัตว์หลาย
 ชนิดสามารถนำมาใช้ในสมานแผลได้ Prudden *et al.* (1970 อ้างโดย Muzzarelli,
 1977) รายงานว่ากระดูกอ่อนที่ผลิตได้แต่ละครั้งมีประสิทธิภาพแตกต่างกัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับ
 วิธีการผลิต ชนิด และอายุของสัตว์ ทำให้มีปริมาณของ glucosamine ซึ่งเป็นสาร
 ออกฤทธิ์มีปริมาณที่แตกต่างกัน ดังนั้นจึงเปลี่ยนมาใช้ไคตินแทนซึ่งสามารถควบคุมการ
 ผลิตให้ได้ประสิทธิภาพที่มีความสม่ำเสมอและหาวัตถุดิบได้ง่าย

Muzzarelli (1977) กล่าวว่าในเขตร้อนมีการนำไคตินหลายรูปแบบมาใช้
 สมานแผล อาจเป็นผงไคติน colloidal chitin หรืออนุพันธ์ที่ละลายน้ำหรือน้ำเกลือ ไคติน
 ที่มีขนาดประมาณ 50-100 ไมโครเมตรเมื่อเตรียมในรูปสารแขวนลอยในน้ำและผ่านการ
 นึ่งฆ่าเชื้อสามารถฉีดเข้ากล้ามเนื้อหรือเข้าเส้นเลือดได้

Balassa และ Prudden (1978) กล่าวว่าวิธีทดสอบคุณสมบัติการสมานแผลของไคตินและไคโตซานในสัตว์ทดลองสามารถดำเนินการได้โดยการวัดแรงที่ใช้เพื่อดึงเนื้อเยื่อบริเวณแผลที่สร้างใหม่ให้ขาดออกจากกัน เมื่อนำวิธีการดังกล่าวนี้มาทดสอบกับคนพบว่าไคตินและไคโตซานจากเปลือกกุ้งสามารถเร่งการสมานแผลได้ 30% เมื่อเทียบกับชุดควบคุม ในขณะที่ไคตินจากกุ้งมังกรและแมงดาทะเลเร่งการสมานแผลได้ 75%

Brandenberg *et al.* (1984) นำไคโตซานไปใช้ห้ามเลือดบริเวณแผลผ่าตัดระบบประสาทส่วนกลางของแมว นอกจากนั้นการสมานแผลยังเกิดขึ้นได้เร็วขึ้นอีกด้วย

Hamlyn และ Schmidt (1994) ศึกษาศักยภาพการนำไคตินไปใช้ในการสมานแผลในระดับหลอดทดลอง (*in vitro*) โดยเติม fungal filaments ที่กำจัดโปรตีนและแร่ธาตุออกแล้วลงใน medium สำหรับเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (fibroblastes) ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ได้แก่ หนู และมนุษย์ พบว่าสามารถส่งเสริมการรวมกลุ่มและการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ได้ จากผลดังกล่าวถ้ามีการนำไปใช้ในการรักษาแผลได้จริงก็จะสามารถส่งเสริมการสร้างไฟโบรบลาสต์แล้วอาจทำให้มีการเข้ามาของคอลลาเจนและเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการสมานแผลต่าง ๆ ได้ด้วย

Kratz *et al.* (1997) รายงานว่าสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างไคโตซานและ heparin สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการเร่งการสมานแผลได้ เมื่อนำชิ้นผิวหนังของคนมาทำให้เกิดแผลตรงกลางโดยแช่ใน medium ที่มีส่วนประกอบของไคโตซานและ heparin พบว่าหลังการทดลอง 7 วัน medium ดังกล่าวจะช่วยกระตุ้นให้เซลล์ผิวหนัง (epithelial cell) เจริญเติบโตออกมาเต็ม 9/10 ส่วนของช่องแผล เมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่ medium มีส่วนผสมของไคโตซานในรูปเจลหรือใช้ไคโตซานในรูปแมมเบรนปิดแผลจะมีการเจริญเติบโตเพียง 3/10 ของช่องแผล ในขณะที่จะไม่มีการสร้างเซลล์ใหม่ในชุดที่ไม่มีส่วนผสมของไคโตซานในรูปเจล การใช้แมมเบรนหรือผสม heparin เพียงอย่างเดียว

2.3.3 การห้ามเลือด (hemostasis) และป้องกันการแข็งตัวของเลือด (blood anticoagulation)

การใช้ไคโตซานในการห้ามเลือด

Malette *et al.* (1983) รายงานว่าไคโตซานเป็นสารที่มีคุณสมบัติช่วยในการห้ามเลือดซึ่งสามารถนำไปใช้กับแผลผ่าตัด และในทางกลับกันอนุพันธ์ของไคโตซานบางชนิดมีคุณสมบัติเป็นสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด

Hirano และ Noishiki (1985) ศึกษาการแข็งตัวของเลือดโดยสอดไหมเย็บแผลที่เคลือบด้วยไคโตซาน, N-acetylchitosan หรือ N-hexanoylchitosan เข้าไปในเส้นเลือดดำของสุนัข เป็นเวลา 2 ชั่วโมง สังเกตการแข็งตัวของเลือดที่เกิดบนไหมเย็บแผล พบว่าบนไหมที่เคลือบด้วยไคโตซานมีเลือดแข็งตัวอยู่หนาประมาณ 1.7 เท่าของเส้นผ่าศูนย์กลางเดิม สำหรับไหมที่เคลือบด้วย N-acetylchitosan จะมีเลือดแข็งตัวอยู่บาง ๆ แต่ไม่พบการแข็งตัวของเลือดบนผิวของไหมที่เคลือบด้วย N-hexanoylchitosan ซึ่งลักษณะคล้ายกับการใช้ S-aminoethylkeratin-heparin ที่ทำให้เกิด crosslink โดย glutaraldehyde

การใช้ไคโตซานเป็นสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด

Muzzarelli (1977) กล่าวว่า heparin เป็นสารชนิดหนึ่งที่มีคุณสมบัติในการป้องกันการแข็งตัวของเลือด ซึ่งผลิตมาจากตับ และไม่พบอาการเป็นพิษเมื่อนำมาใช้กับสัตว์และมนุษย์ในระดับที่เหมาะสม อย่างไรก็ตามเนื่องจาก heparin มีราคาแพง จึงมีความพยายามศึกษาหาสารชนิดอื่นมาทดแทน แต่พบว่าส่วนใหญ่มีระดับความเป็นพิษสูงกว่า heparin

Piper (1945 อ้างโดย Muzzarelli, 1977) พบว่าเมื่อนำ cellulose, แป้ง หรือไคติน มาเปลี่ยนให้อยู่ในรูป sulfate ester อนุพันธ์ที่ได้เหล่านี้มีคุณสมบัติเป็นสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด โดยการเข้าไปจับกับ thrombocyte แต่ทำให้เกิดหลอดเลือดตีบตัน (infraction) เนื่องจากการจับกลุ่มของเกล็ดเลือด และ thrombocyte และทำให้เกิดเนื้อตายในที่สุด

อนุพันธ์ของไคโตซานที่มีทั้ง N- และ O-sulfates มีคุณสมบัติป้องกันการแข็งตัวของเลือดได้ 15-45% ของ heparin (Doczi *at al.*, 1953; Ricketts, 1953; Wolfrom, Shen-Han and Summers, 1953 and Warner and Coleman, 1959 อ้างโดย Muzzarelli, 1977) Warner และ Coleman (1959 อ้างโดย Muzzarelli 1977) กล่าวว่าจากการศึกษาในรายละเอียดพบว่าอนุพันธ์ไคโตซานที่มีเฉพาะ N-sulfate จะไม่แสดงคุณสมบัติป้องกันการแข็งตัวของเลือด แต่ถ้าอยู่ในรูป O-sulfate คุณสมบัติดังกล่าวจะปรากฏขึ้น ผลจากการทดลองแสดงให้เห็นว่าไคโตซานที่มีองค์ประกอบของ O-sulfate 18.3% สามารถป้องกันการแข็งตัวของเลือดได้ 60 IU/mg ซึ่งนับว่ายังต่ำเมื่อเทียบกับ heparin ที่มีความสามารถสูงถึง 110-150 IU/mg นอกจากนั้น Stivala และ Liberti (1967 อ้างโดย Muzzarelli, 1977) พิสูจน์ให้เห็นว่า Uronic carboxy group ก็เป็นส่วนประกอบสำคัญที่ทำให้ heparin มีคุณสมบัติป้องกันการแข็งตัวของเลือด ต่อมา

Whistler และ Kosik (1971 อ้างโดย Muzzarelli, 1977) รายงานว่าเมื่อเพิ่มหมู่ uronic carboxyl เข้าไปในโครงสร้างของโคโตซานซัลเฟตทำให้อนุพันธ์ที่เกิดขึ้นมีคุณสมบัติเป็นสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดได้ โดยประสิทธิภาพจะเพิ่มขึ้นตามระดับของหมู่ uronic carboxyl ที่เพิ่มเข้าไป นอกจากนี้ยังพบว่าเติมหมู่ uronic carboxyl เข้าไปในอนุพันธ์ N-sulfated chitosan อนุพันธ์ใหม่ที่ได้ก็จะมีประสิทธิภาพในการป้องกันการแข็งตัวของเลือดมากขึ้น

Muzzarelli (1985) กล่าวว่าเมื่อนำ N-carboxymethylchitosan จาก *Euphausia ruperba* มาเปลี่ยนให้เป็นอนุพันธ์ sulfate ซึ่งมีโครงสร้างคล้าย heparin พบว่าอนุพันธ์ใหม่ที่ได้มีคุณสมบัติเป็นสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดได้เช่นกัน ทั้งนี้ขนาดของโมเลกุลเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลกระทบต่อประสิทธิภาพการป้องกันการแข็งตัวของเลือด

Muzzarelli *et al.* (1983) รายงานว่าจากการศึกษากลไกการทำงานพบว่าคุณสมบัติการป้องกันการแข็งตัวของเลือดโดยอนุพันธ์โคโตซานเหล่านี้เกิดขึ้นเนื่องจากสามารถยับยั้งการเกิด thrombin โดยเข้าไปจับกับ antithrombin รวมทั้งยับยั้ง stuart factor (F. Xa) ซึ่งมีส่วนสำคัญในการเปลี่ยน prothrombin ไปเป็น thrombin นอกจากนี้ผลการทดลองยังแสดงให้เห็นว่าไม่ทำให้เม็ดเลือดแตกหรือเกิดการเปลี่ยนแปลงของ lymphocytes และ erythrocyte

2.3.4 การจับกลุ่มของเซลล์ Leukemia

เยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์มะเร็งมีประจุลบมากกว่าเซลล์ปกติ จึงทำให้สูญเสียคุณสมบัติในการจดจำและการยึดเหนี่ยวระหว่างเซลล์พวกเดียวกัน (loss of contact of inhibition) จึงแบ่งตัวแพร่กระจายออกได้ทุกทิศทางพร้อมทั้งสามารถเข้าไปทำลายการทำงานของอวัยวะปกติได้ ด้วยเหตุนี้การเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งจึงถูกยับยั้งได้ด้วย polysaccharide ที่มีประจุบวก การใช้ polysaccharide ที่มีประจุบวก การเกาะเกี่ยวดังกล่าวยังทำให้เซลล์เกิดการพองตัวเนื่องจากการเคลื่อนที่ผ่านเข้าออกของสารผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เปลี่ยนแปลงไป และมีผลไปลดการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งไม่ให้ไปบุกรุกอวัยวะอื่นในที่สุด

อย่างไรก็ตามเนื่องจากเซลล์เม็ดเลือด โดยเฉพาะอย่างยิ่งเม็ดเลือดแดงมีประจุลบอยู่มากบนเยื่อหุ้มเซลล์ จึงสามารถจับได้กับประจุบวกสารประกอบในกลุ่ม polycation ได้เช่นกัน ดังนั้นการใช้สารประกอบเหล่านี้เพื่อเข้าไปจับกับเซลล์มะเร็งจึงต้องศึกษาหาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมจำเพาะกับเซลล์มะเร็งเท่านั้น

Abbott *et al.* (1966 อ้างโดย Muzzarelli, 1977) กล่าวว่าการใช้ N-formylchitosan polysulfonic acid ในระดับ 80 มก./กก. ในหนูทดลองซึ่งทำให้เกิดเซลล์มะเร็งที่ต่อมหมวกไต มีผลในการลดการขยายตัวของกลุ่มเซลล์ชั้นนอกสุดของ adrenal cortex (zona glomerulosa) โดยไม่กระทบกับเซลล์กลุ่มอื่น

Sirica และ Woodman (1971 อ้างโดย Muzzarelli, 1977) กล่าวว่าโคโคซานในระดับความเข้มข้น 6-50 นาโนอิกควาเลน/มล. จะไปจับอย่างมีความจำเพาะกับเซลล์ leukemia L-1210 ได้ดีกว่าเซลล์เม็ดเลือดแดงและเซลล์ในไขกระดูกของหนู ผลการทดลอง incubate โคโคซานกับเซลล์ leukemia พบว่าทำให้เซลล์พองตัวและแตกในที่สุด นอกจากนี้เมื่อฉีดสารละลายโคโคซานเข้าไปในหนูทดลองที่ได้รับการผ่าตัดเพื่อใส่เซลล์มะเร็งชนิด ascite tumor เข้าในช่องท้องพบว่าการแพร่กระจายของ leukemic cell สู่กระแสเลือดลดลง

3. กระบวนการสมานแผล (wound healing processes)

3.1 การอักเสบ (Inflammation)

การอักเสบเป็นการตอบสนองของเนื้อเยื่อสัตว์มีกระดูกสันหลังต่อการบาดเจ็บ (injury) ซึ่งมีผลตอบสนองในระดับเซลล์ถึงระดับอวัยวะโดยผ่านการเปลี่ยนแปลงทางระบบไหลเวียนโลหิตเป็นสำคัญ การอักเสบอาจเกิดขึ้นได้จากสาเหตุหลายประการเช่น เชื้อโรค สารเคมี กรด-ด่าง ความร้อน-เย็น อุบัติเหตุ รังสี ไฟไหม้ น้ำร้อนลวก หรือแม้แต่ปฏิกิริยาของระบบภูมิคุ้มกัน เป็นต้น

กอบกุล ตั้งสินมันคง (2540) สรุปไว้ว่าโดยทั่วไปการอักเสบแบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ การอักเสบเฉียบพลัน (acute inflammation) และการอักเสบเรื้อรัง (chronic inflammation)

ก. การอักเสบเฉียบพลัน (acute inflammation)

การอักเสบเฉียบพลัน เกิดในเวลาสั้น ๆ เพียงไม่กี่นาที ไปจนกระทั่งหนึ่งถึงสองวัน ลักษณะสำคัญคือมีของเหลวประกอบด้วยโปรตีนจากพลาสมาและเม็ดเลือดขาวซึ่งส่วนใหญ่เป็น neutrophil เข้ามายังบริเวณที่อักเสบ เรียกว่า exudation บริเวณที่เกิดการอักเสบจะมีอาการปวด บวม แดง ร้อน การทำงานของเนื้อเยื่อหรืออวัยวะนั้นจะเสียหายที่การทำงานไป ทั้งนี้เกิดจาก 1) การเปลี่ยนแปลงการไหลเวียนเลือดและขนาดของหลอดเลือด 2) การเพิ่ม permeability ของหลอดเลือด และ 3) มีเม็ดเลือดขาวเข้ามา

บริเวณอักเสบ ปฏิกริยาทั้งสามนี้อาจมีบางส่วนเกิดขึ้นพร้อมกัน หรือมีการใช้สารตัวกลางร่วมกันก็ได้

ข. การอักเสบแบบเรื้อรัง (chronic inflammation)

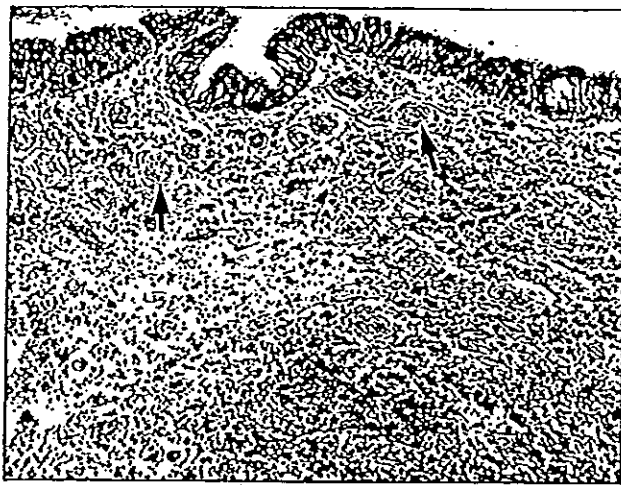
การอักเสบแบบเรื้อรังเกิดขึ้นเป็นระยะเวลาานาน อาจเป็นสัปดาห์หรือเป็นเดือน อาจเกิดตามมาจากการอักเสบแบบเฉียบพลัน จากโรคเรื้อรัง การระคายเคืองที่เกิดขึ้นบ่อย หรือเป็นการตอบสนองของร่างกายต่อจุลชีพหรือสิ่งแปลกปลอมอย่างค่อยเป็นค่อยไปไม่รุนแรง ดังนั้นการอักเสบเรื้อรังจึงไม่จำเป็นต้องมีการอักเสบเฉียบพลันนำมาก่อนก็ได้ ทางด้านเนื้อเยื่อวิทยาที่มีลักษณะสำคัญของการอักเสบเรื้อรังเมื่อดูจากกล้องจุลทรรศน์ ได้แก่

- 1) มี macrophage, lymphocyte และ plasma cell มาอยู่ร่วมกัน
- 2) มีการทำลายเนื้อเยื่อบริเวณนั้น
- 3) มีการซ่อมแซมบริเวณอักเสบ โดยมีการสร้างเนื้อเยื่อเกี่ยวพันเข้ามาแทนที่

มีหลอดเลือดขนาดเล็กเพิ่มขึ้น (angiogenesis) และมี fibrosis เกิดขึ้น (รูปที่ 3)

เซลล์เม็ดเลือดขาวที่พบจากการอักเสบแบบเฉียบพลันส่วนใหญ่คือ neutrophil ในขณะที่การอักเสบแบบเรื้อรังส่วนใหญ่คือ lymphocyte และ macrophage นอกจากนี้กรณีของการอักเสบเรื้อรังมักพบเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับปฏิกริยาการแพ้ได้แก่ basophil และ eosinophil หรือปฏิกริยาที่ตอบสนองต่อการได้รับสิ่งแปลกปลอมได้แก่ epithelioid cell และ multinucleated giant cells

Neutrophil: เป็นเซลล์สำคัญที่สุดในการอักเสบเฉียบพลันเกือบทุกชนิด มีการเคลื่อนที่และเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ตลอดเวลา ขอบเซลล์หยักหรือเป็น pseudopod ยื่นไปรอบ ๆ มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 10-15 ไมโครเมตร ชื่อ neutrophil มาจากคำว่า neutral ซึ่งแกรนูลในไซโตพลาสซึมเป็นทั้ง acidophilic และ basophilic ภายในไซโตพลาสซึมแกรนูลขนาดต่างกันอยู่ประมาณ 50-200 เม็ด นิวเคลียสของ neutrophil เป็น lobe ประมาณ 3-5 lobe สร้างในไขกระดูกและถูกปล่อยเข้ากระแสเลือดเมื่อโตเต็มที่ มีระยะครึ่งชีวิต (half -life) ประมาณ 6-7 วันจากนั้นจะเข้าไปอยู่ในเนื้อเยื่อประมาณ 1-2 วันก็ตาย หน้าที่หลักของ neutrophil คือเก็บกิน จุลินทรีย์ หรือสิ่งแปลกปลอมที่เข้ามาในร่างกาย



รูปที่ 3 แสดงลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาของ chronic inflammation ของเยื่อบุโพรง
 จมูก ; รูปบน (กำลังขยายต่ำ) แสดงการ infiltrate ด้วยกลุ่ม chronic
 inflammatory cell เข้าไปในบริเวณ submucosa พบการคั่งของเลือดและ
 เพิ่มขึ้นของหลอดเลือด (ลูกศรชี้) ; รูปล่าง (กำลังขยายสูง) แสดงกลุ่มเซลล์ที่
 infiltrate ที่ประกอบด้วย plasma cell (p), lymphocyte (l),
 macrophage (h) และ neutrophil (n) บริเวณ submucosa บวม และมี
 การเพิ่มขึ้นของสารน้ำ (ดอกจัน)
 ที่มา : กอบกุล ตั้งสินมั่นคง (2540)

Basophil : พบในกระแสเลือดประมาณ 1% ของเม็ดเลือดขาว ขนาดเซลล์ใกล้เคียงกับ neutrophil ในไซโตพลาสซึมมีแกรนูลขนาดใหญ่ บรรจุ histamine และ heparin จะมองเห็นเมื่อย้อมด้วยสีพิเศษเท่านั้น นิวเคลียสเป็นรูปถั่ว (bean-shape) basophil ที่พบในเนื้อเยื่อเรียกว่า mast cell เซลล์ชนิดนี้มีความสำคัญในปฏิกิริยา hypersensitivity เมื่อแอนติบอดีชนิด IgE จับกับ basophil จะกระตุ้นให้ปล่อยสาร histamine ออกมาทำให้หลอดเลือดขยายตัวจึงทำให้เกิดการอักเสบขึ้น

Macrophage : นิวเคลียสเป็นรูปถั่ว ในไซโตพลาสซึมจะพบ lysosome และ secretory granules หลายชนิดกระจายอยู่จำนวนมากทำหน้าที่เก็บกินจุลินทรีย์หรือสิ่งแปลกปลอมโดย phagocytosis เช่นเดียวกับ neutrophil และสังเคราะห์สารบางชนิดที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบเช่น prostaglandin และ leucotriene โดย macrophage จัดอยู่ในกลุ่ม mononuclear phagocyte system (MPS) ซึ่งสร้างจากไขกระดูกและพัฒนาต่อไปเป็น monocyte ในเนื้อเยื่อซึ่งมีชื่อเรียกต่างกันตามอวัยวะที่พบ เช่น ถ้าพบในปอดเรียกว่า alveolar macrophage ในตับเรียกว่า Kupffer' s cell ในม้ามและต่อมน้ำเหลืองเรียก sinus histiocyte เป็นต้น monocyte มีระยะครึ่งชีวิตประมาณ 1 วันเท่านั้น แต่เมื่อเปลี่ยนไปเป็น macrophage ทำให้มีชีวิตอยู่ในเนื้อเยื่อได้นานหลายเดือน macrophage จะเข้าไปในบริเวณอักเสบตั้งแต่วินาทีแรกของการอักเสบและเพิ่มจำนวนมากขึ้นหลัง 48 ชั่วโมงไปแล้ว macrophage จะเป็นเซลล์ที่พบมากที่สุดในบริเวณอักเสบ ถ้าสาเหตุของการอักเสบถูกกำจัดได้หมด macrophage จะถูกเคลื่อนย้ายไปบริเวณอื่น หรือถูกกำจัดโดยผ่านทางระบบน้ำเหลือง แต่ถ้าสาเหตุนั้นยังอยู่ก็จะยังคงเห็นการรวมกลุ่มกันของ macrophage ในบริเวณนั้นได้นาน

Giant cell (multinucleated giant cell) : เกิดจากการรวมกันของ macrophage เป็นเซลล์ขนาดใหญ่ที่มีหลายนิวเคลียส พบในการอักเสบแบบ granuloma โดยเฉพาะที่เกิดจากการติดเชื้อบางชนิดเช่น วัณโรค ซิฟิลิส และเชื้อรา หรือเกิดจากการได้รับสารจากในหรือนอกร่างกาย ที่ไม่สามารถย่อยสลาย เช่น ผงแป้งไหมที่ใช้ผูกในการผ่าตัด keratin ไขมัน และผลึกโซเดียมไบยูเรต เป็นต้น

Lymphocyte, Plasma cell : Lymphocyte พบในกระแสเลือดประมาณ 20-30% ของเม็ดเลือดขาว เป็นเซลล์ขนาดเล็กมีนิวเคลียสกลมใหญ่ มีไซโตพลาสซึมและ organell เล็กน้อย อาจพบได้ 2 แบบคือ T และ B-cell plasma cell พบเฉพาะที่เนื้อเยื่อพัฒนามาจาก B-lymphocyte ทำหน้าที่ผลิตแอนติบอดีออกมาต่อต้านแอนติเจน ส่วน lymphocyte มีความสำคัญในระบบภูมิคุ้มกันทั้งแบบ humoral และ

cell-mediated โดยทำงานสัมพันธ์และความคมซึ่งกันและกันกับ macrophage กล่าวคือ เมื่อร่างกายได้รับแอนติเจนจะกระตุ้นให้ lymphocyte สร้างสารที่เรียกว่า lymphokine หลายชนิด ที่สำคัญคือ IFN- γ ซึ่งเป็นตัวเหนี่ยวนำให้ monocyte เคลื่อนเข้ามาในบริเวณอักเสบและกระตุ้นให้ macrophage หลังเอ็นไซม์และสารตัวกลางในกระบวนการอักเสบ รวมทั้งจับกินสิ่งแปลกปลอมได้ดีขึ้น ในขณะที่เดียวกัน macrophage ที่ถูกกระตุ้นจะหลั่งสาร monokine ย้อนมาควบคุมการทำงานของทั้ง T-cell และ B-cell

Eosinophil : พบในกระแสเลือดปริมาณ 2-3% ของเม็ดเลือดขาว พบบ่อยในการอักเสบเรื้อรัง โดยเฉพาะถ้าเกิดจากการติดเชื้อหนอนพยาธิ หรือจาก hypersensitivity เซลล์นี้เกี่ยวข้องกับ IgE และสาร chemotactic ที่หลั่งมาจาก mast cell, lymphocyte หรือ macrophage ภายในแกรนูลของ eosinophil มี major basic protein (MBP) ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีประจุลบน้ำหนักโมเลกุล 14,000 ดาลตัน บรรจุอยู่ สารนี้มีพิษต่อหนอนพยาธิ และสามารถสลายเยื่อบุผิวของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ดังนั้นจึงมีประโยชน์ในการกำจัดหนอนพยาธิ แต่มีผลทำลายเนื้อเยื่อของร่างกายได้ในภาวะ hypersensitivity

Fibroblast : ทำหน้าที่สร้างคอลลาเจน พบในบริเวณที่มีการอักเสบเรื้อรัง ที่เริ่มมีการซ่อมแซมเนื้อเยื่อ ภายในแกรนูลย้อมติดสีแดงเมื่อย้อมด้วยสี hematoxylin และ eosin (H&E)

3.2 การซ่อมแซมและการสมานแผล (repair and healing)

การสมานแผล (healing) เป็นกระบวนการซ่อมแซม (repair) เนื้อเยื่อซึ่งได้รับภัยอันตรายกลับสู่สภาพเดิม โดยทั่วไปเมื่อเกิดการอักเสบขึ้นร่างกายจะกำจัดเศษเซลล์หรือเนื้อเยื่อที่ตายด้วยกระบวนการ phagocytosis และบางส่วนจะถูกกำจัดผ่านระบบน้ำเหลือง ในขณะที่เดียวกันก็จะสร้างเซลล์และเนื้อเยื่อมาทดแทนเซลล์ที่ตาย การซ่อมแซมนั้นถ้าเกิดจากการสร้าง granulation tissue ซึ่งประกอบด้วย ไฟโบรบลาส เนื้อเยื่อเกี่ยวพันและหลอดเลือด รวมเรียกว่า repair และต่อไปจะกลายเป็นแผลเป็น (scar) ทำให้อวัยวะนั้นคงรูปได้ แต่ไม่สามารถทำหน้าที่ได้เหมือนเดิม ถ้าเนื้อเยื่อรอบบริเวณที่ได้รับภัยอันตรายสามารถแบ่งตัวเข้ามาแทนเซลล์ที่ตายได้ เรียกว่ามี regeneration ในการ regeneration ถ้าโครงสร้างของอวัยวะยังไม่ถูกทำลาย เซลล์ที่ออกมาใหม่จะมีการจัดเรียงตัวที่ถูกต้องได้เป็นเนื้อเยื่อหรืออวัยวะที่มีลักษณะ และการทำงานเหมือนเดิม แต่ถ้าโครงสร้างถูกทำลาย การจัดเรียงตัวของเซลล์ที่เข้ามาจะผิดรูปร่าง และอาจมีผลต่อการทำหน้าที่ของอวัยวะนั้นได้

ลักษณะสำคัญประการหนึ่งในการอักเสบเรื้อรัง คือมีการทำลายเนื้อเยื่อบริเวณนั้นทั้งโครงสร้างและ parenchymal cell ร่างกายจะพยายามซ่อมแซม โดยการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของ parenchymal cell (เรียกว่า regeneration) และสร้างเนื้อเยื่อเกี่ยวพันขึ้นมาแทนบริเวณที่ไม่สามารถแบ่งตัวทดแทนได้ทัน ซึ่งต่อมาในบริเวณที่ซ่อมด้วยเนื้อเยื่อเกี่ยวพันจะเกิดเป็น fibrosis และแผลเป็น (scar)

การซ่อมแซมเนื้อเยื่อที่ได้รับภยันตรายเกิดตั้งแต่ระยะแรกของการอักเสบ เมื่อ macrophage เข้ามาเก็บกินเชื้อโรคหรือเม็ดเลือดขาวที่ตาย ก็จะมีไฟโบรบลาสต์ และเซลล์บุผนังหลอดเลือดเข้าไปในบริเวณนั้น (ประมาณวันที่ 3-5) ลักษณะที่พบในเนื้อเยื่อเช่นนี้เรียกว่า granulation tissue ซึ่งเป็นลักษณะ สำคัญของการอักเสบที่กำลังมีการซ่อมแซม และเมื่อดูด้วยตาเปล่าจะเห็นเป็นตุ่มขนาดเล็ก สีชมพูแดง โดยทั่วไปกระบวนการซ่อมแซมแบบนี้ประกอบด้วย 4 ส่วนที่สำคัญคือ 1) มีการสร้างหลอดเลือดขึ้นมาใหม่ (angiogenesis) 2) ไฟโบรบลาสต์เข้ามาในบริเวณที่จะซ่อมแซมและมีการแบ่งตัว 3) มีการสร้างและสะสม extracellular matrix และ 4) เนื้อเยื่อที่เกิดขึ้นจัดการเรียงตัวใหม่และมีความแข็งแรงมากขึ้นด้วย (เรียกว่า remodeling) (กอบกุล ตั้งสินมั่นคง, 2540)

3.3 การศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา (histology evaluation) ของการสมานแผล

ในการศึกษาทางจุลทรรศน์วิทยาของเนื้อเยื่อที่เกิดการสมานแผลต้องอาศัยเทคนิคการเตรียมตัวอย่างหลายขั้นตอนดังต่อไปนี้ ขั้นแรกคือการเตรียมชิ้นเนื้อหรือเซลล์ เพื่อการศึกษาทางจุลทรรศน์วิทยา คือการทำให้ชิ้นเนื้อหรือเซลล์อยู่ในสภาพคงที่ถาวร ขั้นตอนนี้เรียกว่า Fixation ถ้าเป็นการตรึงโดยใช้สารเคมีมักเรียกว่า fixative จากนั้นล้าง fixative ออกแล้วทำการดึ่งน้ำออกจากเซลล์ด้วยแอลกอฮอล์ความเข้มข้นต่าง ๆ แล้วจึงค่อนำสารเคมีตัวใหม่เข้าแทนที่แอลกอฮอล์ ต่อจากนั้นนำซีฟิ่งพาราฟินเหลวเข้าสู่เซลล์หรือเนื้อเยื่อ แล้วนำชิ้นเนื้อไปฝังในบล็อกบรรจุซีฟิ่งพาราฟินเหลวเมื่อซีฟิ่งเย็นลงนำบล็อกของชิ้นเนื้อไปตัดเป็นชิ้นบาง ๆ เพื่อนำไปย้อมสี ทำให้สะดวกในการแยกแยะส่วนต่าง ๆ ภายในตัวอย่าง (เวคิน นพินิตย์, 2523)

ในการศึกษาเกี่ยวกับการสมานแผลโดยอาศัยเทคนิคทางเนื้อเยื่อวิทยาทำให้สามารถติดตามการสมานแผลที่เวลาต่าง ๆ ได้โดยสังเกตจากเซลล์ต่าง ๆ ที่เปลี่ยนแปลงไปบริเวณเนื้อเยื่อที่สังเกตได้ชัดเจนคือ granulation tissue เซลล์ที่พบได้คือ ไฟโบรบลาสต์, macrophage, neutrophil, eosinophil, lymphocyte และ mast cell นอกจากนี้ยังพบคอลลาเจนและหลอดเลือดฝอย เมื่อ granulation tissue มีอายุมากขึ้นจะมียาคอลลาเจนมากขึ้น ในขณะที่ไฟโบรบลาสต์และหลอดเลือดฝอยมีจำนวนลดลง เนื่องจากเกิด

thrombosis เสื่อมสลายและถูกเก็บกินโดย macrophage ในที่สุด granulation tissue จะกลายเป็นแผลเป็น (scar) ซึ่งประกอบด้วยคอลลาเจนจำนวนมาก สีของ scar ชดกว่า granulation tissue และมีความแข็งแรงขึ้น (กอบกุล ตั้งสินมั่นคง, 2540)

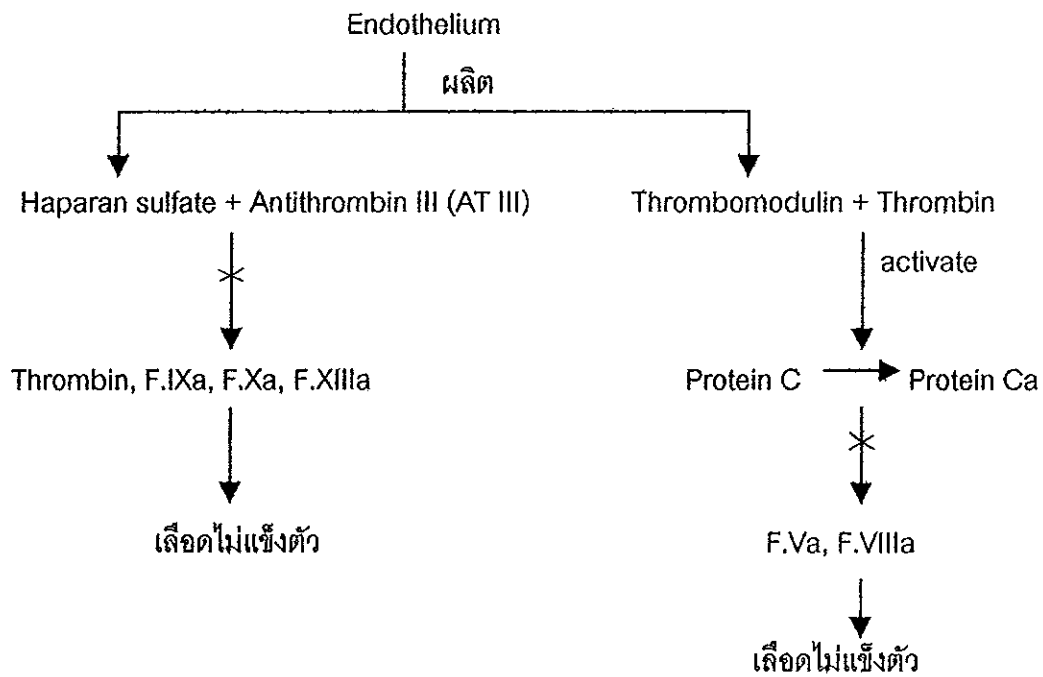
4. กลไกการห้ามเลือด

การห้ามเลือด (hemostasis) เป็นกลไกที่มีความสำคัญต่อร่างกาย เพราะช่วยรักษาเลือดให้อยู่ในภาวะที่เป็นของเหลวไหลเวียนในหลอดเลือดและป้องกันการเสียเลือดเมื่อหลอดเลือดฉีกขาด โดยการเกิด hemostatic plug และรวมถึงการละลาย hemostatic plug หลังจากการซ่อมแซมหลอดเลือด ในภาวะปกติการห้ามเลือดจะเป็นสมดุลระหว่างการห้ามเลือดและการป้องกันไม่ให้เกิดการแข็งตัวของเลือดมากเกินไป (hyper coagulation) จนเกิดภาวะลิ่มเลือดอุดตันในหลอดเลือดหรือ thrombosis ขบวนการที่เกี่ยวข้องได้แก่หลอดเลือด เกล็ดเลือด (platelet) การแข็งตัวของเลือด (coagulation) การละลายลิ่มเลือด (fibrinolysis) และสารยับยั้ง (inhibitors) รวมถึงการไหลเวียนของเลือด ถ้าสมดุลนี้เสียไป เช่น ถ้าขาดปัจจัยการแข็งตัวของเลือดตัวใดตัวหนึ่งหรือหลายตัวร่วมกัน ทำให้เกิดการแข็งตัวของเลือดน้อยเกินไป หรือมีสารละลายลิ่มเลือดมากเกินไปจะทำให้เกิดภาวะเลือดออกผิดปกติ ดังนั้นความเข้าใจถึงกลไกการห้ามเลือดจึงมีความสำคัญมาก เพราะทำให้เข้าใจในการแปลผลการทดสอบทางห้องปฏิบัติการ ซึ่งใช้ตรวจเพื่อประกอบการวินิจฉัยความผิดปกติของผู้ป่วยและทำการรักษาต่อไป

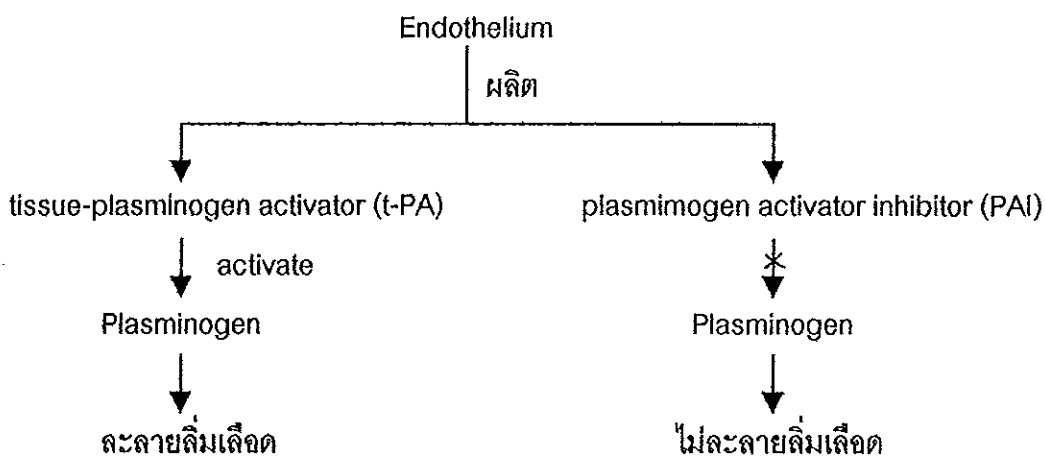
4.1 บทบาทของหลอดเลือดในการห้ามเลือด

ในภาวะปกติหลอดเลือดและเกล็ดเลือดจะทำหน้าที่ป้องกันให้เลือดอยู่ภายในหลอดเลือด แม้ว่าหลอดเลือดมีขนาดแตกต่างกัน แต่โครงสร้างของผนังของหลอดเลือด (vessel wall) ประกอบด้วย 3 ชั้น เหมือนกันคือ intima, media และ adventitia ทั้งนี้ความหนาของแต่ละชั้นอาจแตกต่างกันตามชนิดและขนาดของหลอดเลือด

หลอดเลือดมีบทบาทสำคัญในการห้ามเลือดขั้นปฐมภูมิ (primary hemostasis) โดยการหดตัวซึ่งจะเกิดขึ้นเกือบทันทีภายหลังการฉีกขาดของหลอดเลือด (vasoconstriction) กลไกของปรากฏการณ์นี้เชื่อว่าเกิดจากการถูกกระตุ้นโดยสาร vasoactive เช่น serotonin, thromboxane A₂ ซึ่งปล่อยออกมาจากเกล็ดเลือดที่ถูกกระตุ้น นอกจากนั้นเซลล์บุผนังหลอดเลือดชั้นใน (endothelium) ยังทำหน้าที่สำคัญอีกประการหนึ่ง คือป้องกันการเกิดลิ่มเลือดอุดตันในหลอดเลือด (antithrombotic หรือ anticoagulation properties) ซึ่งมีกลไกการทำงานดังรูปที่ 4.1



ก. กลไกการลดการเกิดปฏิกิริยาการแข็งตัวของเลือด



ข. กลไกการควบคุมการละลายลิ่มเลือด

รูปที่ 4.1 แสดงกลไกการป้องกันการเกิดลิ่มเลือดของเซลล์บุผนังหลอดเลือดชั้นใน ประกอบด้วยกลไกการลดการเกิดปฏิกิริยาการแข็งตัวของเลือด และกลไกการควบคุมการละลายลิ่มเลือด (-X-> แสดงการยับยั้ง)

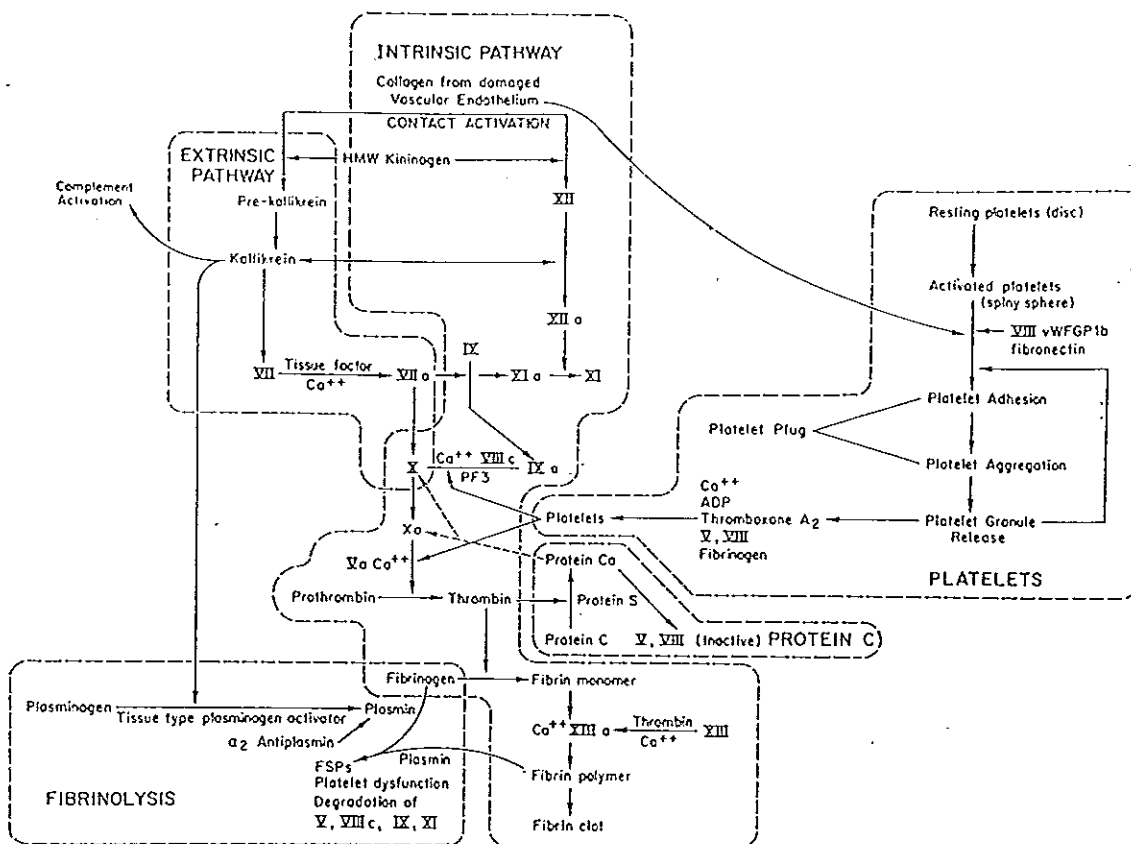
ในส่วนที่เกี่ยวข้องกับการแข็งตัวของเลือด เซลล์บุผนังหลอดเลือดชั้นในที่ถูกระตุ้นจะแสดงคุณสมบัติของ tissue factor เพิ่มขึ้น 10-40 เท่า และช่วยในการทำปฏิกิริยาระหว่าง antihemophilic factor (F.VIIIa) และ Ca^{++} ในการกระตุ้น F. Xa และยังเป็นพื้นผิวในการเกิดปฏิกิริยาการแข็งตัวของเลือด

4.2 บทบาทของเกล็ดเลือดในการห้ามเลือด

เกล็ดเลือดเป็นเซลล์ที่ไม่มีนิวเคลียสเกิดจากส่วนของไซโตพลาสซึมของเซลล์ megakaryocyte อายุเฉลี่ยในร่างกาย 9-12 วัน รูปร่างเป็น disc-shape เส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ย 2-4 ไมโครเมตร เมื่อย้อม Wright's stain บริเวณขอบเซลล์และแกรนูลติดสีม่วง

ในภาวะปกติเกล็ดเลือดจะช่วยเสริมความแข็งแรงของหลอดเลือดและไม่เกาะติดกับเยื่อบุผนังหลอดเลือด (endothelium) เกล็ดเลือดมีบทบาทสำคัญในการห้ามเลือดเมื่อหลอดเลือดเกิดฉีกขาด ภาวะที่จำนวนเกล็ดเลือดต่ำ (thrombocytopenia) หรือมีความผิดปกติ (dysfunction) จะทำให้เกิดภาวะเลือดออกผิดปกติ

เมื่อเกิดการฉีกขาดของหลอดเลือด เกล็ดเลือดจะมาเกาะติดตามเยื่อบุผนังหลอดเลือด ซึ่งเป็นจุดเริ่มต้นทำให้เกิดการกระตุ้นเกล็ดเลือดให้เปลี่ยนแปลงรูปร่างจาก discoid ไปเป็นทรงกลมที่มี pseudopods ยื่นออกมา (viscous metamorphosis) และเกิดการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีภายในจนกระทั่งปล่อยสารต่าง ๆ ออกจากแกรนูล และทำให้เกิดการรวมกลุ่มของเกล็ดเลือดเป็นการห้ามเลือดเบื้องต้น (primary hemostatic plug) การเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเกล็ดเลือดจะเกิดขึ้นได้รวดเร็วมากภายหลังการเกาะติดพื้นผิวขรุขระ ในการปล่อยสารออกจากแกรนูลของเกล็ดเลือดจะเกิดขึ้นภายใน 2-3 นาที ขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของสารและความเข้มข้นของสารที่มากกระตุ้น และเมทาบอลิซึมของ prostaglandins ในเกล็ดเลือดและกลไกที่เกิดขึ้นแสดงดังรูปที่ 4.2 (พรวิชัย ลำเจียกเทศ, 2540)



รูปที่ 4.2 แสดงกลไกการห้ามเลือด ส่วนที่ประกอบด้วยปฏิกิริยาของปัจจัยการแข็งตัวของเลือดใน intrinsic, extrinsic และ common pathway, เกิดเลือด และระบบการละลายลิ่มเลือด

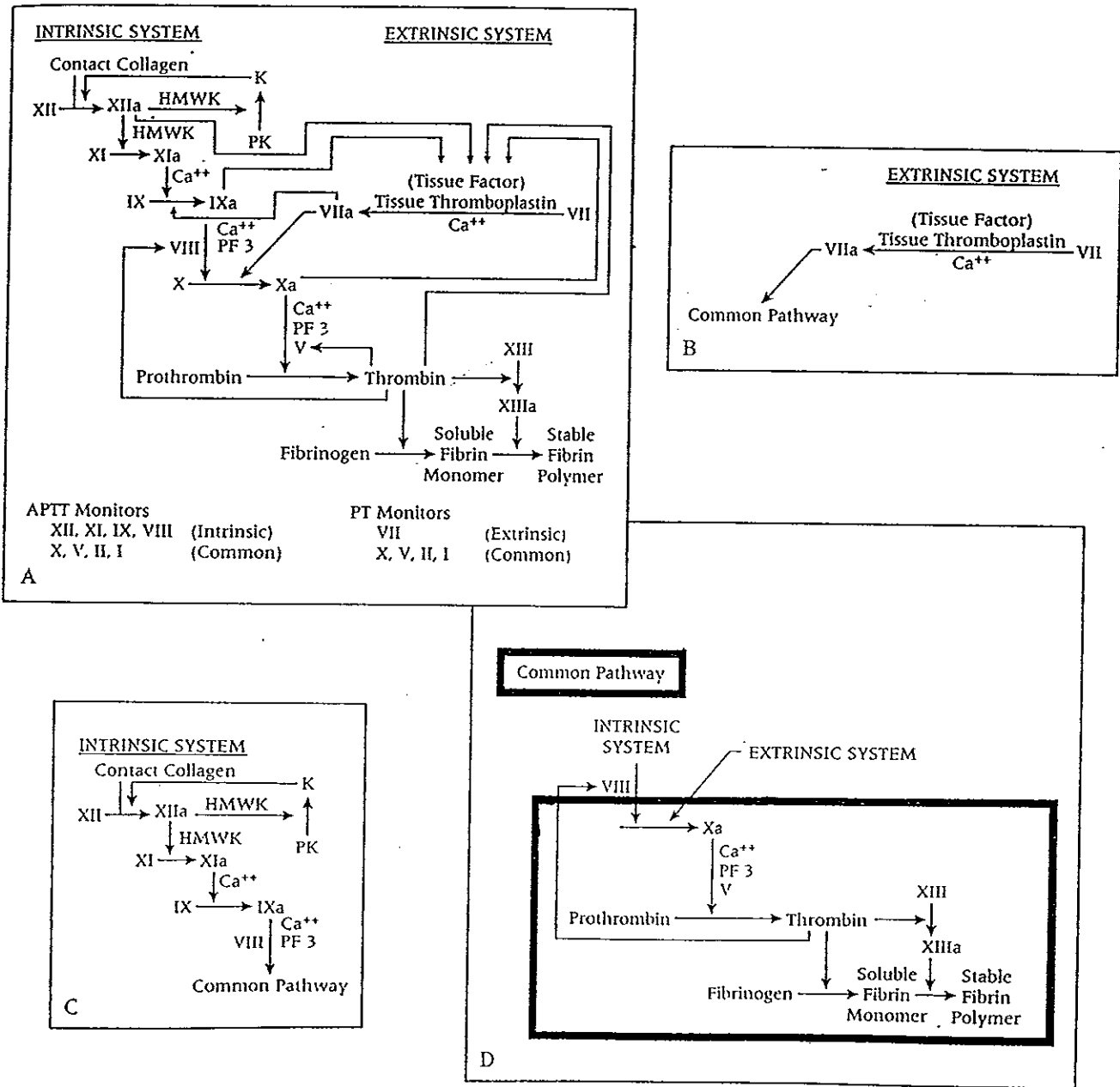
ที่มา: Lake (1995 อ้างโดย พรวรวิทย์ ลำเจียกเทศ, 2540)

4.3 การแข็งตัวของเลือด

ปัจจัยการแข็งตัวของเลือดส่วนมากเป็น glycoprotein (ยกเว้น F. IV และ แคลเซียม) ที่มีอยู่ในพลาสมา

กลไกการแข็งตัวของเลือด (coagulation mechanism) จากสมมุติฐานของ MacFarlane, Davie และ Ratnoff (1964 อ้างโดย พรวิริย์ ลำเจียกเทศ, 2540) กล่าวว่ากระบวนการแข็งตัวของเลือดเป็นปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์ที่ต่อเนื่องกันเป็นขั้น ๆ คล้ายกับลักษณะของน้ำตกคือมีการเชื่อมโยงระหว่างการเปลี่ยนโปรเอนไซม์ (proenzyme) ไปเป็นเอนไซม์ ในภาวะปกติปัจจัยการแข็งตัวของเลือดจะอยู่ในรูปของสารไม่ออกฤทธิ์ เมื่อถูกกระตุ้นจะเปลี่ยนเป็นเอนไซม์ แล้วเอนไซม์นี้จะเปลี่ยนโปรเอนไซม์ตัวถัดไปให้กลายเป็นเอนไซม์ที่สามารถทำปฏิกิริยาต่อจนกระทั่งได้ thrombin ซึ่งเปลี่ยนไฟบริโนเจนให้กลายเป็นไฟบริน การเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์จะมีลักษณะเป็นการเพิ่มขยายปฏิกิริยา การแข็งตัวของเลือดให้มากขึ้นจนสามารถห้ามเลือดได้

การกระตุ้นปัจจัยการแข็งตัวของเลือดในระยะเริ่มต้นประกอบด้วยกลไก 2 กลไกที่ไม่ขึ้นต่อกัน (รูปที่ 4.3) คือ intrinsic pathway ซึ่งเกี่ยวข้องกับการทำปฏิกิริยาใน contact phase และ extrinsic pathway ซึ่งเกี่ยวข้องกับ tissue factor (F. III, TF) ซึ่งทั้ง 2 pathway นี้จะนำไปสู่การกระตุ้น F. X ให้กลายเป็น F. Xa และจะเกิดปฏิกิริยาต่อโดยมี labile factor (F. Va), phospholipid (PF₃) และ Ca⁺⁺ เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่เรียกว่า prothrombinase complex ซึ่งกระบวนการนี้รวมเรียกว่า common pathway และในท้ายที่สุดจะเกิดการสร้างก้อนลิ่มไฟบริน (fibrin clot) (พรวิริย์ ลำเจียกเทศ, 2540) จากสมมุติฐานของ Harmening และ Lemery (1997) กล่าวว่า F. VII น่าจะเป็นโปรตีนตัวสำคัญในการควบคุมการเกิดการแข็งตัวของเลือด เนื่องจาก F. VIIa ใน extrinsic pathway สามารถกระตุ้นการทำงานของ F. IX ใน intrinsic pathway ได้โดยตรง



รูปที่ 4.3 แสดงกลไกการห้ามเลือด A : ภาพรวมของกลไกการห้ามเลือด, B : extrinsic pathway, C : intrinsic pathway, D : common pathway.

ที่มา : Harmening และ Lemery (1997)

วัตถุประสงค์

1. เปรียบเทียบประสิทธิภาพของโคโตซานจากกระดองปลาหมึกและเปลือกกุ้งต่อการห้ามเลือดและการสมานแผล
2. ศึกษารูปแบบที่เหมาะสมสำหรับการนำโคโตซานมาประยุกต์ใช้ห้ามเลือดและการสมานแผล
3. ศึกษาระดับความปลอดภัยในการนำโคโตซานรูปแบบต่าง ๆ ไปประยุกต์ใช้ทางการแพทย์

2. วัสดุ อุปกรณ์และ วิธีการ

วัสดุ

ตัวอย่าง

1. เปลือกกุ้งกุลาดำได้รับความเอื้อเฟื้อจากบริษัทห้องเย็นโชติวัฒน์ขนาดใหญ่ จำกัด (มหาชน) จังหวัดสงขลา
2. กระดองปลาหมึกกล้วย ได้รับความเอื้อเฟื้อจากบริษัทห้องเย็นเทพพิทักษ์ จำกัด จังหวัดปัตตานี
3. หนูแรทสายพันธุ์ Wistar

สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ทดลอง

ชื่อสารเคมี	บริษัทผู้ผลิต/เกรด
Acetic acid	Merck/Analyzed
Acetone	Baker/Analyzed
Anaesthetic ether	M&B/Analyzed
Eosin Y (2',4',5',7'-Tetrabromo fluorescein)	Fluka
Ethyl alcohol (absolute)	Carlo ERBA/Analyzed
Formaldehyde 37%	Lab-Scan/Analyzed
Harris Hematoxylin	ATCA
Histological mounting medium	Permount
Hydrochloric acid	J.T. Baker/Analyzed
Lithium carbonate	Baker Analyzed
N-acetyl- β -D-glucosamine	Sigma/Analyzed
Sodium chloride	Analyticals/Analyzed
Sodium hydroxide	BDH/Analyzed
Tissue embedding medium (Paraplast)	Monoject scientific
Xylene	J.T. Baker/Analyzed
Wright' s stain	BDH

อุปกรณ์

อุปกรณ์	บริษัทผู้ผลิต
ตู้อบลมร้อน (Hot air oven)	WTB binder, Memmert
เครื่องบด Cutting mill, SR-2	Retsch, West-Germany
Test sives ASTM 11	Endecotts Ltd., England
pHมิเตอร์ Accument model 5	Fisher Scientific
เครื่องชั่ง AE240	Mettler, Switzerland
ชุดรีฟลัก-Kjeldahl	tecator
ชุดย่อยไนโตรเจน-Kjeldahl	tecator
ชุดกลั่นไนโตรเจน	Exelo, England
เครื่องวัดความหนืด (Viscometer Ubbelohde No. 200, M.548)	Cannon, U.S.A.
เตาเผา (Furnace muffle)	Carbolite
Autoclave	Hirayama
Blood lancets	redi-lance
Electric tissue float	Lipshaw
Embedding ring	-
Freeze dry	Dura-Dry TM μ P
Ligth microscope CH-2	Olympus
Microtome	Reichert-Jung
Scanning Electron microscope	Jeol, Japan
Sinter glass ASTM 40-60C	KIMAX, U.S.A.
Slides	Sail Brand
Staining jar	Wheaton
Stereomicroscope	Olympus
UV-visible spectrophotometer, UV-160	Shimadzu, Japan

วิธีการ

2.1 การเตรียมโคตินและโคโคซาน

2.1.1 การเตรียมวัตถุดิบกระดองปลาหมึกและเปลือกกุ้ง

กระดองปลาหมึกที่นำมาใช้ศึกษาตลอดการทดลองนี้ได้จากปลาหมึกกล้วย (*Loligo formosana*) โดยเก็บตัวอย่างสดจาก บริษัทห้องเย็นเทพพิทักษ์ จำกัด จังหวัดปัตตานี นำมาล้างด้วยน้ำประปาจนสะอาด ตากและอบแห้งในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 60 °C ประมาณ 16-18 ชั่วโมง นำกระดองในรูปกรอบแห้งมาทำให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ บดหยาบด้วย waring blender แล้วบดละเอียดผ่านตะแกรงแยกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.75 มม. เป็นวัตถุดิบเพื่อเตรียมโคติน

เปลือกกุ้งที่นำมาใช้ตลอดการทดลองนี้ได้จากกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) เก็บตัวอย่างสดเฉพาะส่วนของเปลือกที่ไม่มีส่วนหัวผสม จากบริษัทห้องเย็นโชติวัฒน์หาดใหญ่ จำกัด (มหาชน) จังหวัดสงขลา ล้างด้วยน้ำประปาจนสะอาด นำไปอบแห้งในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 80 °C ประมาณ 16-18 ชั่วโมง นำไปบดเป็นตัวอย่างเปลือกกุ้งผงมีขนาดเช่นเดียวกับกระดองปลาหมึกดังกล่าวข้างต้น เป็นวัตถุดิบเพื่อเตรียมโคติน

2.1.2 การเตรียมโคตินจากกระดองปลาหมึก

การเตรียมโคตินจากกระดองปลาหมึกในการทดลองนี้ดำเนินการตามวิธีที่แนะนำโดย Sornprasit (1997) คือเติมตัวอย่างกระดองปลาหมึกผงที่เตรียมจากข้อ 2.1.1 ลงในสารละลาย 1.0 M NaOH ด้วยอัตราส่วน 1:13 (น.น.:ปริมาตร) กวนให้เข้ากันด้วยเครื่องกวน (magnetic stirrer) ที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 5 ชั่วโมง แล้วนำไปกรองผ่านผ้ากอซ 4 ชั้น โดยใช้ปั๊มสุญญากาศ ล้างส่วนที่กรองได้ 2 ครั้ง ด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการกำจัดไอออน ปรับ pH ให้เป็นกลางด้วย 5.0 M HCl กรองโคตินที่ได้ใส่ถาดแก้ว แล้วนำไปอบแห้งในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 80 °C ประมาณ 16-18 ชั่วโมง เพื่อให้สามารถประเมินเปอร์เซ็นต์ปริมาณผลิตภัณฑ์ที่แน่นอน จึงทำการชั่งน้ำหนักทันทีหลังจากวางให้เย็นที่อุณหภูมิห้องในเดสซิเคเตอร์ (Sornprasit, 1997) เก็บโคตินที่ได้ในภาชนะปิดสนิทเพื่อนำไปใช้ในการเตรียมโคโคซานต่อไป

2.1.3 การเตรียมโคโคซานจากกระดองปลาหมึก

ขั้นตอนการเตรียมโคโคซานจากโคตินซึ่งสกัดจากกระดองปลาหมึก ดำเนินการเช่นเดียวกับวิธีที่แนะนำโดย Sornprasit (1997) คือนำโคตินใส่ในขวด 3 คอที่มีสารละลาย 50% NaOH โดยใช้อัตราส่วนของโคตินต่อสารละลายต่างเป็น 1:15 (น.น.:ปริมาตร)

ผสมให้เข้ากันที่อุณหภูมิ 60 °ซ ทำการรืฟล็กภายใต้บรรยากาศของไนโตรเจน เป็นเวลา 6 ชั่วโมง กรองโคโคซานผ่านซินเทอร์แกส (ASTM No. 40-60, C) และล้าง 2 ครั้งด้วย น้ำกลั่นที่ผ่านการกำจัดอ็อกซิเจน ปรับ pH ให้เป็นกลางด้วย 5.0 M HCl ล้างด้วยเมทานอล 2 ครั้ง และอะซิโตน 1 ครั้ง นำใส่ภาชนะแก้วและนำไปอบที่อุณหภูมิ 50 °ซ 16-18 ชั่วโมง ซึ่ง น้ำหนักทันทีหลังวางให้เย็นในเดสซิเคเตอร์ (Sornprasit, 1997) เพื่อประเมินเปอร์เซ็นต์ ผลผลิต เก็บโคโคซานที่เตรียมได้แต่ละครั้งรวมกันจนได้ปริมาณมากพอสำหรับการใช้ ตลอดการศึกษานี้ในภาชนะป้องกันความชื้น

2.1.4 การเตรียมโคโคซานและโคโคซานจากเปลือกกุ้ง

การกำจัดแร่ธาตุจากเปลือกกุ้งดำเนินการตามวิธีที่แนะนำโดย Bough *et al.*, (1978) โดยค่อยๆ เทเปลือกกุ้งบดละเอียดที่เตรียมจากข้อ 2.1.1 ลงใน 1.0 M HCl (อัตรา ส่วนของเปลือกกุ้งต่อสารละลายกรดเป็น 15:190, น.น.:ปริมาตร) ผสมให้เข้ากันที่อุณหภูมิ ห้องเป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง กรองและล้างหลาย ๆ ครั้งด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการกำจัดอ็อกซิเจน ปรับ pH ให้เป็นกลาง นำไปอบที่อุณหภูมิ 80 °ซ ในตู้อบลมร้อน นำผลผลิตที่ได้จากการ กำจัดแร่ธาตุไปกำจัดโปรตีนและกำจัดหมู่อะซิติดด้วยวิธีการเดียวกับการเตรียมโคโคซานและ โคโคซานจากกระดองปลาหมึก (ข้อ 2.1.2 และ 2.1.3) แต่ในขั้นตอนการกำจัดหมู่อะซิติด ดำเนินการภายใต้บรรยากาศของก๊าซไนโตรเจนที่อุณหภูมิ 126 °ซ เป็นเวลา 8 ชั่วโมง หลังจากซึ่งน้ำหนักแห้งเพื่อประเมินเปอร์เซ็นต์ผลผลิต เก็บโคโคซานที่เตรียมได้แต่ละครั้ง รวมกันจนได้ปริมาณมากพอสำหรับการใช้ตลอดการศึกษานี้ในภาชนะป้องกันความชื้น

2.2 การทดสอบคุณสมบัติทางเคมีและกายภาพของโคโคซานและโคโคซาน

2.2.1 การวิเคราะห์ปริมาณของไนโตรเจน

การวิเคราะห์หาปริมาณของไนโตรเจนจากเปลือกกุ้ง กระดองปลาหมึกบด โคโคซานและโคโคซานที่ได้จากวัตถุดิบทั้ง 2 ชนิด ดำเนินการโดยวิธี Kjeldahl ซึ่งแนะนำใน A.O.A.C. (1984) คือซึ่งน้ำหนักตัวอย่างประมาณ 0.5 กรัม และ 7.0 กรัม ของสารผสม เร่งปฏิกิริยา (K_2SO_4 449.0 กรัม และ $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 1.3 กรัม) ห่อใส่กระดาษกรองแล้ว ใส่ลงใน Kjeldahl flask เติม H_2SO_4 เข้มข้นลงไป 10 มล. ย่อยจนได้สารละลายใสวาง ให้เย็น ปรับปริมาตรเป็น 50 มล. ด้วยน้ำกลั่น แบ่งมา 10 มล. เพื่อทำปฏิกิริยากับ 10 มล. ของ 45% NaOH ภายใต้การกลั่นในหอกกลั่น เพื่อจับก๊าซแอมโมเนียที่เกิดขึ้นด้วย 10 มล. HCl ที่ทราบความเข้มข้นแน่นอนประมาณ 0.2 M ใช้เมทิลเรด เป็นอินดิเคเตอร์ กลั่นจน

ได้ปริมาตรประมาณ 40-50 มล. วัดปริมาณของ HCl ที่เหลือจากการทำปฏิกิริยากับก๊าซแอมโมเนียโดยการไตเตรตกับสารละลายมาตรฐานของ NaOH ที่ทราบความเข้มข้นแน่นอนประมาณ 0.2 M ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ

2.2.2 การวิเคราะห์หาปริมาณเถ้า

การวิเคราะห์หาปริมาณเถ้าในสารตัวอย่างดำเนินการตามวิธีที่แนะนำใน

A.O.A.C. (1984) โดยนำ crucible ไปเผาที่อุณหภูมิ 850 °C ในเตาเผาอุณหภูมิสูง (furnace muffle) เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ซึ่งนำหนักทันทีหลังวางให้เย็นในเดสซิเคเตอร์ด้วยเครื่องชั่งละเอียดถึง 0.1 มก. ซึ่งนำหนักสารตัวอย่างประมาณ 3 กรัม ใส่ crucible เมาด้วยตะเกียงเบนเซนจนไม่มีควันสีขาวก่อนนำไปเผาที่อุณหภูมิ 850 °C เป็นเวลา 8 ชั่วโมง ซึ่งนำหนักทันทีหลังวางให้เย็นในเดสซิเคเตอร์ ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ

2.2.3 การวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุล

น้ำหนักโมเลกุลของโคโคซานจากกระดองปลาหมึกและเปลือกกุ้งวิเคราะห์โดยวิธีวัดความหนืดของสารละลายตามวิธีที่แนะนำโดย Bronswijk (1975) นำโคโคซานตัวอย่าง 0.05 กรัม ละลายใน 100 มล. กรดอะซิติกเข้มข้น 1% กวนให้ละลายด้วยแท่งแม่เหล็กเป็นเวลา 1 ชั่วโมง กรองผ่านซินเทอร์แกรส (ASTM No. 40-60, C) เจือจางสารละลายโคโคซานด้วยสารละลายกรดอะซิติกเข้มข้น 1% ให้มีความเข้มข้นต่าง ๆ กัน 5 ระดับ คือ 0.01, 0.02, 0.03, 0.04 และ 0.05 กรัมต่อเดซิลิตร วัดความหนืดของสารละลายที่อุณหภูมิ 25 °C โดยใช้ Ubbelohde viscometer นำค่าที่ได้ไปใช้ในการคำนวณน้ำหนักโมเลกุลต่อไป ทำการทดลอง 3 ซ้ำสำหรับแต่ละความเข้มข้นนำค่าเฉลี่ยไปคำนวณ relative viscosity (η_{rel}/C), specific viscosity (η_{sp}), specific viscosity per concentration (η_{sp}/C), ln.relative viscosity ($\ln\eta_{rel}$) และ ln.relative viscosity per concentration ($\ln\eta_{rel}/C$) เขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า η_{sp}/C กับความเข้มข้น (C) และค่า $\ln\eta_{rel}/C$ กับความเข้มข้น (C) ค่า intrinsic viscosity (η) ได้มาจากค่า η_{sp}/C ที่มีความเข้มข้นเป็นศูนย์ การคำนวณน้ำหนักโมเลกุลของโคโคซานสามารถคำนวณได้ดังสมการต่อไปนี้

$$\log [\eta] = \log K + a \log Mv$$

เมื่อ K และ a เป็นค่าคงที่มีค่า ; 8.93×10^4 และ 0.71 ตามลำดับ

Mv = viscosity average-molecular weight

[η] = intrinsic viscosity

Relative viscosity (η_{rel}) ได้มาจาก : $\eta_{rel} = t/t_0$

เมื่อ t = เวลาที่สารตัวอย่างใช้ในการเคลื่อนที่ และ t_0 = เวลาที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่

Specific viscosity (η_{sp}) ได้มาจาก : $\eta_{sp} = \eta_{rel} - 1 = (t-t_0)/t_0$

Specific viscosity/ concentration (η_{sp}/C) หรือ reduced specific viscosity
คำนวณจาก

$$\eta_{sp}/C = \frac{(t-t_0)/C}{t_0}$$

เมื่อ C = ความเข้มข้นของสารละลาย (กรัม/100 มล.)

In.relative viscosity per concentration ($\ln\eta_{rel}/C$) หรือ inherent viscosity
($\ln\eta_{inh}$) คำนวณจาก

$$\ln\eta_{rel}/C = \ln(t-t_0)/C$$

2.2.4 การวัดระดับการกำจัดหมู่อะซิติก (degree of deacetylation) ของโคโตซาน

การวัดระดับการกำจัดหมู่อะซิติกของโคโตซาน ดำเนินการโดยวิธีสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ตามวิธีที่แนะนำโดย Muzzarelli และ Rocchetti (1985) โดยหาจุดตัดของ first derivative spectra ของกรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 0.01, 0.02 และ 0.03 M โดยใช้ น้ำกลั่นเป็น blank เพื่อหาช่วงความยาวคลื่นที่กรดอะซิติกมีการรบกวนการดูดกลืนแสงน้อยสุด หรือที่ความเข้มข้นต่าง ๆ มีการดูดกลืนแสงเป็นศูนย์ พบว่าจุดตัดของค่าการดูดกลืนแสงของกรดอะซิติกทุกความเข้มข้นอยู่ที่ 205 นาโนเมตร และค่า first derivative absorption spectrum *N*-acetyl-D-glucosamine มีค่าสูงสุดทุกความเข้มข้น

เตรียมสารละลาย *N*-acetyl-D-glucosamine ความเข้มข้นต่างกัน 5 ระดับ ใน 0.01 M กรดอะซิติก (5-40 มก./ล.) นำไปวัดค่าของ first derivative absorption spectrum ของแต่ละความเข้มข้น เขียนกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นและ first derivative absorption spectra ของ *N*-acetyl-D-glucosamine การวัดค่า degree of deacetylation ของโคโตซานดำเนินการโดยเตรียมสารละลายโคโตซาน 10 มก. ใน 0.1 M กรดอะซิติก 10 มล. ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มล. ด้วยน้ำกลั่น นำไปวัดค่า first derivative absorption spectrum ที่ความยาวคลื่น 205 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อหาปริมาณของ *N*-acetyl-D-glucosamine แล้วนำค่าที่ได้ไปคำนวณเปอร์เซ็นต์ของ degree of deacetylation ในโคโตซานที่ทดสอบโดยแต่ละตัวอย่างทำ 5 ซ้ำ

2.2.5 การวัดความสามารถในการดูดความชื้น

ความสามารถในการดูดความชื้นของโคติน และโคโตซานจากกระดองปลาหมึก และเปลือกกุ้ง ทำการทดสอบตามวิธีที่แนะนำโดย Sornprasit (1997) คือซึ่งตัวอย่างให้น้ำหนักแน่นอนประมาณ 1 กรัม ใส่ vial ที่แห้งและทราบน้ำหนักแน่นอน แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 100-105 °C ในตู้อบลมร้อน จนมีน้ำหนักคงที่ ซึ่งน้ำหนักทันทีหลังวางให้เย็นในเดสซิเคเตอร์ ด้วยเครื่องชั่งละเอียด 0.1 มก. ปิด vial ที่บรรจุสารตัวอย่างด้วยผ้าก๊อชวางไว้ที่อุณหภูมิห้องอากาศเปิด ซึ่งน้ำหนักสารตัวอย่างทุกวันจนน้ำหนักคงที่ ทำการทดลองตัวอย่างละ 4 ซ้ำ

2.2.6 ศึกษาลักษณะพื้นผิวของผงโคโตซานภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope : SEM)

เพื่อให้สามารถประเมินคุณลักษณะทางกายภาพ นำผงโคโตซานจากกระดองปลาหมึกและเปลือกกุ้งที่เตรียมได้จากข้อ 2.1.4 ติดลงบน stub ที่ติดเทปกาว 2 หน้า เคลือบผิวด้วยอนุภาคทองโดยปล่อยแก๊ส Argon เข้าไปชนอนุภาคทองให้ไปเกาะตัวอย่างในสภาพสุญญากาศใช้เวลา 4 นาที จากนั้นนำไปดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

2.2.7 ศึกษาการละลายของโคโตซาน

เพื่อทราบถึงคุณสมบัติการละลายของตัวอย่างโคโตซานที่เตรียมจากเปลือกกุ้ง และกระดองปลาหมึกในสารละลายกรดอะซิติกที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในเบื้องต้นทำการทดสอบโดยใช้ตัวอย่างโคโตซาน 0.2 กรัม ละลายในกรดอะซิติก 100 มล. เข้มข้น 1% พบว่าสามารถละลายได้อย่างสมบูรณ์ จึงค่อย ๆ เพิ่มความเข้มข้นเป็น 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0 กรัมต่อ 100 มล.

2.3 การเตรียมโคโตซานในรูป sponge (สปันจ์) และการทดสอบคุณสมบัติทางฟิสิกส์

เนื่องจากการเตรียมโคโตซานในรูปสารละลายส่วนใหญ่ใช้กรดอ่อนเป็นตัวทำละลาย จึงเป็นไปได้ว่าการนำสารละลายดังกล่าวไปประยุกต์ใช้ทางการแพทย์โดยเฉพาะอย่างยิ่งสำหรับการเร่งการแข็งตัวของเลือดและการเร่งการสมานแผลอาจไม่เหมาะสม จากการศึกษาเบื้องต้นในห้องปฏิบัติการนี้พบว่าเมื่อนำสารละลายโคโตซานในกรดอะซิติกไปทำ freeze dried ผลผลิตที่ได้มีลักษณะคล้ายฟองน้ำหรือสปันจ์ซึ่งมีคุณสมบัติละลายน้ำได้ดี ดังนั้นจึงได้ทำการศึกษาเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมแผ่นสปันจ์โคโตซานแล้วนำไปทดสอบคุณสมบัติทางฟิสิกส์ที่สำคัญบางประการ

จากการทดลองระยะแรกพบว่าความเข้มข้นและปริมาณของสารละลายโคโคซานมีผลต่อคุณลักษณะของแผ่นสปันจ์ ดังนั้นจึงทำการทดสอบหาระดับความเข้มข้นของสารละลายที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการเตรียมแผ่นสปันจ์โคโคซานโดยเตรียมสารละลายจากกระดองปลาหมึกให้มีความเข้มข้น 3 ระดับคือ 0.3, 0.5 และ 0.7 กรัม/100 มล. และจากเปลือกกุ้งมีความเข้มข้น 3 ระดับคือ 0.75, 1.25 และ 1.75 กรัม/100 มล. ใส่ใน suction flask ต่อเข้ากับ vacuum pump เพื่อกำจัดฟองอากาศ เติสารละลายเหล่านี้ 25 และ 50 มล. ลงในถาดแก้วซึ่งแบ่งเป็นช่องสี่เหลี่ยม (glass block) ขนาด 5.5x8.6x2.0 ซม. นำใส่ในช่องแช่แข็ง -20°C แล้วนำเข้าเครื่อง freeze dryer แล้วจึงลดความดันจนกว่าได้แผ่นสปันจ์โคโคซานที่แห้งสนิท

นำแผ่นสปันจ์โคโคซานที่เตรียมได้จากสภาวะต่าง ๆ มาทดสอบคุณลักษณะต่าง ๆ เช่น อัตราการดูดความชื้นกลับ (moisture reabsorption) ลักษณะของพื้นผิว ความสามารถในการละลาย pH และคุณสมบัติที่เปลี่ยนแปลงหลังการนึ่งฆ่าเชื้อ (sterile) ทั้งนี้ได้ทำการเปรียบเทียบระหว่างแผ่นสปันจ์ที่เตรียมจากโคโคซานของกระดองปลาหมึกและเปลือกกุ้ง

การทดสอบความสามารถในการดูดความชื้นดำเนินการทดสอบโดยวางแผ่นสปันจ์โคโคซานที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้บรรยากาศปกติ ซึ่งน้ำหนักทุก ๆ 24 ชั่วโมงเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณความชื้น

ลักษณะพื้นผิวของแผ่นสปันจ์โคโคซานดำเนินการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ stereomicroscope และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ซึ่งดำเนินการเช่นเดียวกับการศึกษาพื้นผิวของเกล็ดโคโคซานที่กล่าวแล้วในข้อ 2.2.6

เพื่อทดสอบความสามารถในการละลายของแผ่นสปันจ์โคโคซานใน 16 mM sodium phosphate pH 7.4 ที่เติม 0.9% NaCl (SP saline), 16 mM sodium phosphate pH 7.4 (SP) และ normal saline (0.9% NaCl) ดำเนินการโดยนำแผ่นสปันจ์โคโคซาน 4 มก. ละลายในสารละลายที่ทดสอบ 1 มล.

การทดสอบความสามารถในการละลายของแผ่นสปันจ์โคโคซานก่อนอบและหลังอบที่ 100°C เป็นเวลา 92 ชั่วโมง นำสารละลายไปวัด pH ของตัวอย่างตามวิธีที่แนะนำโดย Ungbho and Muller (1997) คือตัดแผ่นสปันจ์โคโคซานขนาด 2x2 ซม. ซึ่งให้ทราบน้ำหนักแน่นอน นำไปละลายในน้ำกลั่น 10 มล. แล้วนำสารละลายไปวัด pH

การทดสอบความเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติหลังการนึ่งฆ่าเชื้อดำเนินการโดยนำแผ่นสปันจ์โคโคซานวางในหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว

เป็นเวลา 15 นาที แล้วจึงนำมาเปรียบเทียบคุณสมบัติการละลายในน้ำกลั่นระหว่างก่อนและหลังการนึ่งฆ่าเชื้อ

2.4. ทดสอบคุณสมบัติการห้ามเลือดของสารละลายโคโคซานในรูปสปริง ในสัตว์ทดลอง (*in vivo*) โดยวิธีการหาระยะเวลาการไหลของเลือด (Bleeding time)

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์ 2 ประการคือ ประการแรกเพื่อประเมินศักยภาพในการนำโคโคซานมาใช้สำหรับการห้ามเลือดเมื่อเกิดบาดแผล และประการที่สองคือเปรียบเทียบศักยภาพดังกล่าวระหว่างโคโคซานจากเปลือกกุ้งและกระดองปลาหมึก แต่เนื่องจากการใช้สารละลายโคโคซานในกรดอาจมีผลกระทบต่อคุณสมบัติการห้ามเลือดและการสมานแผลซึ่งเป็นกระบวนการต่อเนื่อง ดังนั้นการทดลองนี้จึงใช้สารละลายโคโคซานที่เตรียมจากสปริงซึ่งละลายใน normal saline (0.9% NaCl) ให้มีความเข้มข้น 4 และ 8 มก./มล. ดำเนินการทดลองตามวิธีที่แนะนำโดย DaCosta *et al.* (1998) คือทำให้เกิดแผลที่ผิวหนังสัตว์ทดลอง หยดสารที่ต้องการทดสอบลงบนแผล ค่อย ๆ ใช้กระดาษกรองซับเลือดที่ไหลออกมา จับเวลาทันทีหลังการหยดสารตัวอย่างจนเลือดหยุดไหล

เนื่องจากวัตถุประสงค์การทดลองนี้มีสองประการดังกล่าว จึงต้องทำให้เกิดแผลในสัตว์ทดลองตัวเดียวกัน 4 แผล เพื่อลดโอกาสความคลาดเคลื่อนจากความแตกต่างเฉพาะตัวของสัตว์ทดลอง (*individual variation*) การประเมินความน่าเชื่อถือของวิธีการเบื้องต้นดำเนินการโดยนำหนูทดลองมาทำให้สลบด้วย anaesthetic ether โคนชมบริเวณหลัง ใช้ใบมีดผ่าตัดกรีดให้เกิดแผลขนาดเท่ากันที่บริเวณดังกล่าวมีความลึก 0.3 ซม. และยาว 1.5 ซม. จำนวน 4 แผล ในลักษณะที่สมมาตรกัน แผลที่หนึ่งหยดสารละลาย 0.9% NaCl ซึ่งใช้เป็นชุดควบคุม (*control*) แผลที่สองหยดสารละลายสปริงจากกระดองปลาหมึก แผลที่สามหยดสารละลายสปริงจากเปลือกกุ้ง และแผลที่สี่ไม่หยดสารละลายใด ๆ เพื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (*control of control*) ค่อย ๆ ซับเลือดที่ไหลออกมาด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 โดยไม่ให้สัมผัสกับแผลโดยตรง จับเวลาทันทีหลังการหยดสารละลายตัวอย่างจนเลือดหยุดไหล ผลการประเมินแสดงให้เห็นว่ามีความคลาดเคลื่อนสูงเพราะการเริ่มต้นไหลของเลือดในแต่ละแผลแปรเปลี่ยนได้ในช่วงกว้าง ทั้งนี้อาจเกิดจากการผ่าตัดแต่ละแผลไม่สามารถทำให้เกิดการตัดเส้นเลือดฝอยขาดได้เท่ากัน นอกจากนั้นระยะเวลาที่

ค่อนข้างยาวนานระหว่างการผ่าตัดและทดสอบแต่ละแผลอาจทำให้เกิดความเปลี่ยนแปลงทางสรีระของระบบไหลเวียนของเลือดในสัตว์ทดลอง

จากปัญหาดังกล่าวนี้จึงเปลี่ยนไปทำให้เกิดแผลที่เส้นเลือดดำของหาง (tail vein) หนูทดลองซึ่งมี 4 เส้น ด้วย lancets แผลแรกห่างจากปลายหาง 70% ของความยาวหาง แผลต่อไปห่างกัน 1 ซม. ทั้งนี้เพื่อลดโอกาสความแตกต่างเนื่องจากขนาดจากการฉีกขาดของเส้นเลือดและระยะเวลาการสลับของสัตว์ทดลอง จากนั้นจึงทดสอบระยะเวลาการแข็งตัวของเลือดด้วยกระดาษกรองเช่นเดียวกับวิธีดังกล่าวข้างต้น

2.5 ทดสอบคุณสมบัติการเร่งการแข็งตัวของเลือดในหลอดทดลอง (*in vitro*) โดยวิธีการหาระยะเวลาการแข็งตัวของเลือด (Blood clotting time)

เพื่อทดสอบคุณสมบัติการเร่งการแข็งตัวของเลือดของโคโคซานในหลอดทดลอง ดำเนินการตามวิธีที่แนะนำโดย Lee และ White (1913 อ้างโดย สุทธิพรณ ประสาทแก้ว และนันทรัตน์ โฆมานะสิน, 2533) คือเจาะเลือด (whole blood) จากสัตว์ทดลองคือหนูแรทปริมาณ 5 มล. (ใช้เข็มเบอร์ 21) จับเวลาตั้งแต่เลือดเข้ากระบอกฉีดยา ถอดเข็มออกแล้วเติมเลือดลงในหลอดทดลอง 3 หลอด หลอดละ 1 มล. โดยเรียงจากหลอดที่ 3, 2 และ 1 ตามลำดับ ซึ่งในแต่ละหลอดเติมสารละลายสปีนจีโคโคซาน 50 ไมโครลิตร นำเลือดทั้ง 3 หลอดแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 37 °C ยกหลอดที่ 1 ขึ้นเอียงดูการแข็งตัวทุก ๆ 5 วินาที เมื่อสังเกตเห็นการแข็งตัวจึงตรวจดูหลอดที่ 2 และ 3 ตามลำดับ อัตราเร็วในการแข็งตัวของเลือดวิเคราะห์จากระยะเวลาซึ่งเริ่มจับทันทีที่เลือดสัตว์ทดลองเข้ากระบอกเข็มจนถึงเวลาที่เลือดในหลอดที่ 3 แข็งตัว แล้วนำมาคำนวณเทียบกับเลือดที่ไม่เติมโคโคซาน และ เลือดที่เติมสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดคือสารละลาย citrate phosphate dextrose (CPD) (อัตราส่วนเลือดต่อ CPD, 100:14) เพื่อเปรียบเทียบคุณสมบัติระหว่างสปีนจีโคโคซานจากกระดองปลาหมึกและเปลือกกุ้งไปพร้อมกับการศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้น จึงเตรียมสารละลายตัวอย่างให้มีความเข้มข้นสองระดับคือ 4 และ 8 มก./มล.

2.6 ศึกษาการเกาะกลุ่มกันของเซลล์ต่าง ๆ ในเลือด (Hemagglutination)

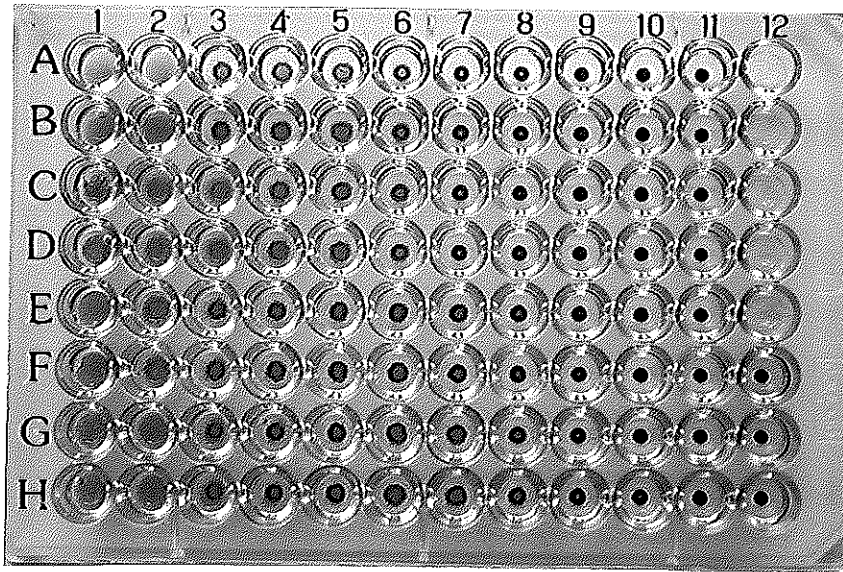
จากผลการศึกษาการเร่งการแข็งตัวของเลือดในหลอดทดลองตามหัวข้อที่ 2.5 พบว่าสารละลายโคโคซานทั้งสองชนิดไม่ช่วยให้เกิดการแข็งตัวของเลือดที่เติมสารละลาย CPD แต่เมื่อนำไปตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าเกิดการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือด

ดังนั้นการทดลองนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาลักษณะการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดชนิดต่าง ๆ ด้วยโคโตซานทั้งในรูปของสารละลายที่เตรียมในกรดและสารละลายสปีนจ์ใน 0.9% NaCl ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

สารละลายโคโตซานเตรียมใน 1% กรดอะซิติกให้ได้ความเข้มข้น 2 มก./มล. นำสารละลายดังกล่าวมาทำให้เจือจางแบบ 1:2 serial dilution ด้วย 0.9% NaCl ที่มี 50 mM Tris-HCl pH 7.5 ในขณะที่สารละลายสปีนจ์โคโตซานความเข้มข้น 2 มก./มล. เตรียมใน 0.9% NaCl ที่มี buffer ชนิดเดียวกัน ตัวอย่างเหล่านี้ใช้โคโตซานจากทั้งเปลือกกุ้งและกระดองปลาหมึกเพื่อการเปรียบเทียบ

การแยกเม็ดเลือดแดง เม็ดเลือดขาว และเกล็ดเลือด ดำเนินการโดยนำตัวอย่างเลือดที่ผสม CPD (อัตราส่วนเลือดต่อ CPD, 100:14) มาปั่นแยกด้วย centrifuge ที่ความเร็วต่างกันตามวิธีของ พรวิชัย ลำเจียกเทศ (2540) (ดูในภาคผนวก) สำหรับการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงทำการทดสอบโดยเติมสารละลายตัวอย่างโคโตซานความเข้มข้นต่าง ๆ 50 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุมของ titer plate แล้วจึงเติมเม็ดเลือดแดงปริมาตรเท่ากัน (เตรียมให้มีความเข้มข้น 2% ใน 50 mM Tris-HCl pH 7.5) ลงไปผสมให้เข้ากัน วางไว้ที่อุณหภูมิห้องสังเกตการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงเปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งเป็นหลุมที่มีส่วนผสมของสารละลายเม็ดเลือดแดง และ buffer (รูปที่ 5) เพื่อให้มองเห็นการรวมกลุ่มของเม็ดเลือดในภาพรวมการทดลองนี้จึงใช้เลือดที่ดูจากสัตว์ทดลองใหม่ ๆ แล้วเติม CPD (อัตราส่วนเลือดต่อ CPD, 100:14) (whole blood) ทำการศึกษาโดยวิธีเดียวกันเปรียบเทียบกันระหว่างเลือดจากหนูแรท วีว และกระต่าย

เพื่อศึกษาลักษณะการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดชนิดต่าง ๆ ในรายละเอียดมากยิ่งขึ้น จึงนำตัวอย่างเลือดที่เกาะกลุ่มกันใน titer plate ดังกล่าวข้างต้นไปย้อมด้วย Wright's stain แล้วนำผลไปวิเคราะห์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ตามวิธีที่แนะนำในโครงการตำรา-ศิริราช (2524) สำหรับเม็ดเลือดขาว และเกล็ดเลือด ดำเนินการศึกษาโดยวิธีเดียวกัน



รูปที่ 5 การทดสอบ Hemagglutination ความเข้มข้นของสารละลายโคโคซานเจือจางลง จากหลุมที่ 1 ไปถึงหลุมที่ 11 โดยมีชุดควบคุมเป็นหลุมที่ F12, G12 และ H12

2.7 ศึกษาลักษณะการจับกลุ่มกันของเม็ดเลือดด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope; SEM)

เพื่อศึกษาลักษณะการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดชนิดต่าง ๆ ด้วยโคโคซานในรายละเอียดมากยิ่งขึ้นจึงนำตัวอย่างเลือด (whole blood) ผสมเบา ๆ กับสารละลายโคโคซานจากกระดองปลาหมึกเข้มข้น 8 มก./มล. อัตราส่วน 1:1 นำเม็ดเลือดที่เกาะกลุ่มกันไปหยดบนสไลด์ ค่อย ๆ ใช้แท่งแก้วกลิ้งให้ตัวอย่างเลือดเกาะเป็นแผ่นฟิล์มบาง ๆ วางให้แห้งภายใต้สภาพปกติของห้องปฏิบัติการ ตัดสไลด์เป็นชิ้นขนาด 1x1 ซม. เลือกแผ่นที่สังเกตเห็นการเกาะกลุ่มกันของเม็ดเลือดชัดเจนด้วยกล้องจุลทรรศน์เป็นตัวแทนสำหรับนำไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน นำแผ่นตัวอย่างดังกล่าวใส่ในขวดบรรจุ silica gel นำไปทำ freeze dried จนแห้ง ปิดขวดให้สนิทป้องกันการดูดความชื้นระหว่างการเก็บรักษา นำตัวอย่างไปเคลือบทองโดยปล่อยแก๊ส Argon เข้าไปชนอนุภาคทองให้ไปเกาะตัวอย่างในสภาพสุญญากาศใช้เวลา 4 นาที แล้วนำไปศึกษาลักษณะการจับกลุ่มของเซลล์ชนิดต่าง ๆ ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ดำเนินการทดลองด้วยวิธีเดียวกันทุกประการแต่ใช้ตัวอย่างเลือดซึ่งผสมกับสารละลาย 0.9% NaCl ที่มี 50 mM Tris-HCl pH 7.5

2.8 ศึกษาคุณสมบัติการเร่งการสมานแผลด้วยโคตินและโคโคซานในสัตว์ทดลอง

สัตว์ทดลองที่ใช้เพื่อศึกษาคุณสมบัติการเร่งการสมานแผลด้วยโคตินและโคโคซานคือหนูแรทพันธุ์ Wistar เนื่องจากการทดลองนี้มีวัตถุประสงค์ที่ต้องการเปรียบเทียบศักยภาพของการเร่งการสมานแผลด้วยโคตินและโคโคซานทั้งจากกระดองปลาหมึกและเปลือกกุ้ง ในเวลาเดียวกันทำให้มีหลายตัวแปร ดังนั้นจึงผ่าตัดให้เกิดแผล 4-5 แผลในตัวเดียวกันเพื่อหลีกเลี่ยงตัวแปรที่ไม่ตั้งใจ (non-intensive variable) จึงใช้สัตว์ทดลองเพศผู้ ขนาดโตเต็มวัยน้ำหนัก 200-300 กรัม (อายุประมาณ 8-11 สัปดาห์)

2.8.1 การทดสอบระดับความน่าเชื่อถือของวิธีผ่าตัด การดูแลแผลระหว่างการทดลอง

จากการศึกษาเบื้องต้นแสดงให้เห็นว่าวิธีการที่ใช้ศึกษาคุณสมบัติการเร่งการสมานแผลโดยการประเมินจากการศึกษาในระดับของเนื้อเยื่อวิทยามีผลกระทบอย่างยิ่งต่อระดับความน่าเชื่อถือของผลการทดลอง เช่น ตำแหน่งของการทำให้เกิดแผล วิธีการผ่าตัด การเย็บแผล การดูแลสัตว์ระหว่างการทดลอง การเลือกตำแหน่งของเนื้อเยื่อเพื่อวิเคราะห์ผล เป็นต้น

เนื่องจากการติดเชื้อเกิดขึ้นได้ง่ายสำหรับแผลบริเวณหน้าท้อง ดังนั้นตลอดการทดลองนี้จึงทำการทดลองกับแผลบริเวณแผ่นหลังซึ่งผ่านการตัดและโกนขนออกไป เช็ดด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อ (savlon, 1:100) กรีดให้เกิดแผลยาว 1.5 ซม. ลึก 3 มม. ด้วยใบมีดผ่าตัดเบอร์ 23 สอดในร่องแผ่นพลาสติกเพื่อให้สามารถควบคุมความลึกได้ ระดับความลึกดังกล่าวนี้ทำให้เกิดแผลผ่านชั้นหนังแท้ (dermis) ถึงกล้ามเนื้อซึ่งเป็นชั้นที่มีเส้นเลือดฝอยกระจายอยู่ทั่วไป เพื่อหลีกเลี่ยงการอักเสบของเนื้อเยื่อเนื่องจากความคมจึงใช้มีดเพียงใบเดียวสำหรับสัตว์ทดลองแต่ละตัว หยดสารละลายที่ต้องการทดสอบบนแผล 50 ไมโครลิตร ซับเลือดที่ไหลออกมาจนหยุดไหลด้วยกระดาษกรองแล้ว เย็บแผล 2 ครั้งห่างกัน 0.5 ซม. ป้ายแผลด้วยยาฆ่าเชื้อ ก่อนนำสัตว์ทดลองกลับเข้ากรง โดยอุปกรณ์ต่าง ๆ ที่ใช้ตลอดการทดลองนี้ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ ในระหว่างการทดลองหยดสารละลายที่ทดสอบลงบนแผลทุกวัน แล้วตามด้วยการป้ายยาฆ่าเชื้อ หลังการสังเกตเห็นการเชื่อมติดกันของแผลผ่าตัดทดลองเป็นช่วง ๆ เพื่อนำตัวอย่างแผลมาตรวจสอบทางเนื้อเยื่อวิทยา

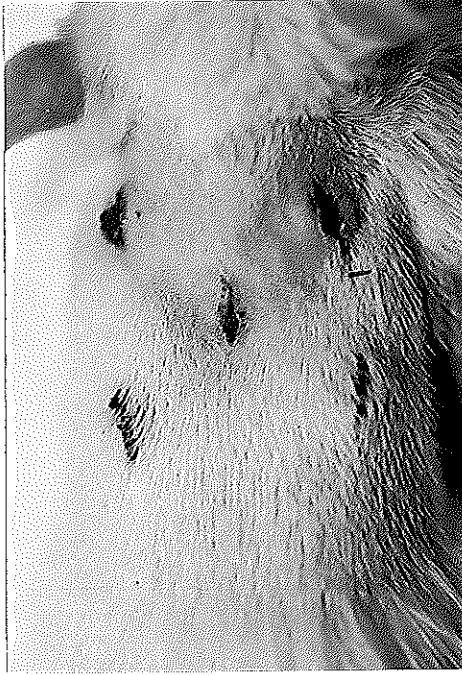
จากการทดสอบเบื้องต้นดังกล่าวชี้ให้เห็นว่าสิ่งที่จะต้องแก้ไขสำหรับการทดลองจริงสรุปได้ 3 ประการคือ ประการแรก การเย็บแผลนอกจากเป็นการเพิ่มระยะเวลาการสลายของสัตว์ทดลองแล้วยังทำให้แผลมีการอักเสบ และทำให้อ่านผลทางเนื้อเยื่อวิทยามีโอกาสผิดพลาดมากยิ่งขึ้น ดังนั้นการทดลองจริงจึงลดขนาดความยาวของแผลลงมาเป็น

1.0 ซม. โดยให้แผลมีความลึกเท่าเดิม และไม่ต้องเย็บแผล ประการที่สอง การป้ายแผลทุกวันด้วยสารละลายตัวอย่างแล้วตามด้วยการป้ายยาฆ่าเชื้ออาจเป็นตัวแปรสำคัญต่อผลการทดลองอีกด้วย ดังนั้นการทดลองจริงจึงควรหดยดสารละลายตัวอย่างเพียงครั้งเดียวหลังการผ่าตัดโดยไม่ต้องใช้ยาฆ่าเชื้อ ประการที่สาม เมื่อสังเกตด้วยตาเปล่าพบว่าการสมานแผลส่วนใหญ่เริ่มสมบูรณ์หลังการผ่าตัด 10 วัน และสมบูรณ์อย่างยิ่งหลังการผ่าตัด 21 วัน ดังนั้นจึงกำหนดระยะเวลาดังกล่าวในการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาต่อไป

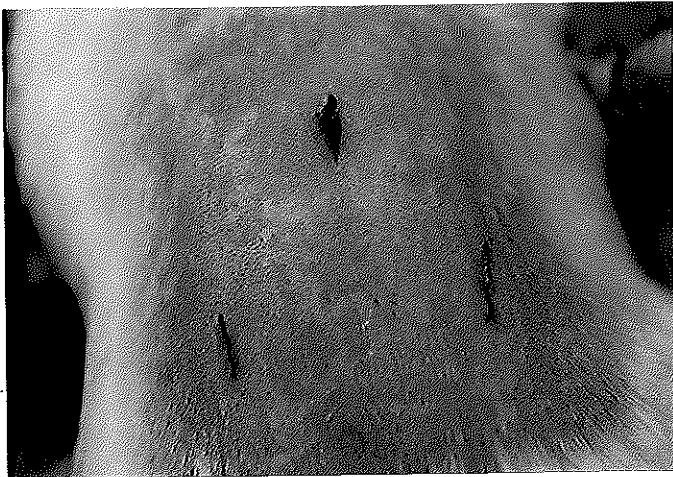
2.8.2 การทดสอบผลกระทบจากความแตกต่างของการสมานแผลเนื่องจากตำแหน่งบนแผ่นหลัง

เนื่องจากการสมานแผลที่ตำแหน่งต่างกันแม้ในสัตว์ทดลองตัวเดียวกันอาจแตกต่างกันได้ การเปรียบเทียบลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาจึงอาจผิดพลาดได้ จึงดำเนินการทดลองเพื่อทดสอบความแตกต่างดังกล่าวโดยทำให้เกิดแผลบนแผ่นหลังหนูทดลองตัวเดียวกันจำนวน 5 แผล (รูปที่ 6) โดยใช้มีดผ่าตัดกรีดให้เกิด 2 แผล (ซ้าย-ขวา) เหนือสะบักของซากุหน้า ยาว 1 ซม. และลึก 3 มม. (แผลที่ 1 และ 2) กรีดตามแนวเดียวกันให้มีขนาดเดียวกันอีก 2 แผล (ซ้าย-ขวา) ใต้ 2 แผลแรกห่างลงมาประมาณ 2 ซม. (แผลที่ 3 และ 4) และอีกหนึ่งแผลตรงกึ่งกลางของทั้ง 4 แผล (แผลที่ 5) ซึ่งจะอยู่บนตำแหน่งกระดูกสันหลัง ดำเนินการทดลองกับสัตว์ทดลอง 6 ตัว ตัวที่ 1 และ 2 ไม่หดยดสารใด ๆ (เป็นชุดควบคุม) ตัวที่ 3 และ 4 หดยดสารละลาย 0.9% NaCl ตัวที่ 5 และ 6 หดยดสารละลาย 1% กรดอะซิติก ฆ่าสัตว์ทดลองชุดละ 1 ตัว หลังการทดลอง 10 และ 21 วัน ตัดชิ้นเนื้อบริเวณแผลเพื่อตรวจสอบทางเนื้อเยื่อวิทยา

ผลจากการทดสอบนี้แสดงให้เห็นว่าการสมานแผลของแผลที่ 1 และ 2 เกิดขึ้นช้ากว่า แผลที่ 3, 4 และ 5 ทั้งนี้อาจเนื่องจากแผลที่ 1 และ 2 อยู่เหนือสะบักมีการเคลื่อนไหวอยู่ตลอดเวลา ดังนั้นตลอดการทดลองนี้จึงเลือก แผลที่ 3, 4 และ 5 (รูปที่ 7) มาใช้สำหรับการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อที่ไม่ถูกผ่าตัดซึ่งเป็นชุดควบคุม



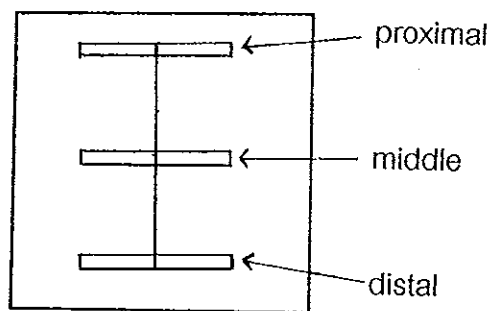
รูปที่ 6 แสดงตำแหน่งแผลผ่าตัดบนแผ่นหลังหุุดตลงจำนวน 5 แผล



รูปที่ 7 แสดงตำแหน่งของการทำแผลบนหลังหุุดตลง 3 แผล

2.8.3 การวิเคราะห์ความแตกต่างทางเนื้อเยื่อวิทยาของการสมานแผลเนื่องจากตำแหน่งบนแผลเดียวกัน

นอกจากตำแหน่งของแผลบนแผ่นหลังมีผลต่อการสมานแผลแล้ว การใช้ตัวอย่างเนื้อเยื่อซึ่งตัด (section) จากบริเวณต่างกันบนแผลเดียวกันอาจทำให้ผลการวิเคราะห์ทางเนื้อเยื่อวิทยาแตกต่างกันด้วย การทดลองนี้จึงแบ่งตำแหน่งของแผลเดียวกันออกเป็น 3 ส่วน คือ proximal, middle และ distal (รูปที่ 8) ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าตำแหน่งภายในแผลเดียวกันมีการสมานแผลไม่แตกต่างกัน ดังนั้นตลอดการทดลองนี้จึงเลือกตำแหน่ง middle ของแต่ละแผลมาใช้ในการวิเคราะห์ทางเนื้อเยื่อวิทยา



รูปที่ 8 แสดงตำแหน่งของการตัดแบ่งภายในแผลเดียวกันโดยแบ่งเป็น proximal, middle และ distal

2.8.4 การศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา

2.8.4.1 การเตรียมตัวอย่างเนื้อเยื่อเพื่อการตรวจสอบทางจุลทรรศน์วิทยา

การศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาจะต้องมีการนำชิ้นเนื้อที่ต้องการศึกษาไปผ่านขั้นตอนต่างๆ ได้แก่ Fixation, Tissue processing, sectioning และ staining ดำเนินตามวิธีการของ เวคิน นพินิตย์ (2529)

1. Fixation

เป็นขั้นตอนเพื่อทำให้เซลล์และเนื้อเยื่อมีสภาพที่อยู่ตัวและคงที่ในโครงสร้างที่ใกล้เคียงกับสภาพเป็นจริงเมื่อขณะมีชีวิตอยู่ให้มากที่สุด โดยโกนขนบริเวณแผ่นหลังสัตว์ทดลองออก แล้วตัดชิ้นเนื้อบริเวณแผลเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมล้างด้วย 0.9% NaCl แล้วแช่ลงในฟอร์มาลินเข้มข้น 10%

2. Tissue processing

ในกระบวนการเตรียมตัวอย่างคือการเอาตัวกลางหรือสารเคมีที่ช่วยในการเสริมความแข็งให้กับเซลล์และเนื้อเยื่อ เข้าไปแทนที่ของเหลวภายในเซลล์ก่อนที่จะนำไปตัดให้เป็นชิ้นบาง ๆ และย้อมสีเพื่อการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยตัดชิ้นเนื้อให้มีขนาดเพื่อการ section ล้างชิ้นเนื้อผ่านน้ำไหลเพื่อกำจัดฟอर्मาลิน นำไปผ่านขบวนการดึงน้ำออกจากเซลล์ (dehydration) โดยผ่านอัลกอฮอล์ 70% 1 ครั้ง, อัลกอฮอล์ 95% 2 ครั้ง, อัลกอฮอล์ 100% 2 ครั้ง และ โซลีน 2 ครั้ง แต่ละครั้งใช้เวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำสารอื่นเข้าแทนที่เพื่อทำให้เนื้อเยื่อแข็งและคงสภาพ ในรูปของพาราฟิลเหลวที่อุณหภูมิ 60 °C 3 ครั้ง ทำให้พาราฟิลเข้าแทนที่โซลีนและเพื่อเสริมสร้างโครงสร้างของเซลล์ จากนั้นวางชิ้นเนื้อใน Embedding ring ให้ได้ตำแหน่งเพื่อนำไปตัดเป็นชิ้นบาง ๆ ต่อไป (Embedding)

3. Sectioning

ภายหลังจากการฝังชิ้นเนื้อในพาราฟิลพร้อมที่นำไปสู่ขั้นตอนใหม่ คือ การหั่นให้เป็นชิ้นบางด้วย Microtome เรียกวิธีการนี้ว่า sectioning เพื่อให้ได้ชิ้นเนื้อที่บางเรียกว่า section โดยหั่นให้ได้ขนาด 5-10 ไมโครเมตร นำชิ้นเนื้อที่ตัดได้ลอยในอ่างควบคุมอุณหภูมิ (electric tissue float) เพื่อให้ชิ้นเนื้อกางออกเต็มที่ แล้วนำแผ่นกระจกสไลด์ตักชิ้นเนื้อดังกล่าวให้ติดบนแผ่นสไลด์ นำไปผึ่งให้แห้งในตูอบลมร้อนที่ 60 °C เป็นเวลา 1 คืน เพื่อให้เนื้อติดกับแผ่นสไลด์

4. Staining

การย้อมสีเป็นการทำให้สีหรือสารเคมีไปทำปฏิกิริยากับสิ่งที่ต้องการจะศึกษาให้เกิดสีเพื่อสะดวกในการแยกแยะส่วนต่าง ๆ ภายในตัวอย่าง ดังนั้นวัตถุประสงค์ในการย้อมสีเพื่อแสดงให้เห็นความแตกต่างของเซลล์และเนื้อเยื่อโดยปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจากการใช้สี ในการทดลองนี้ย้อมด้วยสี H&E ดำเนินการโดยผ่านขั้นตอนการกำจัดพาราฟิลโดยผ่านการจุ่มในโซลีน 4 ครั้ง ครั้งแรก 10 นาที ครั้งที่ 2-4 จุ่มสั้นลง 15 ครั้ง ล้างโซลีนออกในอัลกอฮอล์ 100% 2 ครั้ง ย้ายไปจุ่มในอัลกอฮอล์ 95% 4 ครั้ง แล้วล้างด้วยน้ำประปาที่ไหลตลอดเวลา 10 นาที จากนั้นย้อมสี Harris' s hematoxylin 7 นาที แล้วล้างผ่านน้ำประปาไหล 10 นาที ล้างสีส่วนเกินออกโดยจุ่ม 1 ครั้ง ใน 1% acid alcohol ตามด้วยการล้างผ่านน้ำประปา 10 นาที ทำให้เป็นกลางโดยจุ่มใน saturated lithium carbonate 10 ครั้ง ตามด้วยล้างผ่านน้ำประปา 10 นาที แล้วย้อมด้วยสี eosin 2 นาที แล้วล้างสี eosin ส่วนเกินด้วยอัลกอฮอล์ 95% 4 ครั้ง กำจัดน้ำออก

โดยจุ่มในอัลกอฮอล์ 100% 2 ครั้ง แล้วผ่านการทำให้สไลด์ใสขึ้นด้วยไซลีน 4 ครั้ง แะในไซลีนสุดท้ายไว้ 10 นาที แล้วนำไปทำเป็นสไลด์ถาวรโดยหยด permount 1 หยดแล้วปิดทับด้วย cover slips นำแผ่นสไลด์ที่ผ่านการย้อมไปดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์

2.8.4.2 การอ่านผลการสमानแผลทางเนื้อเยื่อวิทยา

เนื่องจากไม่มีเกณฑ์ในการให้คะแนนเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณของระดับการอักเสบและการสमानแผลที่แน่นอน ดังนั้นจึงมีระบบการให้คะแนนโดยเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของแผลที่ใช้โคโตซานที่ 10 และ 21 วัน กับชุดควบคุม โดยมีการศึกษาลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาเทียบต่อ 1 field ที่กำลังขยายสูง (X400) ได้แก่ การเชื่อมติดกันของชั้น epithelial cell จำนวนของไฟโบรบลาส ไฟโบรไซต์ คอลลาเจนไฟเบอร์ หลอดเลือดฝอย lymphocyte macrophage การเรียงตัวของคอลลาเจนไฟเบอร์ และ ปริมาณของเซลล์ที่สร้างใหม่บริเวณแผล โดยแบ่งระดับการให้คะแนนต่าง ๆ ดังนี้ (ดัดแปลงจาก DaCosta *et al.*, 1998)

epithelial cell (Ep) แบ่งเป็น 4 ระดับ คือ เซลล์ไม่เชื่อมติดกัน (-), เซลล์เชื่อมติดกันบางส่วน (+1), เซลล์เชื่อมติดกันแต่มีความหนากว่าปกติ (+2) และ เซลล์เชื่อมติดกันความหนาปกติ (+3)

จำนวนไฟโบรบลาส (Fb) และไฟโบรไซต์ (Fc) แบ่งเป็น 4 ระดับ คือ มีในระดับปกติ 1-19 เซลล์/field (+1), มีระดับใกล้เคียงปกติ 20-39 เซลล์/field (+2), มีระดับปานกลาง 40-60 เซลล์/field (+3) และมีมากกว่า 60 เซลล์/field (+4)

ปริมาณคอลลาเจนไฟเบอร์ (Cd) แบ่งเป็น 3 ระดับ คือ มีระดับปกติ (+1), มีระดับปานกลาง (+2) และมีมาก (+3)

การเรียงตัวของคอลลาเจนไฟเบอร์ (Cf) แบ่งเป็น 3 ระดับ ไฟเบอร์เรียงตัวกันหลวม ๆ (+1), เริ่มเรียงตัวเป็นมัด (+2) และ เรียงตัวเป็นมัด (+3)

ปริมาณหลอดเลือดฝอย (Vc) แบ่งเป็น 4 ระดับ คือ พบบางบริเวณ (+1), พบ 1-20 หลอด/field (+2), พบ 21-40 หลอด/field (+3) และ พบมากกว่า 40 หลอด/field (+4)

ปริมาณ lymphocyte (Lm) และ macrophage (Mc) แบ่งเป็น 5 ระดับ คือ ไม่พบ (-), พบบางบริเวณ (+1), พบ 1-50 เซลล์/field ที่x400 (+2), พบ 51-100 เซลล์/field (+3) และ พบมากกว่า 100 เซลล์/field (+4)

ปริมาณของ hair follicles ที่สร้างใหม่บริเวณแผล (Hair) แบ่งเป็น 4 ระดับ คือ พบ 1-3 follicles/field (+1), 4-6 follicles/field (+2), 7-9 follicles/field (+3) และมากกว่าหรือเท่ากับ 10 follicles/field (+4)

2.8.5 ผลของโคโคซานที่ละลายในกรดอะซิติกเข้มข้น 1% ต่อการเร่งสมานแผล

ทำการศึกษาผลของโคโคซานที่มาจากกระดองปลาหมึกและเปลือกกุ้งที่ละลายในกรดอะซิติกเข้มข้น 1% และตำแหน่งของแผลที่อยู่ทางด้านซ้ายและขวาต่อการเร่งสมานแผลที่ 10 และ 21 วัน ดำเนินการตามวิธีในข้อ 2.8.1 โดยทำแผลหนูทดลอง 2 แผล ด้านซ้าย และขวาโดยให้แผลห่างจากปลายจมูกสัตว์ทดลองประมาณ 9-10 ซม. แผลยาว 1.0 ซม. ลึก 3 มม. ชีบเลือดด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 เมื่อเลือดหยุดไหลหยุดสารละลายตัวอย่างลงไปแผลละ 50 ไมโครลิตร ชีบแผลให้สารกระจายทั่วบริเวณแผลประมาณ 1 นาที

สารตัวอย่างที่ใช้ได้แก่ กรดอะซิติกเข้มข้น 1%, โคโคซานจากเปลือกกุ้งและจากกระดองปลาหมึกที่ละลายในกรดอะซิติกเข้มข้น 1% ให้มีความเข้มข้น 8 และ 4 มก./มล. ตามลำดับ ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ไม่หนืดมากเกินไป ในการทดลองนี้ใช้สัตว์ทดลองทั้งหมด 14 ตัว ทำการทดลองชุดละ 4 ซ้ำ และมีชุดควบคุมเป็นบริเวณที่ไม่ทำแผล ข่าสัตว์ทดลองเมื่อครบ 10 และ 21 วัน เก็บชิ้นเนื้อบริเวณแผลล้างด้วย 0.9% NaCl แช่ในฟอร์มาลินเข้มข้น 10% เพื่อนำไปทำ Tissue processing และย้อมสี H&E บันทึกผลลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาได้แก่ การเชื่อมกันของ epithelial cell ปริมาณไฟโบรบลาส และไฟโบรไซต์ ปริมาณและการเรียงตัวของคอลลาเจน ปริมาณหลอดเลือดฝอย เซลล์ lymphocyte macrophage และปริมาณ hair follicles ที่สร้างใหม่บริเวณแผล

2.8.6 ผลของสารละลายจากสปิงจ์โคโคซานต่อการสมานแผล

ทำการศึกษาผลของสารละลายจากสปิงจ์โคโคซานที่มาจากกระดองปลาหมึกและเปลือกกุ้งและตำแหน่งของแผลต่อการสมานแผล ดำเนินการทำแผลหนูทดลองตามวิธีในข้อ 2.8.5 เมื่อเลือดหยุดไหลหยุดสารละลายตัวอย่างลงไปแผลละ 50 ไมโครลิตร

สารตัวอย่างที่ใช้ในการทดลองได้แก่ 0.9% NaCl, สปิงจ์โคโคซานจากเปลือกกุ้งและกระดองปลาหมึกที่ละลายใน 0.9% NaCl ให้มีความเข้มข้น 8 มก./มล. และมีชุดควบคุมเป็นบริเวณที่ไม่ทำแผล ในการทดลองนี้ใช้สัตว์ทดลองทั้งหมด 12 ตัว ทำการทดลองชุดละ 4 ซ้ำ เมื่อครบ 10 และ 21 วันข่าสัตว์ทดลอง และเก็บชิ้นเนื้อบริเวณแผลแช่ฟอร์มาลินเข้มข้น 10% เพื่อนำไปทำ Tissue processing และ ย้อมสี H&E บันทึกผลการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาเช่นเดียวกับที่กล่าวไว้ในข้อ 2.8.5

2.8.7 ผลของโคตินและโคโตซานในรูปผงต่อการสมานแผล

เนื่องจากมีรายงานว่ามีการนำผงโคตินมาใช้ใส่แผลโดยตรง ซึ่งโคตินนั้นได้มาจากเชื้อราที่มีผลช่วยเร่งการสมานแผลได้หลังจากนำมาฆ่าเชื้อก่อนใช้ และยังสามารถนำมาประยุกต์ใช้ทางการแพทย์ได้มากมาย (Muzzarelli, 1977) ดังนั้นจึงได้ทดลองใช้ผงโคตินและโคโตซาน มาใช้ในการทดลองการสมานแผลด้วย

ทำการศึกษารูปผลของโคตินและโคโตซานในรูปผงที่มาจากกระดองปลาหมึกและเปลือกกุ้งต่อการสมานแผล ดำเนินการทำแผลหนูทดลองตามข้อ 2.8.5 เมื่อเสียดหยุดไหลใส่สารตัวอย่างในรูปผงลงบนแผล แผลละ 5 มก. เปรียบเทียบกับแผลที่ไม่ใส่สารใด ๆ และบริเวณที่ไม่ทำแผลเป็นชุดควบคุม

สารตัวอย่างที่ใช้ได้แก่ ผงโคตินและโคโตซานที่มาจากเปลือกกุ้งและกระดองปลาหมึกที่ผ่านตะแกรงขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 106 ไมโครเมตร ใช้สัตว์ทดลองทั้งหมด 10 ตัว ทำการทดลองชุดละ 4 ซ้ำ เมื่อครบ 21 วัน ฆ่าสัตว์ทดลองและเก็บชิ้นเนื้อบริเวณแผลแช่ในฟอร์มาลินเข้มข้น 10% เพื่อนำไปทำ Tissue processing และ ย้อมสี H&E บันทึกผลการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา เช่นเดียวกับที่กล่าวไว้ในข้อ 2.8.5

2.9 การศึกษาความปลอดภัยของการใช้โคโตซานในสัตว์ทดลอง

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบว่าโคโตซานที่นำมาใช้มีความปลอดภัยต่อสัตว์ทดลองหรือไม่ ดังนั้นจึงได้ทำการศึกษาว่าโคโตซานจะส่งผลกระทบต่อหนูทดลองอย่างไร เมื่อฉีดสารละลายโคโตซานเข้าใต้ผิวหนัง

2.9.1 ศึกษาผลกระทบหลังฉีดสารละลายโคโตซานเข้าใต้ผิวหนังของหนูทดลอง (subcutaneous injection)

จากข้อสงสัยดังกล่าวจึงดำเนินการทดลองโดยวิธีที่แนะนำโดย Waynforth และ Flecknell (1992) คือใช้น้ำหนักหนูแรท โกลขนบริเวณต้นคอ ฉีดสารละลายดังต่อไปนี้ ได้แก่ 0.9% NaCl, กรดอะซิติกเข้มข้น 1%, โคโตซานจากเปลือกกุ้ง และกระดองปลาหมึกที่ละลายในกรดอะซิติกเข้มข้น 1% ให้มีความเข้มข้น 8 และ 4 มก./มล. ตามลำดับ และสปันจ์โคโตซานจากกระดองปลาหมึกและเปลือกกุ้งละลายใน 0.9% NaCl ให้มีความเข้มข้น 8 มก./มล. ปริมาณ 0.5 มล. โดยใช้เข็มเบอร์ 26G ฉีดเข้าใต้ผิวหนังบริเวณต้นคอของหนูแรททางด้านซ้ายและขวา (รูปที่ 9) สังเกตการเกิด inflammation หลังการทดลอง 6, 12, 24 ชั่วโมง และ ทุก ๆ 2 วัน เป็นเวลา 61 วัน เก็บชิ้นเนื้อบริเวณที่ฉีดสาร

ตัวอย่างมาศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อปกติที่ไม่ติดเชื้อตัวอย่างเข้าได้
ผิวหนังเมื่อครบ 40 และ 61 วัน

2.9.2 ศึกษาอาการไข้ (pyrogenicity) และการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักตัวของ หนูทดลองหลังการฉีดสารละลายโคโคซาน

หลังจากทำการฉีดสารละลายจากในข้อ 2.9.1 สังเกตอาการ วัดอุณหภูมิ
ร่างกายทาง rectum ด้วยเทอร์โมมิเตอร์ ซึ่งน้ำหนักหลังทำการทดลองเป็นเวลาต่าง ๆ กัน
0, 6, 12, 24 ชั่วโมง และวัดทุก 2 วัน เป็นเวลา 61 วัน นำผลที่ได้มาเปรียบเทียบกับ
อุณหภูมิร่างกายของหนูปกติ



รูปที่ 9 แสดงการฉีดสารละลายตัวอย่างเข้าใต้ผิวหนัง (subcutaneous) เพื่อศึกษา
การทำให้ระคายเคืองใต้ผิวหนัง

3. ผลและวิจารณ์

3.1 การสกัดโคตินและโคโตซานจากเปลือกกุ้งและกระดองปลาหมึก

ตารางที่ 2 แสดงผลการเตรียมโคตินและโคโตซานจากเปลือกกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) เปรียบเทียบกับกระดองปลาหมึกกล้วย (*Loligo formosana*) พบว่าโคตินที่สกัดจากเปลือกกุ้งกุลาดำและกระดองปลาหมึกมีปริมาณเท่ากับ 22.18 และ 37.31% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบปริมาณโคตินที่ได้จากเปลือกกุ้งกุลาดำ ซึ่งรายงานโดย Bengakul และ Sophanodora (1993) ได้โคติน 37% สำหรับปริมาณโคตินจากกระดองปลาหมึกมีค่าใกล้เคียงกับรายงานของ Sornprasit (1997) สามารถสกัดได้ 36.55%

โคโตซานที่สกัดได้จากเปลือกกุ้งกุลาดำได้ผลผลิตน้อยกว่าจากกระดองปลาหมึก ผลผลิตที่ได้เท่ากับ 17.35 และ 29.83% ตามลำดับ จากรายงานของ Sornprasit (1997) สามารถสกัดโคโตซานจากกระดองปลาหมึกโดยวิธีการเดียวกับการทดลองนี้ แต่ต่างกันที่ใช้เวลาในการกำจัดหมู่อะซิติก 5 ชั่วโมง ได้ผลผลิต 27% โดยเทียบกับน้ำหนักกระดองปลาหมึกอบแห้ง ผลผลิตของโคตินและโคโตซานที่ได้มีความแตกต่างกันทั้งนี้ เนื่องจากความแตกต่างของวัตถุดิบ และวิธีการในการผลิต

ตารางที่ 2 ผลผลิตจากการสกัดโคตินและโคโตซานจากกระดองปลาหมึกกล้วย (*L. formosana*) และจากเปลือกกุ้งกุลาดำ (*P. monodon*)

ชนิดของตัวอย่าง	ปริมาณ (%)		
	โคติน	โคโตซาน ¹	โคโตซาน ²
กระดองปลาหมึกกล้วย	37.31	29.83	79.96
เปลือกกุ้งกุลาดำ	22.18	17.35	78.23

โคโตซาน¹, คำนวณเทียบกับน้ำหนักแห้งของกระดองปลาหมึกอบและเปลือกกุ้งอบ

โคโตซาน², คำนวณเทียบกับน้ำหนักแห้งของโคติน

3.2 ส่วนประกอบและคุณสมบัติของเปลือกกุ้งกุลาดำ กระจกปลาทูมิก โคตินและโคโตซาน

3.2.1 ปริมาณไนโตรเจน

เปลือกกุ้งและกระจกปลาทูมิกบดที่นำมาใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับการสกัดโคตินและโคโตซานในที่มีส่วนประกอบของไนโตรเจน 7.77 และ 12.64% ตามลำดับ และจากโคตินที่สกัดได้จากเปลือกกุ้งและกระจกปลาทูมิก 6.48 และ 6.49% ตามลำดับ ส่วนที่ได้จากโคโตซานเท่ากับ 8.09 และ 8.04% ตามลำดับ (ตารางที่ 3) เมื่อเปรียบเทียบกับ Sornprasit (1997) ให้ผลสอดคล้องกันโดยพบว่าในกระจกปลาทูมิกมีไนโตรเจนอยู่ 11.80% ส่วนในโคตินมีอยู่ 6.23% และจากโคโตซานมี 7.88% ซึ่งปริมาณไนโตรเจนในโคตินบริสุทธิ์ตามทฤษฎีเป็น 6.9% (Kandaswamy, 1978) ทั้งนี้ในขั้นตอนการกำจัดโปรตีนก็ทำให้ปริมาณไนโตรเจนในตัวอย่างลดลงเห็นได้ชัดเจน เมื่อเปรียบเทียบปริมาณของไนโตรเจนของโคตินจากกระจกปลาทูมิกที่ผ่านการกำจัดโปรตีนแล้วมีค่าน้อยกว่าจากที่ได้จากกระจกปลาทูมิกประมาณ 2 เท่า

ตารางที่ 3 ปริมาณไนโตรเจนในเปลือกกุ้งและกระจกปลาทูมิกซึ่งเป็นวัตถุดิบเริ่มต้นในโคตินและโคโตซานที่เตรียมในห้องปฏิบัติการ ผลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm S.E. (จากการทดลอง 3 ซ้ำ)

ตัวอย่าง	ปริมาณไนโตรเจน (%)
เปลือกกุ้งกุลาดำ	7.77 \pm 0.11
โคตินจากเปลือกกุ้งกุลาดำ	6.48 \pm 0.08
โคโตซานจากเปลือกกุ้งกุลาดำ	8.09 \pm 0.05
กระจกปลาทูมิกกล้วย	12.64 \pm 0.26
โคตินจากกระจกปลาทูมิกกล้วย	6.49 \pm 0.09
โคโตซานจากกระจกปลาทูมิกกล้วย	8.04 \pm 0.02

3.2.2 ปริมาณเถ้า (Ash)

ตารางที่ 4 แสดงถึงปริมาณเถ้าที่พบจากเปลือกกุ้งบดมีค่าสูงสุด (23.58%) ส่วนโคโตซานและโคตินจากเปลือกกุ้งมีค่ารองลงมาคือ 0.46 และ 0.26% ตามลำดับ ทั้งนี้เนื่องจากเปลือกกุ้งมีแคลเซียมคาร์บอเนตเป็นองค์ประกอบหลักของสารอนินทรีย์ จึง

ทำให้ปริมาณเถ้าที่พบมีค่าสูง และเมื่อนำเปลือกกุ้งมาทำการกำจัดแร่ธาตุ ในกระบวนการเตรียมโคตินจึงทำให้ได้โคตินที่มีปริมาณเถ้าลดลง

ส่วนโคโตซานจากกระดองปลาหมึกมีปริมาณเถ้าสูงกว่าจากกระดองปลาหมึกบดและโคติน ปริมาณเถ้าที่พบในกระดองปลาหมึกบดและโคตินจากกระดองปลาหมึกมีค่าไม่แตกต่างกัน แต่ยังมีค่าน้อยกว่าจากเปลือกกุ้งบด ในกระดองปลาหมึกบดปริมาณเถ้ามีน้อยแสดงว่ามีแคลเซียมคาร์บอเนตเป็นองค์ประกอบอยู่น้อยมากดังนั้นขั้นตอนการเตรียมโคตินจึงไม่จำเป็นต้องทำการกำจัดแร่ธาตุ เมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาของ Sornprasit (1997) รายงานว่าพบปริมาณเถ้าของกระดองปลาหมึกบด 0.03-0.04% และไม่พบในโคตินและโคโตซาน ส่วนจากรายงานของ Bough *et al.* (1978) กล่าวว่าในเปลือกกุ้งที่ผ่านการกำจัดแร่ธาตุแล้วมีปริมาณเถ้า 0.62-0.75%

ตารางที่ 4 ปริมาณเถ้าที่ได้จากตัวอย่างชนิดต่าง ๆ ผลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm S.E.
(จากการทดลอง 3 ซ้ำ)

ตัวอย่าง	ปริมาณเถ้าเฉลี่ย (%)
เปลือกกุ้งกุลาดำบด	23.58 \pm 0.03
โคตินจากเปลือกกุ้งกุลาดำ	0.26 \pm 0.00
โคโตซานจากเปลือกกุ้งกุลาดำ	0.46 \pm 0.06
กระดองปลาหมึกกล้วยบด	0.10 \pm 0.00
โคตินจากกระดองปลาหมึกกล้วย	0.10 \pm 0.01
โคโตซานจากกระดองปลาหมึกกล้วย	0.17 \pm 0.18

3.2.3 น้ำหนักโมเลกุลและระดับการกำจัดหมู่อะซิติก (degree of deacetylation) ของโคโตซาน

ตารางที่ 5 แสดงน้ำหนักโมเลกุลของตัวอย่างโคโตซานที่วิเคราะห์จากการวัดความหนืด (viscoscopic method) พบว่าโคโตซานจากเปลือกกุ้งและกระดองปลาหมึกมีน้ำหนักโมเลกุล 2.69×10^6 และ 6.35×10^6 ดาลตัน ตามลำดับ เมื่อเทียบกับการทดลองของ Sornprasit (1997) ที่รายงานว่าน้ำหนักโมเลกุลของโคโตซานจากกระดองปลาหมึก 9.69×10^6 ดาลตัน ซึ่งได้ค่ามากกว่าการทดลองนี้ ส่วนการทดลองของ Bough *et al.* (1978) ทำการกำจัดหมู่อะซิติกโคตินจากเปลือกกุ้งโดยใช้ด่างเข้มข้น 50% NaOH

ที่อุณหภูมิ 145-150 °C เป็นเวลา 5 และ 15 นาที ภายใต้บรรยากาศก๊าซไนโตรเจน ได้น้ำหนักโมเลกุล 1.54×10^6 ดาลตัน และ 1.036×10^6 ดาลตัน ตามลำดับ

จากการนำโคโตซานมาวิเคราะห์ระดับการกำจัดหมู่อะซิติกพบว่าโคโตซานจากเปลือกกุ้งมีระดับการกำจัดหมู่อะซิติก 92.24% ส่วนโคโตซานจากกระดองปลาหมึกมีค่า 73.09% ผลที่ได้มีความขัดแย้งกับผลของ Kurita *et al.* (1993) ที่กล่าวว่าโครงสร้างโคตินแบบเบต้า (เช่นจากกระดองปลาหมึก) จะถูกทำลายได้ง่ายกว่าแบบอัลฟา (เช่นจากเปลือกกุ้ง) จากการที่โคโตซานจากเปลือกกุ้งมีค่าของการกำจัดหมู่อะซิติกมากกว่าโคโตซานจากกระดองปลาหมึกเนื่องจากเวลาในการกำจัดหมู่อะซิติกของโคตินจากเปลือกกุ้งมีระยะเวลาที่นานกว่าโคตินจากกระดองปลาหมึก จากการศึกษาของ Wu and Bough (1978) ทำการกำจัดหมู่อะซิติกจากโคตินโดยใช้ 50% NaOH พบว่าเมื่อเวลาเพิ่มขึ้นเปอร์เซ็นต์ของการกำจัดหมู่อะซิติกมีค่าเพิ่มขึ้นและมีการเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงแรกของการทำงาน หลังจากนั้นอัตราการเพิ่มจะลดลงเมื่อเวลาเพิ่มขึ้น และมีข้อจำกัดของการกำจัดหมู่อะซิติกคือเมื่อเวลานานเกินไป และอุณหภูมิสูงเกินไปจะทำให้สีของโคโตซานเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล เมื่อเปรียบเทียบกับการทำงานภายใต้วิธีการและเวลาเดียวกันกับ Sornprasit (1997) พบว่าค่าของการกำจัดหมู่อะซิติกของโคโตซานจากกระดองปลาหมึกมีค่าเท่ากับ 90.15%

ตารางที่ 5 น้ำหนักโมเลกุล และระดับการกำจัดหมู่อะซิติกของโคโตซานที่เตรียมจากกระดองปลาหมึกและเปลือกกุ้งกุลาดำ ผลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm S.E. (การหาน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ, การหาระดับการกำจัดหมู่อะซิติกทำการทดลอง 5 ซ้ำ)

ตัวอย่าง	Intrinsic viscosity (dl/gm)	น้ำหนักโมเลกุล (ดาลตัน $\times 10^6$)	ระดับการกำจัดหมู่อะซิติก (%)
โคโตซานจากกระดอง ปลาหมึกกล้วย	60.33 \pm 2.16	6.35 \pm 0.32	73.10 \pm 0.80
โคโตซานจาก เปลือกกุ้งกุลาดำ	32.00 \pm 4.95	2.69 \pm 0.48	92.24 \pm 0.19

3.2.4 ความชื้น (moisture)

จากการทดลองสามารถหาความชื้นที่มีอยู่ในเปลือกกุ้งบด ไคตินและไคโตซานจากเปลือกกุ้ง กระดองปลาหมึกบด ไคตินและไคโตซานจากกระดองปลาหมึก ดังแสดงในตารางที่ 6 พบว่าไคติน จากกระดองปลาหมึกมีความชื้นสูงสุดเป็น 10.65% เมื่อเทียบกับตัวอย่างต่าง ๆ

ตารางที่ 6 ปริมาณความชื้นจากตัวอย่างชนิดต่าง ๆ เป็นค่าเฉลี่ย \pm S.E.
(จากการทดลองตัวอย่างละ 4 ซ้ำ)

ตัวอย่าง	ความชื้น (%)
เปลือกกุ้งกุลาดำ	7.37 \pm 0.03
ไคตินจากเปลือกกุ้งกุลาดำ	5.15 \pm 0.04
ไคโตซานจากเปลือกกุ้งกุลาดำ	7.28 \pm 0.05
กระดองปลาหมึกกล้วย	5.78 \pm 0.11
ไคตินจากกระดองปลาหมึกกล้วย	10.65 \pm 0.15
ไคโตซานจากกระดองปลาหมึกกล้วย	7.52 \pm 0.07

3.2.5 การดูดความชื้น (moisture adsorption)

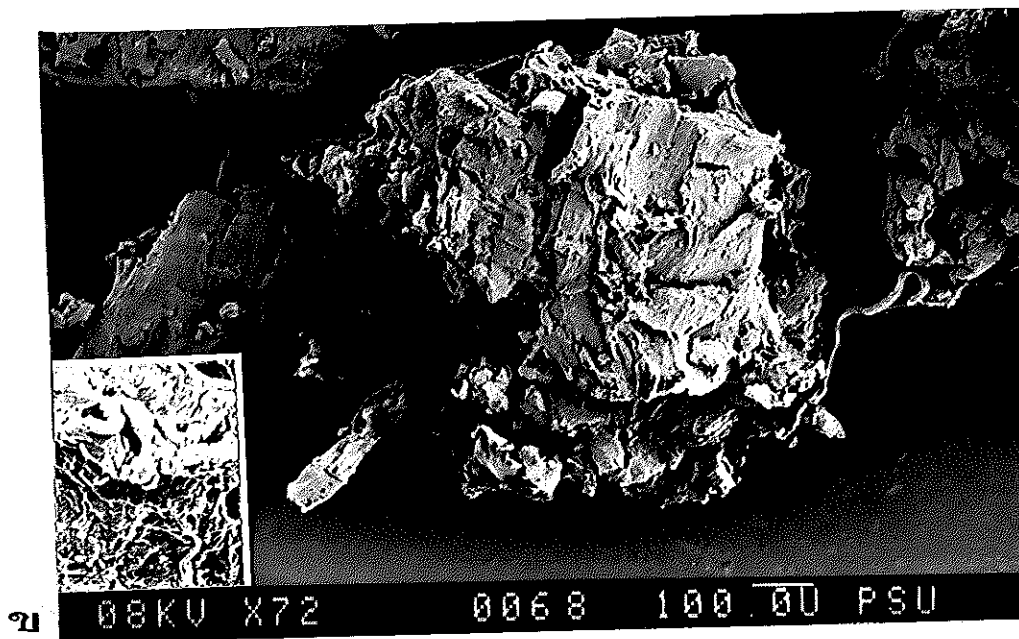
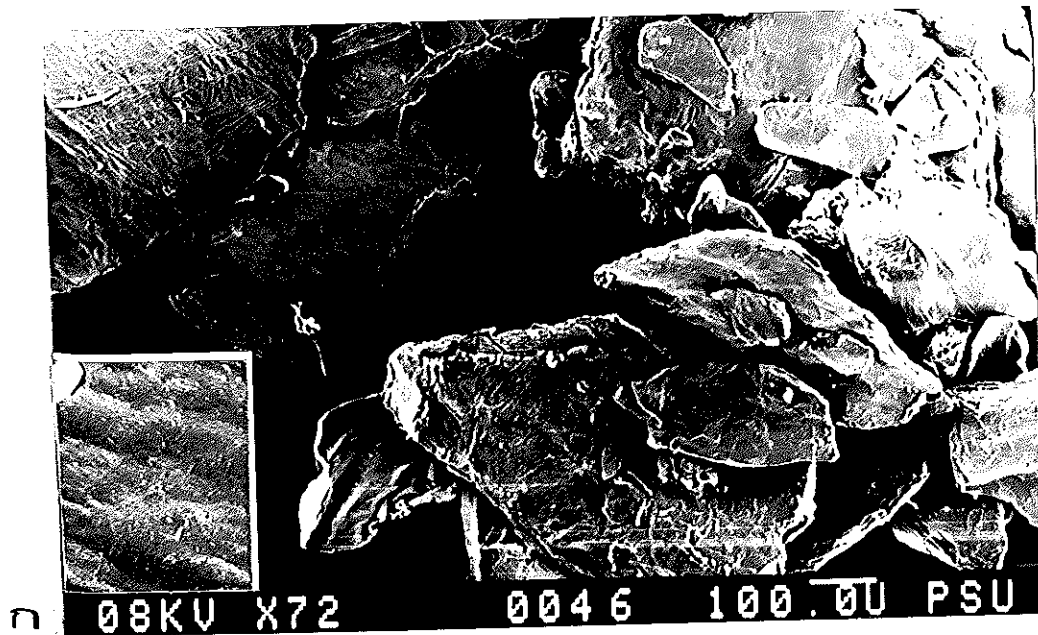
เมื่อนำตัวอย่างเปลือกกุ้งบด ไคตินและไคโตซานจากเปลือกกุ้ง กระดองปลาหมึกบด ไคตินและไคโตซานจากกระดองปลาหมึกที่ผ่านการอบไล่ความชื้นแล้วเปิดวางไว้ที่อุณหภูมิห้องจนมีน้ำหนักคงที่ พบว่าอัตราการดูดความชื้นเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในระยะสองวันแรกและมีอัตราลดลงเมื่อเวลาเพิ่มขึ้น และน้ำหนักเริ่มคงที่หลังจาก 10 วัน (ตารางที่ 7) ทั้งนี้ปัจจัยที่มีผลต่อการดูดความชื้นของสารตัวอย่างก็คือ ความชื้นสัมพัทธ์ที่เปลี่ยนแปลง Kurita *et al.* (1993) ทำการศึกษาการดูดความชื้นของไคตินและไคโตซานจากเปลือกกุ้งและจากกระดองปลาหมึกแต่เป็นคนละชนิดกันคือ *Ommastrephes bartrami* ภายใต้บรรยากาศที่มีความชื้นสัมพัทธ์ 93% อุณหภูมิ 25 °C หลังจาก 8 วัน ย้ายตัวอย่างดังกล่าวไปอยู่ภายใต้บรรยากาศที่มีความชื้นสัมพัทธ์ 32% พบว่าเมื่อความชื้นสัมพัทธ์ลดลงมีผลทำให้การดูดความชื้นของทุกตัวอย่างลดลง ไคโตซานจากเปลือกกุ้งดูดความชื้นได้สูงกว่าไคติน ในทางตรงกันข้ามไคตินจากกระดองปลาหมึกดูดความชื้นได้สูงกว่าไคโตซาน โดยมีเหตุผลว่าเนื่องมาจากมีความแตกต่างกันของรูปร่างของตัวอย่าง

โคตินจากกระดองปลาหมึกมีความนุ่มเป็นปุย ในขณะที่โคโตซานมีลักษณะเป็นก้อนแข็งมีความแน่น เมื่อเปรียบเทียบระหว่างโคตินจากเปลือกกุ้งกับโคตินจากกระดองปลาหมึกพบว่าโคตินจากกระดองปลาหมึกมีการดูดความชื้นได้สูงกว่าโคตินจากเปลือกกุ้ง แต่ผลที่ได้ต่างจากการทดลองนี้คือ โคตินจากเปลือกกุ้งสามารถดูดความชื้นได้สูงกว่าโคตินจากกระดองปลาหมึก ส่วนโคโตซานจากกระดองปลาหมึกสามารถดูดความชื้นได้สูงกว่าโคโตซานจากเปลือกกุ้งซึ่งผลสอดคล้องกันกับการศึกษาของ Kurita *et al.* (1993) ดังนั้นจึงต้องนำผงโคโตซานจากเปลือกกุ้งและกระดองปลาหมึกไปดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดต่อไป

ตารางที่ 7 ปริมาณความชื้นที่สามารถดูดยึดไว้ได้ ผลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm S.E. จากการทดลองตัวอย่างละ 4 ซ้ำ

ตัวอย่าง	ความชื้นที่ดูดซับไว้หลังอบ (%)			
	1 วัน	2 วัน	5 วัน	10 วัน
เปลือกกุ้งกุลาดำ	6.15 \pm 0.16	10.54 \pm 0.46	26.85 \pm 0.39	26.79 \pm 0.40
โคตินจากเปลือกกุ้งกุลาดำ	57.73 \pm 0.73	59.47 \pm 0.74	78.53 \pm 0.59	79.31 \pm 0.84
โคโตซานจากเปลือกกุ้งกุลาดำ	29.01 \pm 1.80	37.45 \pm 2.00	53.03 \pm 2.59	57.24 \pm 2.29
กระดองปลาหมึกกล้วย	56.99 \pm 0.94	73.09 \pm 1.21	118.75 \pm 2.78	127.47 \pm 2.22
โคตินจากกระดองปลาหมึกกล้วย	9.78 \pm 0.69	23.12 \pm 0.80	44.45 \pm 1.08	46.63 \pm 1.03
โคโตซานจากกระดองปลาหมึกกล้วย	44.47 \pm 1.96	70.14 \pm 1.32	96.58 \pm 1.96	101.40 \pm 1.48

จากรูปที่ 10 เปรียบเทียบลักษณะพื้นที่ผิวของผงโคโตซานจากเปลือกกุ้งและกระดองปลาหมึกภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด จะเห็นว่าผงโคโตซานจากเปลือกกุ้งมีลักษณะเป็นแผ่นที่มีขนาดแตกต่างกันและเมื่อเพิ่มกำลังขยายสูงขึ้นพบว่ามีพื้นที่ผิวส่วนใหญ่เรียบ แต่เมื่อเปรียบเทียบกับผงโคโตซานจากกระดองปลาหมึกจะเห็นว่า มีลักษณะเป็นกลุ่มก้อน และเมื่อเพิ่มกำลังขยายสูงขึ้นพบว่ามีพื้นผิวขรุขระมากกว่าผงโคโตซานจากเปลือกกุ้ง จึงทำให้มีความสามารถในการดูดความชื้นไว้ได้สูงกว่าผงโคโตซานจากเปลือกกุ้ง ซึ่งสอดคล้องกับผลดังแสดงในตารางที่ 7



- รูปที่ 10 เปรียบเทียบลักษณะพื้นผิวของผงไคโตซานภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)
- ก. ผงไคโตซานจากเปลือกกุ้ง (X72), ภาพเล็กมุมซ้ายล่าง : พื้นผิวที่กำลังขยายสูง (X860)
- ข. ผงไคโตซานจากกระดองปลาหมึก (X72), ภาพเล็กมุมซ้ายล่าง : พื้นผิวที่กำลังขยายสูง (X860)

3.2.6 การละลาย (solubility)

ผลการศึกษาความสามารถในการละลายในกรดอะซิติกเข้มข้น 1% พบว่าโคโตซานจากกระดองปลาหมึกละลายได้สูงสุด 10 มก./มล. ในขณะที่โคโตซานจากเปลือกกุ้งสามารถละลายได้สูงสุด 25 มก./มล. ทั้งนี้เนื่องมาจากโคโตซานจากกระดองปลาหมึกมีความยาวของสายโซ่ที่ยาวกว่าโคโตซานจากเปลือกกุ้ง Muzzarelli และ Jeuniaux (1976) พบว่าการละลายเพิ่มขึ้นความยาวของสายโซ่ยิ่งสั้นลง ซึ่งจากการศึกษาการละลายของโคโตซานนี้เพื่อนำไปใช้ในการเตรียมสปีนจ์โคโตซานในการศึกษาต่อไป

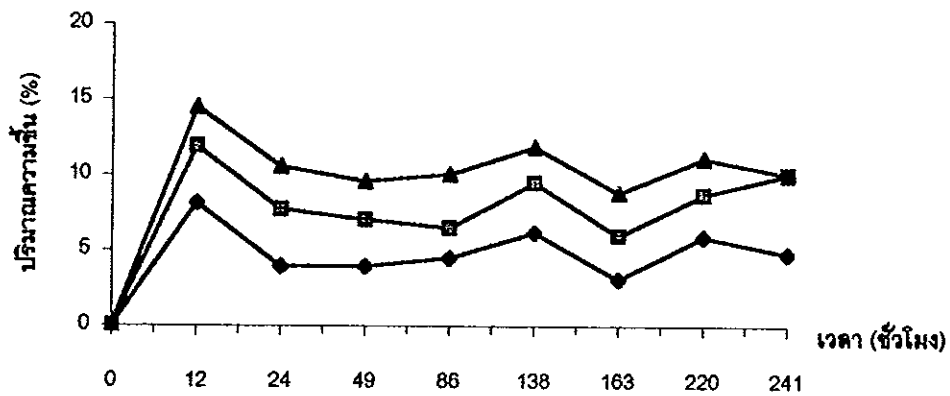
3.3 การทดสอบคุณสมบัติทางเคมีและฟิสิกส์ของแผ่นสปีนจ์โคโตซาน

หลักจากการเตรียมสปีนจ์โคโตซานให้มีปริมาณของโคโตซานที่แตกต่างกัน แล้วนำไปทดสอบคุณสมบัติต่าง ๆ ได้แก่ ความชื้น การดูดความชื้น ลักษณะของพื้นผิวสปีนจ์เมื่อดูภายใต้กล้อง stereomicroscope และ SEM การละลาย ปริมาณโปรตอน การละลายของสปีนจ์ก่อนและหลังอบ และคุณลักษณะของสปีนจ์ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อได้ผลดังนี้

3.3.1 ความชื้นและการดูดซับความชื้นกลับของสปีนจ์

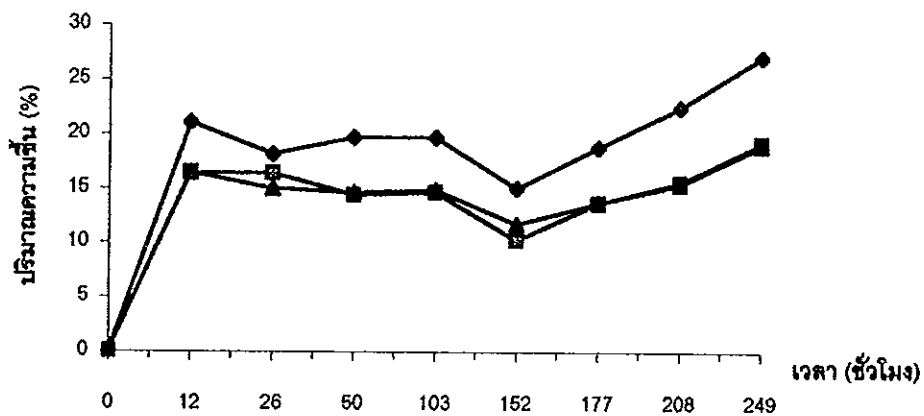
เมื่อนำสปีนจ์โคโตซานที่เตรียมได้มาวิเคราะห์หาความชื้นโดยการอบที่ 100 ± 5 °C จนน้ำหนักคงที่ พบว่าสปีนจ์จากกระดองปลาหมึกและเปลือกกุ้งที่เตรียมจากโคโตซานปริมาณมากขึ้นก็ยิ่งมีความชื้นสูงขึ้นด้วย โดยมีความชื้นอยู่ในช่วง 16-25% และ 36-46% ตามลำดับ

เมื่อนำตัวอย่างแผ่นสปีนจ์โคโตซานตั้งทิ้งไว้ในสภาพบรรยากาศของห้องปฏิบัติการ ผลความสามารถในการดูดความชื้นของสปีนจ์โคโตซานแสดงดังรูปที่ 11 พบว่ามีการดูดความชื้นกลับอย่างรวดเร็วในช่วง 2 ชั่วโมงแรก หลังจากนั้นดูเหมือนว่าจะระดับความชื้นในตัวอย่างไม่ขึ้นอยู่กับความชื้นสัมพัทธ์ในบรรยากาศ ผลการทดลองยังแสดงให้เห็นว่าปริมาณความชื้นที่ถูกดูดกลับขึ้นอยู่กับการเตรียมแผ่นสปีนจ์ซึ่งคุณสมบัตินี้เป็นไปในทิศทางเดียวกันทั้งตัวอย่างจากกระดองปลาหมึกและเปลือกกุ้ง และพบว่าสปีนจ์โคโตซานจากเปลือกกุ้งที่มีปริมาณโคโตซานน้อยกว่าสามารถดูดความชื้นได้มากกว่าสปีนจ์โคโตซานจากกระดองปลาหมึก ทั้งนี้อาจเนื่องจากลักษณะพื้นผิวของสปีนจ์หรือช่องว่างภายในสปีนจ์ที่มีการเรียงตัวแตกต่างกัน



ก. การดูความขึ้นกลับของสปีนจ์โคโตซานจากกระดองปลาหมึกที่เตรียมจากโคโตซานปริมาณต่างกัน

—◆— 75 มก. —■— 150 มก. —▲— 250 มก.



ข. การดูความขึ้นกลับของสปีนจ์โคโตซานจากเปลือกกุ้งที่เตรียมจากโคโตซานปริมาณต่างกัน

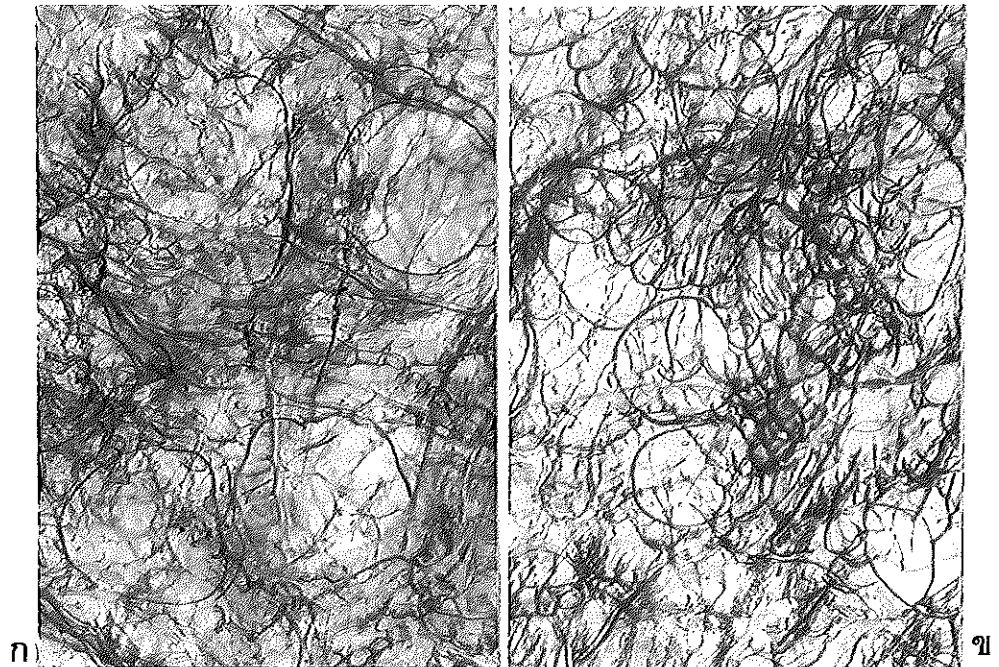
—◆— 187,5 มก. —■— 375 มก. —▲— 625 มก.

รูปที่ 11 การดูความขึ้นกลับของสปีนจ์โคโตซานหลังอบและวางไว้ที่อุณหภูมิห้องจนมีน้ำหนักคงที่

3.3.2 การศึกษาลักษณะพื้นผิวของสปันจ์โคโตซาน

3.3.2.1 การศึกษาภายใต้กล้อง stereomicroscope

รูปที่ 12 เปรียบเทียบลักษณะพื้นผิวของสปันจ์โคโตซานระหว่างสปันจ์โคโตซานจากเปลือกกุ้งและกระดองปลาหมึกจะเห็นว่ามึลักษณะเป็นเส้นใยอัดกันแน่นทำให้เกิดช่องว่างมากมาย อย่างไรก็ตามลักษณะดังกล่าวไม่มีความแตกต่างกันชัดเจนระหว่างโคโตซานจากทั้ง 2 แหล่งเมื่อสังเกตภายใต้กล้อง stereomicroscope



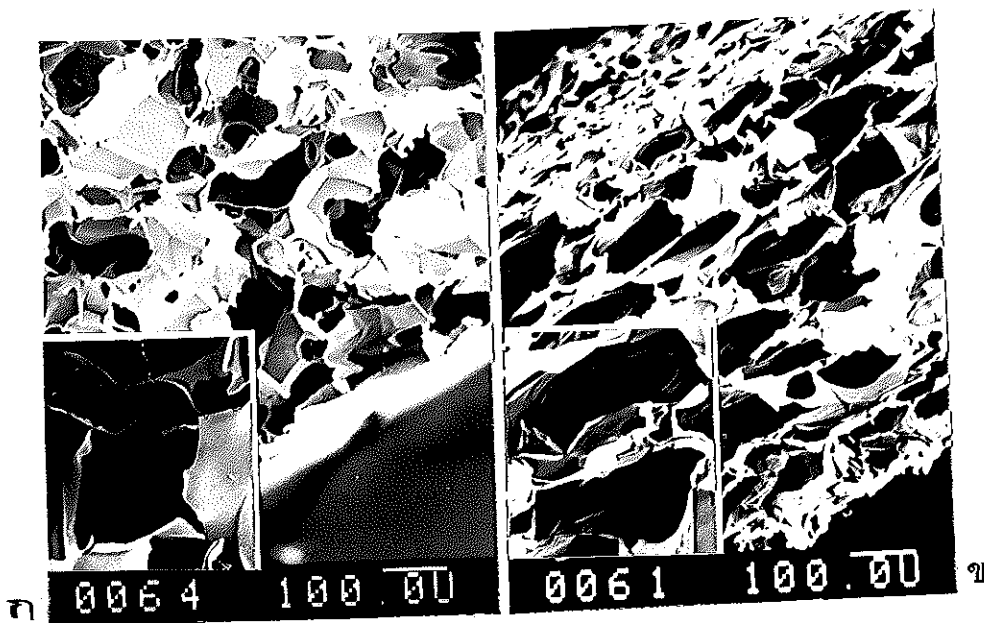
รูปที่ 12 ลักษณะพื้นผิวของสปันจ์โคโตซานภายใต้กล้อง stereomicroscope

ก. สปันจ์โคโตซานจากกระดองปลาหมึก (X7.5)

ข. สปันจ์โคโตซานจากเปลือกกุ้ง (X7.5)

3.3.2.2 การศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microccope : SEM)

ลักษณะพื้นผิวของสปันจ์โคโคซานภาคตัดขวางจากเปลือกกุ้งและ
กระดองปลาหมึกเมื่อศึกษาภายใต้ SEM แสดงดังรูปที่ 13 ลักษณะของพื้นผิวและช่องว่าง
ภายในสปันจ์โคโคซานจากกระดองปลาหมึกมีความเป็นระเบียบและมีรูปแบบที่แน่นอนกว่า
สปันจ์จากเปลือกกุ้ง ทั้งนี้เนื่องจากโคโคซานจากเปลือกกุ้งมีโครงสร้างแบบแอลฟา (α)
ส่วนโคโคซานจากกระดองปลาหมึกมีโครงสร้างแบบเบต้า (β) จึงทำให้ภาพภาคตัดขวาง
ของสปันจ์โคโคซานทั้ง 2 ชนิดแตกต่างกัน ผลที่ได้สนับสนุนเรื่องคุณสมบัติการดูดความชื้น
ของสปันจ์โคโคซานที่สปันจ์โคโคซานจากเปลือกกุ้งมี การเรียงตัวที่ไม่เป็นระเบียบจึงช่วย
เพิ่มพื้นที่ผิวในการดูดความชื้นไว้ได้มากกว่าสปันจ์โคโคซานจากกระดองปลาหมึก



รูปที่ 13 ลักษณะพื้นผิวภาคตัดขวางของสปันจ์โคโคซานภายใต้กล้องจุลทรรศน์
อิเล็กตรอนแบบส่องกราด
ก. สปันจ์โคโคซานจากเปลือกกุ้ง (X72), ภาพเล็กมุมซ้ายล่าง : ภาพขยายของ
ช่องว่างภายในแผ่นสปันจ์ (X200)
ข. สปันจ์โคโคซานจากกระดองปลาหมึก (X72), ภาพเล็กมุมซ้ายล่าง :
ภาพขยายของช่องว่างภายในแผ่นสปันจ์ (X200)

3.3.3 การทดสอบการละลายของแผ่นสปินจ์โคโคซานในสารละลาย (aqueous solution)

ตารางที่ 8 แสดงผลการนำแผ่นสปินจ์โคโคซาน 4 มก. ไปละลายในสารละลาย (aqueous solution) ปริมาตร 1 มล. จะเห็นว่าแผ่นสปินจ์โคโคซานทั้งที่เตรียมจากเปลือกกุ้ง และกระดองปลาหมึกละลายได้ดีในสารละลาย 0.9% NaCl ในขณะที่ละลายได้เล็กน้อยใน 16 mM sodium phosphate (SP) pH 7.4 รวมทั้งสารละลาย buffer นี้ที่มี 0.9% NaCl

ตารางที่ 8 การละลายของสปินจ์โคโคซาน จากการทดลอง 2 ครั้ง

โคโคซานจาก	สารละลาย	ผลการละลาย
กระดองปลาหมึก	SP saline	+
	SP	+
	Saline	++++
เปลือกกุ้ง	SP saline	+
	SP	+
	Saline	++++

หมายเหตุ : + ละลายเล็กน้อย, ++ ละลายบางส่วน, +++ ละลายได้ส่วนใหญ่, +++++ ละลายหมด

SP saline = 16 mM sodium phosphate pH 7.4+0.9% NaCl,

SP = 16 mM sodium phosphate pH 7.4, Saline = 0.9% NaCl

3.3.4 การตรวจสอบความเป็นกรดของสปินจ์โคโคซาน

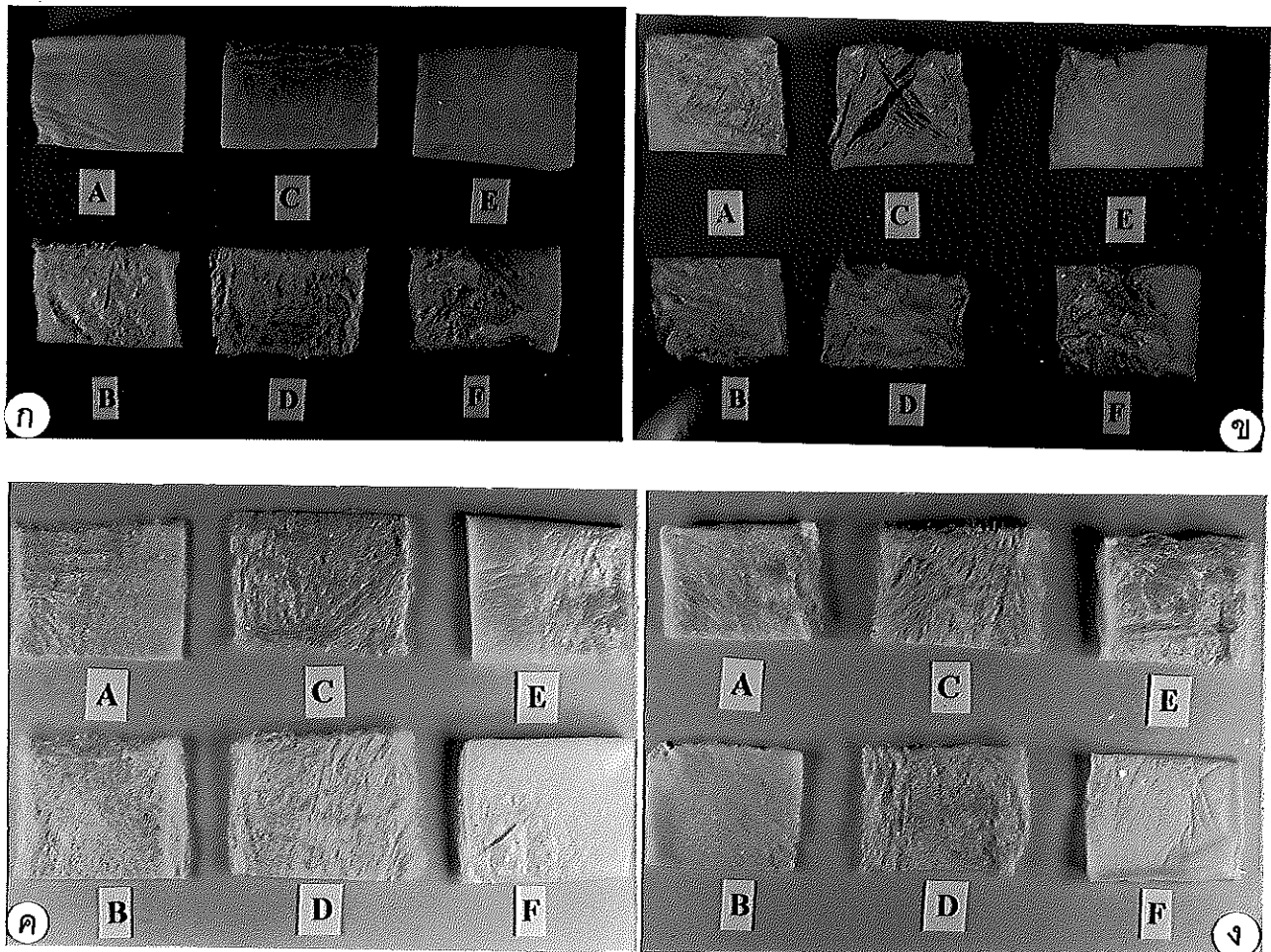
หลังจากการนำแผ่นสปินจ์โคโคซานที่เตรียมขึ้นไปอบแล้วทดสอบความเป็นกรดที่เหลืออยู่เปรียบเทียบกับสปินจ์ก่อนอบ ผลการทดสอบแสดงในตารางที่ 9 จะเห็นว่าสปินจ์โคโคซานทั้งจากเปลือกกุ้ง และกระดองปลาหมึกให้ผลไปในทางเดียวกันคือเมื่อปริมาณของโคโคซานเพิ่มขึ้น ความเข้มข้นของโปรตอนลดลงทั้งก่อนและหลังอบ แต่สปินจ์โคโคซานจากกระดองปลาหมึกหลังอบมีความเข้มข้นของโปรตอนน้อยกว่าก่อนอบ ดังนั้นการอบสปินจ์โคโคซานจึงเป็นวิธีที่ช่วยลดความเป็นกรดของสปินจ์ลงได้ก่อนที่จะนำไปใช้กับสัตว์ทดลอง ส่วนสปินจ์โคโคซานจากเปลือกกุ้งหลังอบมีปริมาณของโปรตอนมากกว่าก่อนอบทั้งนี้เนื่องมาจากโปรตอนที่เกาะอยู่กับหมู่เอมีน ($-NH_2$) เกาะแน่นกว่าในสปินจ์จากกระดองปลาหมึกในขณะที่ความชื้นลดลง

ตารางที่ 9 เปรียบเทียบปริมาณของโปรตอน (μmole) ในสารละลายสปีนจ์โคโตซาน จากเปลือกกุ้งและกระดองปลาหมึก 1 กรัม ก่อนและหลังอบ ที่ 100°C , 92 ชั่วโมง โดยใช้สปีนจ์ขนาด 2×2 ซม. ละลายในน้ำกลั่นที่ผ่านการกำจัดอิออน pH 7.0 ปริมาตร 10 มล. และ sonicate 1 นาที ผลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 2 ซ้ำ

โคโตซานจาก	ปริมาณโคโตซาน (มก.)	ปริมาณโปรตอน (μmole)	
		ก่อนอบ	หลังอบ
เปลือกกุ้ง	187.5	18.70	10.79
	312.5	9.60	17.10
	375.0	6.52	10.10
	437.5	5.59	9.45
	625.0	2.56	7.78
	875.0	1.58	3.78
กระดองปลาหมึก	75.0	61.00	37.10
	125.0	28.25	57.80
	150.0	35.40	18.10
	175.0	33.40	9.65
	250.0	18.10	7.46
	350.0	9.38	6.09

3.3.5 การละลายของสปีนจ์โคโตซานก่อนและหลังอบ

จากการทดสอบการละลายของสปีนจ์โคโตซานเปรียบเทียบกันระหว่างโคโตซานจากเปลือกกุ้งกับโคโตซานจากกระดองปลาหมึกทั้งก่อนและหลังอบ ซึ่งมีวัตถุประสงค์ในการนำสปีนจ์โคโตซานไปอบเพื่อการกำจัดกรดที่เป็นตัวทำละลายโคโตซานในขั้นตอนแรกที่ยังเหลืออยู่หลังจากทำ freeze dry จะเห็นได้ว่าโคโตซานหลังอบมีสีเหลืองเข้มขึ้น (รูปที่ 14) จากตารางที่ 10 พบว่าสปีนจ์โคโตซานจากกระดองปลาหมึกและจากเปลือกกุ้งก่อนอบที่ 100°C สามารถละลายในน้ำกลั่นที่ผ่านการกำจัดอิออนได้หมด แต่ไม่ละลายหลังจากอบเป็นเวลา 92 ชั่วโมง ทั้งนี้เพื่อจะนำสปีนจ์ไปใช้เป็นวัสดุปิดแผลที่ไม่ละลายน้ำ และการนำไปใช้เป็นวัสดุปิดแผลนั้นจะต้องผ่านการทำให้ปราศจากเชื้อมาก่อน ดังนั้นจึงทำการศึกษาต่อไปถึงวิธีการในการทำให้ปราศจากเชื้อ



รูปที่ 14 แสดงสปันจ์โคโคซานจากเปลือกกุ้งและกระดองปลาหมึกก่อนและหลังอบ

- ก. สปันจ์โคโคซานจากเปลือกกุ้งก่อนอบ
- ข. สปันจ์โคโคซานจากเปลือกกุ้งหลังอบ
- ค. สปันจ์โคโคซานจากกระดองปลาหมึกก่อนอบ
- ง. สปันจ์โคโคซานจากกระดองปลาหมึกหลังอบ

ภาพ ก, ข อักษร A: 187.5 มก., B: 375 มก., C: 312.5มก., D: 625 มก.,
E: 437.5 มก., F: 875 มก.

ภาพ ค อักษร A: 75 มก., B: 150 มก., C: 125 มก., D: 250 มก.,
E: 175 มก., F: 350 มก.

ภาพ ง อักษร A: 150 มก., B: 75 มก., C: 250 มก., D: 125 มก.,
E: 350 มก., F: 175 มก.

ตารางที่ 10 การละลายของสปริงโคโตซานจากเปลือกกุ้งและกระดองปลาหมึกก่อนอบ และหลังอบ ที่ 100 °C, 92 ชั่วโมง โดยใช้สปริงขนาด 2x2 ซม. ละลายใน น้ำกลั่นที่ผ่านการกำจัดอิออน pH 7.0 ปริมาตร 10 มล. และ sonicate 1 นาที ผลที่ได้จากการทดลอง 2 ซ้ำ

โคโตซานจาก	ปริมาณของโคโตซาน (มก.)	การละลายก่อนอบ	การละลายหลังอบ
เปลือกกุ้ง	187.5	++++	-
	312.5	++++	-
	375.0	++++	-
	437.5	++++	-
	625.0	++++	-
	875.0	++++	-
กระดองปลาหมึก	75.0	++++	-
	125.0	++++	-
	150.0	++++	-
	175.0	++++	-
	250.0	++++	-
	350.0	++++	-

หมายเหตุ : - ไม่ละลาย, + ละลายเล็กน้อย, ++ ละลายบางส่วน, +++ ละลายได้ส่วนใหญ่,
++++ ละลายหมด

3.3.6 คุณสมบัติของสปันจ์โคโคซานที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ

เมื่อนำสปันจ์โคโคซานจากเปลือกกุ้งและกระดองปลาหมึกไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว 15 นาที พบว่าสปันจ์เปลี่ยนจากสีขาวเป็นสีน้ำตาลไหม้ และเมื่อทดสอบการละลายในน้ำกลั่นที่ผ่านการกำจัดอิออนมี pH 7.0 นอกจากนั้น ยังพบว่าสปันจ์ที่เตรียมจากทั้งสองแหล่งจะไม่ละลายน้ำได้อีกต่อไป Rao และ Sharma (1997) ศึกษาการทำฟิล์มโคโคซานให้ปราศจากเชื้อ พบว่าวิธีการนึ่งฆ่าเชื้อเป็นวิธีที่เหมาะสมที่สุดเพราะยังคงรักษาค่า tensile strength ไว้ได้ใกล้เคียงค่าเดิม ซึ่งความชื้นหลังจากการนึ่งฆ่าเชื้อทำให้ฟิล์มมีความหนาเพิ่มขึ้น Chu และ Williams (1983) รายงานว่าการฉายรังสีแกมมาเพื่อฆ่าเชื้อทำให้ค่า tensile strength ของแผ่นฟิล์มโคโคซานลดลง ทั้งนี้เนื่องจากรังสีแกมมามีผลไปทำลายสายพันธะไกลโคซิดิก นอกจากนั้น การใช้ ethylene oxide และ glutaraldehyde ล้วนทำให้ค่า tensile strength ลดลงด้วยเช่นกัน

3.4 ผลการศึกษาประสิทธิภาพของสารละลายโคโคซานที่เตรียมจากโคโคซานในรูปสปันจ์ต่อการแข็งตัวของเลือดในสัตว์ทดลองและในหลอดทดลอง

3.4.1 เปรียบเทียบระยะเวลาการไหลของเลือด (Bleeding time) โดยใช้สารละลายโคโคซานที่เตรียมจากโคโคซานในรูปสปันจ์ในสัตว์ทดลอง

ตารางที่ 11 แสดงให้เห็นว่าเมื่อหยุดสารละลายโคโคซานทั้งจากกระดองปลาหมึกและเปลือกกุ้งลงบนแผลที่ tail vein ของหนูทดลองมีผลทำให้เลือดหยุดไหลออกจากแผลเร็วขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งหยุด 0.9% NaCl (ระยะเวลาการไหลของเลือด 0.71 ± 0.10 นาที) ทั้งนี้สารละลายโคโคซานจากเปลือกกุ้งทั้งที่ความเข้มข้น 4 และ 8 มก./มล. ทำให้เลือดหยุดไหลได้ในเวลาเท่ากันคือ 0.34 นาที (เร็วขึ้น 52.1% เมื่อเทียบกับชุดควบคุม) ซึ่งใกล้เคียงกับการใช้สารละลายโคโคซานจากกระดองปลาหมึกที่ความเข้มข้น 8 มก./มล. อย่างไรก็ตามผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าสารละลายโคโคซานจากเปลือกกุ้งมีคุณสมบัติส่งเสริมการแข็งตัวของเลือดได้เร็วกว่าจากกระดองปลาหมึก ทั้งนี้เนื่องจากสารละลายจากกระดองปลาหมึกที่ความเข้มข้นต่ำกว่า 8 มก./มล. มีแนวโน้มทำให้ระยะเวลาการไหลของเลือดนานขึ้น

ตารางที่ 11 เปรียบเทียบระยะเวลาการแข็งตัวของเลือดโดยการทดสอบระยะเวลาการไหลของเลือด (bleeding time) ในสัตว์ทดลองโดยใช้สารละลายโคโคซานที่เตรียมจากสปันจ์โคโคซานจากกระดองปลาหมึก และเปลือกกุ้งที่ความเข้มข้น 4 และ 8 มก./มล. ผลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm S.E. จากการทดลอง 13 ซ้ำ

	โคโคซานจากกระดองปลาหมึก		โคโคซานจากเปลือกกุ้ง	
	0.9% NaCl	4 มก./มล. 8 มก./มล.	4 มก./มล. 8 มก./มล.	
Bleeding time (นาที)	0.71 \pm 0.10	0.43 \pm 0.06 0.33 \pm 0.02	0.34 \pm 0.02 0.34 \pm 0.03	

จากการศึกษาเกี่ยวกับการห้ามเลือดโดยใช้โคโคซาน พบว่าความแตกต่างของตัวเลขอัตราเร่งการหยุดไหลของเลือดขึ้นอยู่กับปัจจัยดังนี้ คือ ชนิดของโคโคซาน แหล่งเทคนิคการผ่าตัด (ตำแหน่งแผล) และชนิดของสัตว์ทดลอง จากผลการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานของ Rao และ Sharma (1997) ซึ่งใช้สารละลายโคโคซานจากเปลือกกุ้งที่ละลายในกรดอะซิติกในมนุษย์และหนูแรท พบว่าสามารถลดระยะเวลาการไหลของเลือดในมนุษย์และหนูแรทลงได้ 60% และ 70% ตามลำดับ เช่นเดียวกับ Klokkevold *et al.* (1991) รายงานว่าโคโคซานจากเปลือกกุ้งในกรดอะซิติกสามารถลดระยะเวลาการไหลของเลือดในแผลผ่าตัดที่ล้มเหลว 32%

3.4.2 ผลการทดสอบระยะเวลาการแข็งตัวของเลือด (Blood clotting time)

โดยใช้สารละลายโคโคซานที่เตรียมจากโคโคซานในรูปสปันจ์ในหลอดทดลอง

3.4.2.1 การทดสอบ Blood clotting time โดยใช้ whole blood ของหนู

จากผลการทดลองดังตารางที่ 12 การแข็งตัวของเลือดเมื่อใช้สารละลายสปันจ์ โคโคซานทั้ง 2 ชนิด ที่ความเข้มข้น 4 มก./มล. ค่า WBC (whole blood clotting time) มีค่าไม่แตกต่างจากชุดควบคุม และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายสปันจ์โคโคซานจากกระดองปลาหมึกเป็น 8 มก./มล. ทำให้ค่าลดลงเป็น 2.83 นาที ซึ่งทำให้เลือดเกิดการแข็งตัวได้เร็วกว่าชุดควบคุมที่ไม่ใช้โคโคซาน Dutkiewicz *et al.* (1990) ทำการศึกษาโครงสร้างทางเคมีของโคโคซานและโคโคซานที่ทำการดัดแปลงต่อการแข็งตัวของเลือดพบว่าสิ่งที่มีอิทธิพลต่อการแข็งตัวของเลือด คือ ปริมาณของหมู่อะมิโนอิสระ ซึ่งสามารถทราบได้จากค่าของระดับการกำจัดหมู่อะซิติก โครงสร้างของโคโคซานที่มีหมู่อะมิโนอิสระมากกว่าคือมีสายของกลูโคซามีนยาวยิ่งทำให้การแข็งตัวของเลือดเกิดเร็วขึ้น

ตารางที่ 12 ผลการศึกษาการแข็งตัวของเลือดโดยใช้สารละลายสปีนจ์โคโตซาน

ผลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm S.D. จากการทดลอง 4 ซ้ำ

ชุดควบคุม	โคโตซานจากกระดองปลาหมึก		โคโตซานจากเปลือกกุ้ง
	4 มก./มล.	8 มก./มล.	4 มก./มล.
WBCT (นาที)	3.30 \pm 0.13	3.82 \pm 0.53	2.83 \pm 0.24

3.4.2.2 การทดสอบ whole blood clotting time (WBCT) โดยใช้เลือด

ที่เติมสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด

ผลการทดลองเติมสารละลายสปีนจ์โคโตซานจากทั้งกระดองปลาหมึกและเปลือกกุ้งลงในเลือดที่เติมสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดด้วย citrate phosphate dextrose (CPD) พบว่าเลือดไม่จับตัวกันเป็นลิ่มเหมือนกับการแข็งตัวของเลือดปกติแต่เมื่อนำไปสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าเม็ดเลือดแดงเกิดการเกาะกลุ่มกัน (hemagglutination) จากการศึกษาของ Rao และ Sharma (1997) รายงานว่าเมื่อเติมโคโตซานซึ่งละลายกรดอะซิติกลงใน whole blood ทำให้ค่า WBCT ลดลง 40% ของเลือดปกติ และเมื่อทดสอบกับเลือดที่เติม heparin เม็ดเลือดแดง (washed red blood cell) รวมทั้งเลือดที่กำจัดไฟบรินออก (defibrinated blood) ก็ให้ผลเหมือนกัน แต่ไม่มีผลกับ albumin, globulin และ เม็ดเลือดขาว ผลการทดลองเหล่านี้แสดงให้เห็นว่ากลไกการทำให้แข็งตัวด้วยโคโตซานไม่ขึ้นกับกลไกการแข็งตัวของเลือด (clotting cascade pathway) แต่เกิดขึ้นโดยการเกาะกลุ่มกันระหว่างเซลล์เม็ดเลือด

3.4.3 ผลการศึกษาการเกาะกลุ่มของเซลล์ต่าง ๆ ในเลือด (hemagglutination)

ด้วยโคโตซาน

ตารางที่ 13 แสดงปริมาณต่ำสุดของสารละลายโคโตซานจากกระดองปลาหมึกและเปลือกกุ้งที่ทำให้เกิดการเกาะกลุ่มกันของเม็ดเลือดแดง และ whole blood จากสัตว์ต่างชนิดกันคือ หนู วัว และกระต่าย โดยเปรียบเทียบระหว่างโคโตซานทั้งรูปผงที่ละลายใน 1% กรดอะซิติกและสปีนจ์ที่ละลายใน 0.9% NaCl ซึ่งดำเนินการโดยผสมตัวอย่างเลือด 50 ไมโครลิตร กับสารละลายโคโตซานที่ต้องการทดสอบปริมาตรเท่ากันในแต่ละหลุมของ titer plate

ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าปริมาณต่ำสุดของสารละลายโคโตซานจากเปลือกกุ้งในรูปผงทำให้เกิดการเกาะกลุ่มกันของเม็ดเลือดแดงจากหนูและวัวคือ 3.13 และ 0.83 ไมโครกรัม ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าสารละลายที่เตรียมจากรูปสปีนจ์คือ 1.56 และ 0.10

ไมโครกรัม ตามลำดับ อย่างไรก็ตามเมื่อนำสารละลายโคโคซานเหล่านี้มาทดสอบกับ whole blood กลับพบผลการทดลองที่ตรงกันข้ามและแตกต่างกันในเชิงปริมาณกับ เม็ดเลือดแดงของสัตว์ชนิดเดียวกันคือ ปริมาณต่ำสุดที่ทำให้เกิดการเกาะกลุ่มสำหรับเลือด หนูด้วยโคโคซานจากเปลือกกุ้งในรูปผงและสปันจ์คือ 0.20 และ 1.56 ไมโครกรัม ตามลำดับ และสำหรับเลือดวัวคือ 0.05 และ 0.20 ไมโครกรัม ตามลำดับ

เมื่อนำสารละลายโคโคซานจากกระดองปลาหมึกมาทดสอบกับเลือดหนูพบว่า ปริมาณต่ำสุดจากรูปผงที่ทำให้เกิดการเกาะกลุ่มกันของเม็ดเลือดแดงคือ 0.20 ไมโครกรัม ซึ่งต่ำกว่าจากรูปสปันจ์ (1.56 ไมโครกรัม) เป็นที่น่าสังเกตว่าการใช้โคโคซานจากกระดอง ปลาหมึกให้ผลการทดลองตรงกันข้ามกับเปลือกกุ้งสำหรับเม็ดเลือดแดงจากสัตว์ทดลอง ชนิดเดียวกัน แต่เมื่อทดสอบกับ whole blood พบว่าสารละลายโคโคซานจากกระดอง ปลาหมึกที่เตรียมจากทั้ง 2 รูป ให้ผลเท่ากันคือ 1.56 ไมโครกรัม อย่างไรก็ตาม เมื่อทดสอบกับเลือดวัวกลับพบว่าปริมาณต่ำสุดของสารละลายโคโคซานในรูปผงที่ทำให้ เกิดการเกาะกลุ่มกันของเม็ดเลือดแดงคือ 3.13 ไมโครกรัม ซึ่งสูงกว่าในรูปสปันจ์ (0.39 ไมโครกรัม) ในขณะที่เมื่อพิจารณาในเชิงปริมาณมีทิศทางตรงกันข้ามสำหรับ whole blood คือ 0.05 และ 0.20 ไมโครกรัม สำหรับโคโคซานในรูปผง และสปันจ์ ตามลำดับ

เป็นที่น่าสนใจว่าเมื่อนำสารละลายโคโคซานจากกระดองปลาหมึกและ เปลือกกุ้งในรูปสปันจ์มาทดสอบกับเลือดกระต่ายพบว่าโคโคซานจากเปลือกกุ้งต้องใช้ ปริมาณสูงมาก (25.0 ไมโครกรัม) จึงมีผลทำให้เกิดการเกาะกลุ่มกันของเม็ดเลือดแดงเมื่อ เปรียบเทียบกับกระดองปลาหมึก (0.30 ไมโครกรัม)

ผลการทดลองเหล่านี้นอกจากเป็นการยืนยันกลไกการเกาะกลุ่มของเลือดด้วย โคโคซานว่าไม่ผ่านกระบวนการแข็งตัวของเลือดปกติแล้วยังสามารถสรุปข้อมูลสำคัญได้อีก 2 ประการคือ ประการแรก ปัจจัยที่ทำให้เกิดการเกาะกลุ่มกันของเลือดนอกจากขึ้นอยู่กับ ชนิดของสัตว์ทดลองแล้ว แหล่งที่มา รูปแบบ รวมทั้งคุณสมบัติ (ขนาด และระดับการ กำจัดหมู่อะซิติล) ของโคโคซานที่นำมาใช้เตรียมสารละลายก็เป็นอิทธิพลสำคัญด้วย Rao และ sharma (1997) รายงานผลการทดสอบการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงจากสัตว์ชนิด ต่าง ๆ ด้วยสารละลายโคโคซานจากเปลือกกุ้งใน 2% กรดอะซิติกว่า หนูแรท หนูเม้าส์ แกะ ห่าน และกระต่ายต้องใช้ปริมาณ 3.12 ไมโครกรัม/หลุม ในขณะที่ปริมาณที่ต้องใช้ เพื่อให้เกิดการเกาะกลุ่มกันของเม็ดเลือดแดงของ สุนัข หนูตะเภา สุนัข ลิง และมนุษย์ เป็น 1.6 ไมโครกรัม/หลุม แต่ไม่สามารถนำข้อมูลมาเปรียบเทียบกับผลการทดลองนี้เนื่องจาก ไม่ได้บ่งปริมาณของเม็ดเลือดไว้ในรายงาน ประการที่สองเนื่องจากปริมาณต่ำสุดของ

โคโตซานทั้งสองแหล่งที่ทำให้เกิดการแข็งตัวของเม็ดเลือดแดง และ whole blood ใน สัตว์ชนิดเดียวกันมีความแตกต่างกันมาก จึงเป็นไปได้ว่านอกจากส่วนประกอบของเยื่อหุ้ม เซลล์ (cell membrane) แล้ว ส่วนประกอบอื่นใน plasma ก็อาจมีผลต่อการเกาะกลุ่ม ของเม็ดเลือดโดยผ่านโคโตซานซึ่งเป็นตัวกลางร่วมอยู่ด้วย

ตารางที่ 13 ผลการทดสอบการเกิดการเกาะกลุ่มของเซลล์ต่าง ๆ ในเลือดด้วย สารละลายโคโตซาน ผลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ

ตัวอย่างเลือด, 50 μ l	ปริมาณโคโตซาน (ไมโครกรัม)			
	ผงโคโตซานใน% กรดอะซิติก, 50 μ l		สปิงจ์โคโตซาน ใน 0.9%NaCl, 50 μ l	
	เปลือกกุ้ง	กระดองปลาหมึก	เปลือกกุ้ง	กระดองปลาหมึก
2% เม็ดเลือดแดง				
- หนู	3.13	0.20	1.56	1.56
- วัว	0.83	3.13	0.10	0.39
- กระต่าย	-	-	25.00	0.39
2% whole blood				
- หนู	0.20	1.56	1.56	1.56
- วัว	0.05	0.05	0.20	0.20

หมายเหตุ : - คือ ไม่ได้ทำการทดลอง

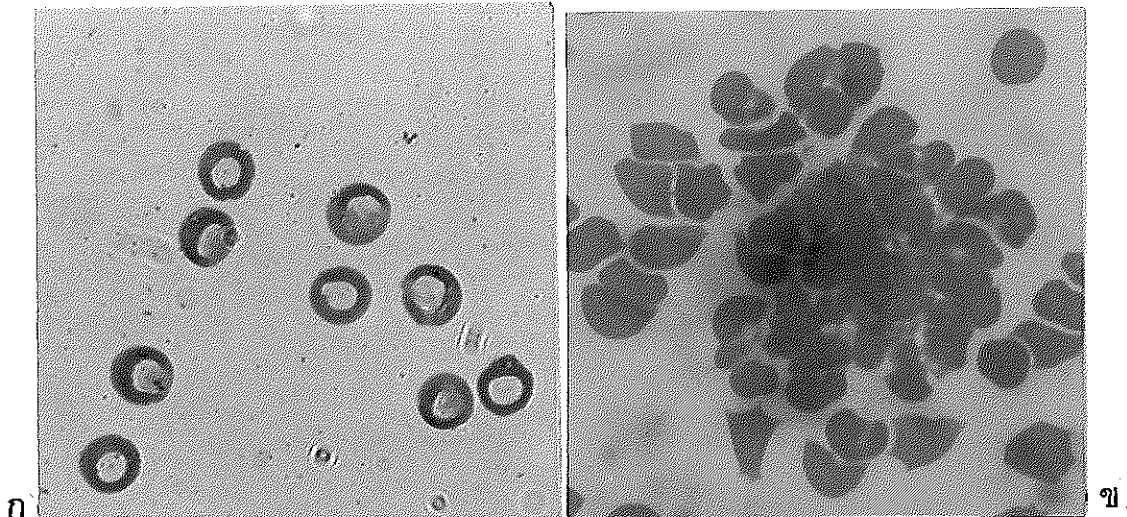
3.4.4 ผลการย้อมเซลล์ต่าง ๆ ในเลือดด้วย Wright' s stain

จากการนำเลือดหนูที่เติม CPD มาทำการแยกเซลล์ชนิดต่าง ๆ ออกเป็น 3 ส่วนคือ เม็ดเลือดแดง เม็ดเลือดขาว และเกล็ดเลือด (ดูวิธีแยกจากภาคผนวก) แล้วนำเซลล์ แต่ละชนิดมาทดสอบการเกาะกลุ่มกับสารละลายโคโตซานโดยการย้อมด้วย Wright' s stain พบว่าเซลล์เม็ดเลือดแดงก่อนเติมสารละลายโคโตซานมีลักษณะกลมรอบ ๆ เซลล์ ติดสีชมพูส่วนตรงกลางเป็นสีจาง (รูปที่ 15ก) แต่เมื่อนำเม็ดเลือดแดงมาเติมสารละลาย โคโตซานจะเกิดการเกาะกลุ่มกันทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงมีลักษณะรีและโค้งเว้าเปลี่ยน รูปร่างไป (รูปที่ 15ข)

เมื่อนำส่วนของเม็ดเลือดขาวก่อนการเติมสารละลายโคโตซานมาย้อมด้วย Wright' s stain พบว่ามีลักษณะสำคัญคือ นิวเคลียสติดสีน้ำเงินปนม่วง ขนาดของเซลล์ ใกล้เคียงกับเม็ดเลือดแดง เม็ดเลือดขาวจากตัวอย่างนี้ส่วนใหญ่เป็น lymphocyte ซึ่งมี นิวเคลียสใหญ่มีส่วนของไซโตพลาสซึมน้อย (รูปที่ 16ก)

รูปที่ 16ข แสดงเซลล์เม็ดเลือดขาวหลังเติมสารละลายโคโตซานพบว่าเซลล์มีการเรียงตัวกันอย่างกระจัดกระจาย จึงเป็นไปได้ว่าโคโตซานไม่ทำให้เกิดการเกาะกันของเม็ดเลือดขาว ซึ่งจะทดสอบยืนยันด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดต่อไป

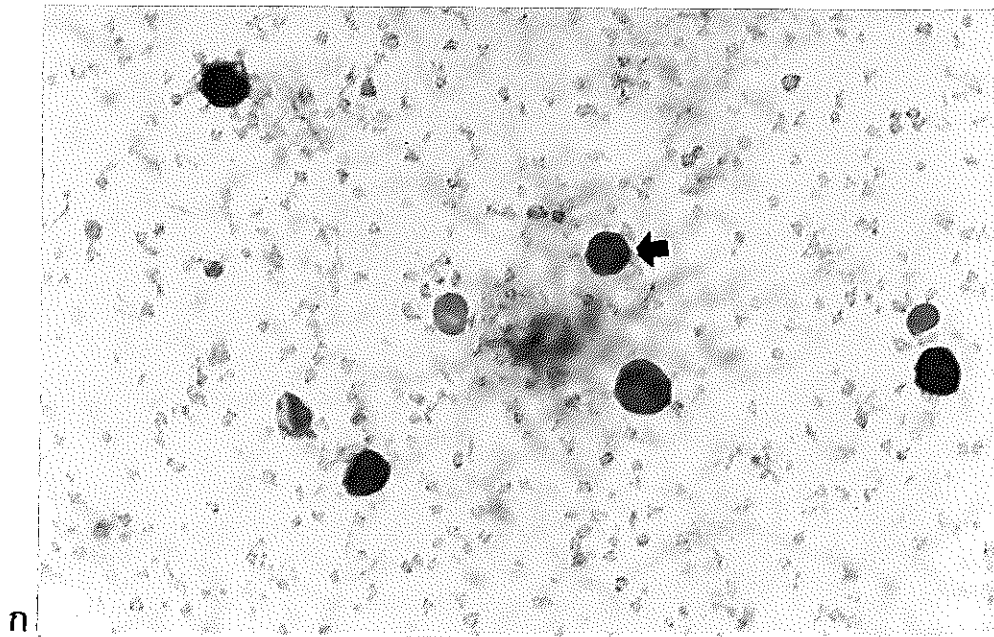
รูปที่ 17ก แสดงเกล็ดเลือดก่อนเติมสารละลายโคโตซานจากการย้อมเกล็ดเลือดด้วย Wright' s stain พบว่ารงควัตถุติดสีม่วงแดง และไซโตพลาสซึมติดสีฟ้า มีขนาด 2-4 ไมโครเมตร ซึ่งเล็กกว่าเม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาว ส่วนรูปที่ 17ข เป็นลักษณะของเกล็ดเลือดหลังเติมสารละลายโคโตซาน จะเห็นว่าเกล็ดเลือดส่วนใหญ่เกิดการเกาะกลุ่มหรือเรียงตัวอยู่ใกล้กันมาก เพื่อยืนยันผลการทดลองจึงนำตัวอย่างนี้ไปตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดต่อไป



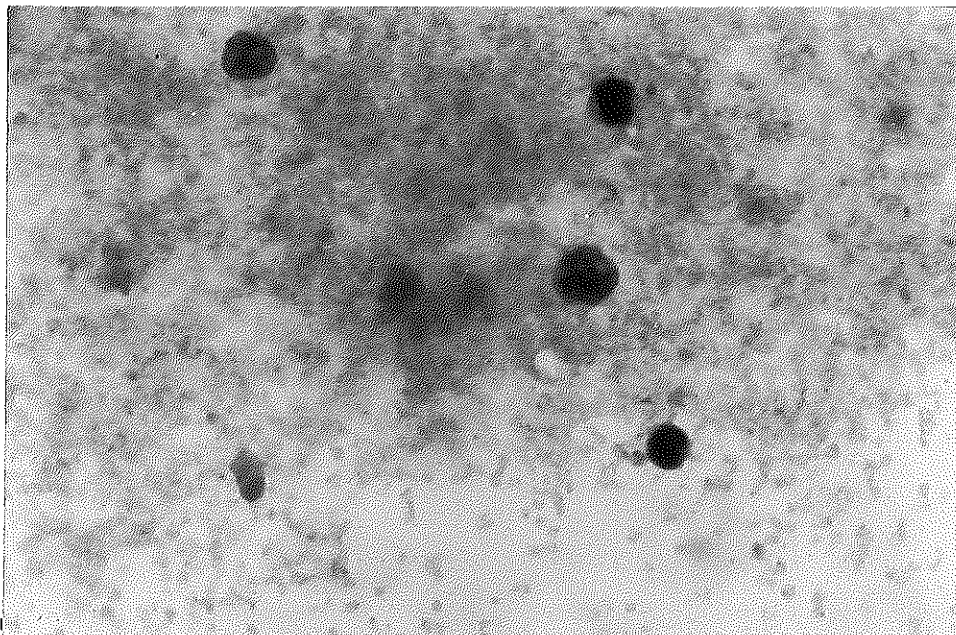
รูปที่ 15 แสดงลักษณะของเซลล์เม็ดเลือดแดงก่อนและหลังการเติมโคโตซานหลังจากย้อมด้วย Wright' s stain (X1000)

ก. เม็ดเลือดแดงก่อนเติมสารละลายโคโตซาน

ข. การเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงหลังเติมสารละลายโคโตซาน



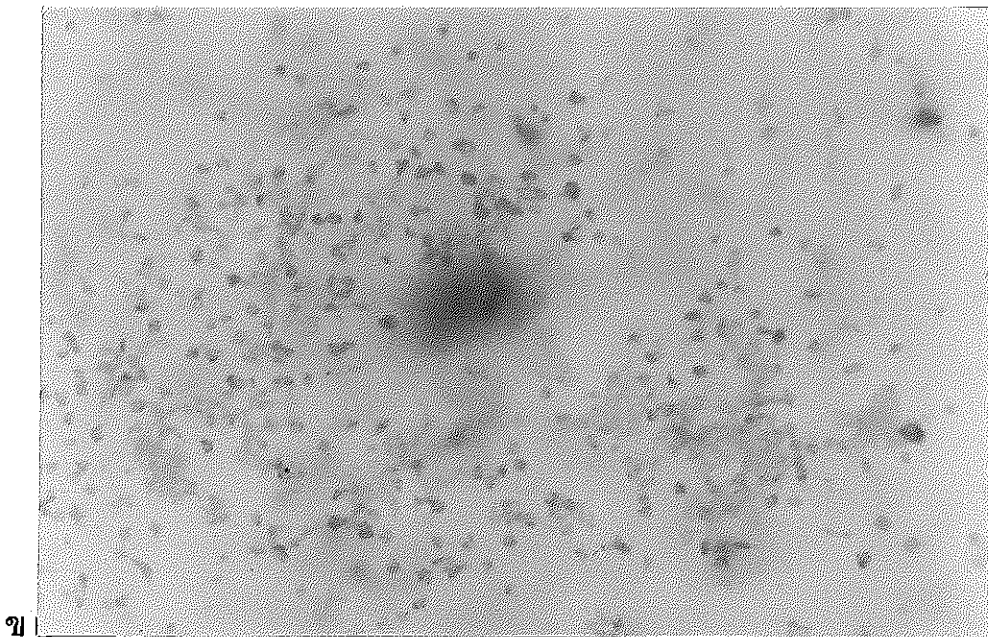
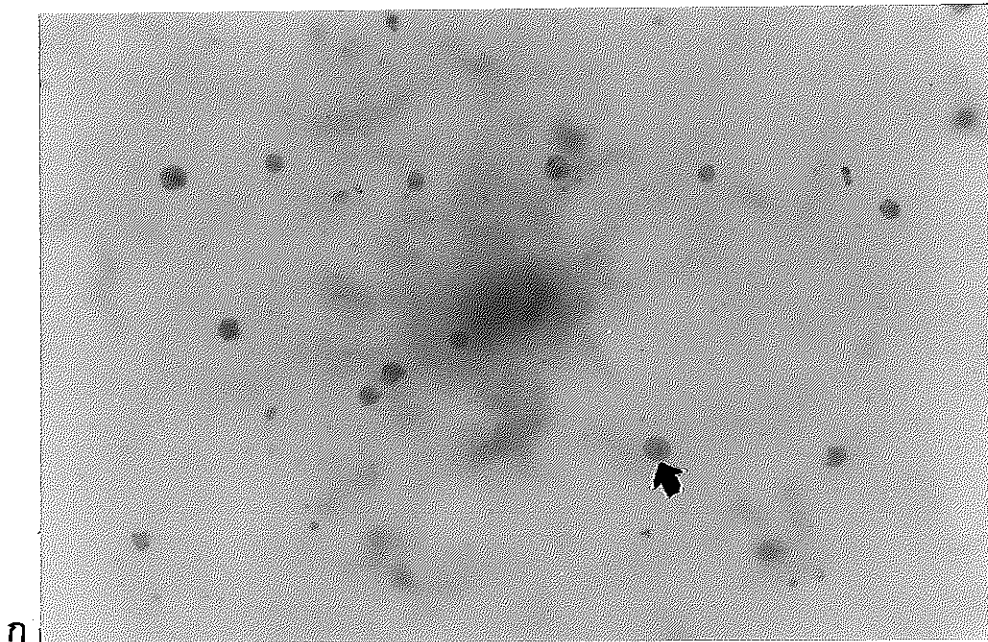
ก



ข

รูปที่ 16 แสดงลักษณะของเซลล์เม็ดเลือดขาวก่อนและหลังเติมสารละลายโคโตซาน
หลังจากย้อมด้วย Wright' s stain (X1000)

- ก. เม็ดเลือดขาวก่อนเติมสารละลายโคโตซาน (ลูกศรชี้)
- ข. เม็ดเลือดขาวหลังเติมสารละลายโคโตซาน



รูปที่ 17 แสดงลักษณะของเกล็ดเลือดก่อนและหลังการเติมสารละลายโคโตซาน
หลังจากย้อมด้วย Wright' s stain (X1000)

ก. เกล็ดเลือด (ลูกศรชี้)

ข. เกล็ดเลือดหลังเติมสารละลายโคโตซาน

3.4.5 ผลการศึกษาการเกาะกลุ่มของเซลล์ต่าง ๆ ในเลือดด้วยกล้องจุลทรรศน์

อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

เนื่องจากการทดสอบลักษณะการเกาะกลุ่มกันของเม็ดเลือดใน whole blood ด้วยสารละลายโคโตซานไม่สามารถบ่งได้อย่างชัดเจนว่ามีเซลล์ชนิดใดบ้างที่เข้ามาเกาะกลุ่มกัน เพื่อให้มองเห็นลักษณะการเกาะกลุ่มในรายละเอียดมากยิ่งขึ้น การทดลองนี้จึงนำเม็ดเลือดทั้ง 3 ส่วน คือเม็ดเลือดแดง เม็ดเลือดขาว และเกล็ดเลือด ซึ่งแยกโดยวิธีที่กล่าวในภาคผนวก มาเติมสารละลายโคโตซาน นำตัวอย่างเลือดแต่ละส่วนไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดเพื่อเปรียบเทียบและยืนยันผลที่ได้จากการย้อมด้วย Wright' s stain และวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบธรรมดา

รูปที่ 18 แสดงภาพถ่ายเม็ดเลือดแดงก่อน (18ก) และหลังการเติมสารละลายโคโตซาน (18ข) ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด จะเห็นว่าก่อนเติมสารละลายโคโตซาน เม็ดเลือดแดงมีรูปร่างปกติเป็นทรงกลม ตรงกลางโค้งเว้าเข้าหากันทั้งสองด้าน (biconcave) มีการเรียงตัวกันอย่างจัดกระจายและเป็นอิสระต่อกัน แต่หลังการเติมสารละลายโคโตซานเซลล์เม็ดเลือดแดงจะเข้ามาเกาะกลุ่มกันและมีรูปร่างเปลี่ยนแปลงไป เนื่องจากแรงอัดที่เกิดจากการยึดกันแน่นระหว่างเซลล์ รอบ ๆ เซลล์เป็นวงสีขาวอาจเนื่องจากโคโตซานที่เคลือบอยู่รอบเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้เกิดการหักเหของลำอิเล็กตรอนแตกต่างกัน

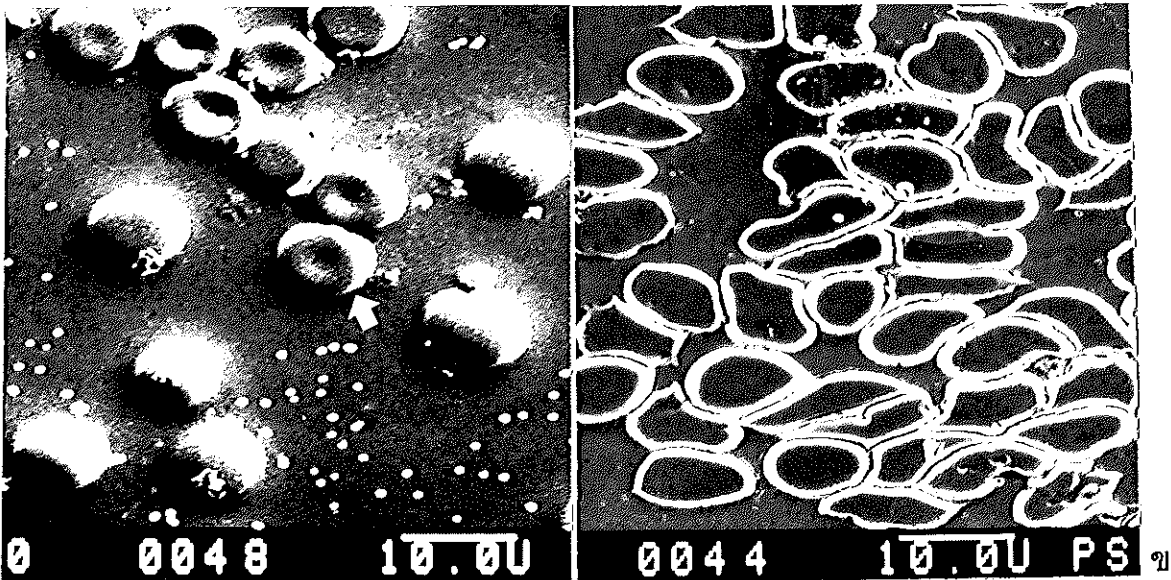
ลักษณะของเซลล์เม็ดเลือดขาวหลังการเติมสารละลายโคโตซาน พบว่าเซลล์มีการเรียงตัวแบบกระจายและเป็นไปอย่างมีอิสระต่อกัน ไม่เหมือนกับลักษณะการเกาะกลุ่มซึ่งปรากฏชัดเจนในกรณีของเม็ดเลือดแดง สอดคล้องกับการศึกษาโดยการย้อมด้วย Wright' s stain และวิเคราะห์ผลด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบธรรมดา (ข้อ 3.4.4)

รูปที่ 19 แสดงลักษณะของเกล็ดเลือดก่อน (19ก) และหลังเติมสารละลายโคโตซาน (19ข) จะเห็นว่าเซลล์มีการเรียงตัวกันอย่างจัดกระจายและเป็นอิสระต่อกัน ก่อนการเติมโคโตซาน แต่จะเข้ามาเกาะกลุ่มซึ่งมีขนาดต่างกันหลังเติมสารละลายโคโตซาน เป็นที่น่าสังเกตว่าการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดมีลักษณะการยึดเหนี่ยวกันแบบหลวม ๆ เมื่อเทียบกับเซลล์เม็ดเลือดแดง

ผลการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดสรุปเพิ่มเติมได้ว่าเมื่อนำ whole blood ผสมกับสารละลายโคโตซานจะเกิดการเกาะกลุ่มกันของเม็ดเลือดแดงแน่นหนามากที่สุด รองลงมาคือเกล็ดเลือด ในขณะที่เม็ดเลือดขาวไม่มีส่วนร่วมในกระบวนการเกาะกลุ่มของเลือด เป็นการยืนยันสมมุติฐานที่ Rao และ Sharma (1997) กล่าวไว้ว่า

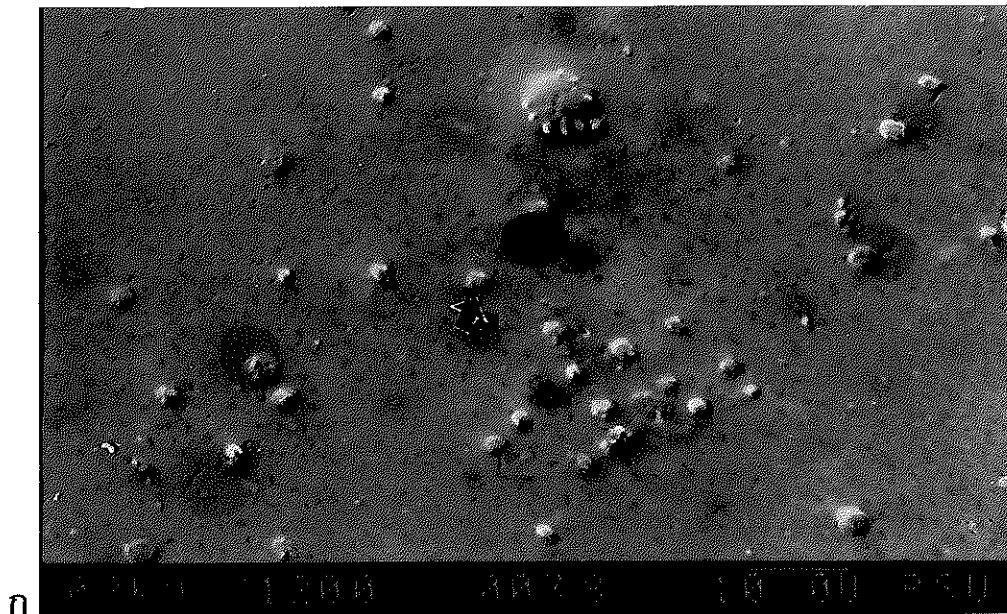
โคโตซานสามารถจับกันโดยตรง กับเยื่อหุ้มเซลล์ของเม็ดเลือดแดงและเกล็ดเลือดด้วยแรงระหว่างประจุ

เนื่องจากโคโตซานทำให้เม็ดเลือดเกาะกลุ่มกันได้โดยตรงซึ่งไม่ผ่านกลไกการแข็งตัวของเลือดธรรมดา จึงมีนักวิจัยหลายกลุ่มที่พยายามนำโคโตซานไปประยุกต์ใช้เพื่อห้ามเลือดกับแผลผ่าตัดโดยเฉพาะอย่างยิ่งในกรณีของผู้ป่วยที่มีการแข็งตัวของเลือดช้ากว่าปกติ Johnson และ Leary (1988 อ้างโดย Klokkevold *et al.*, 1991) เสนอแนะว่าการนำสารละลายโคโตซานมาใช้กับแผลผ่าตัดในช่องปากของผู้ป่วยซึ่งมีปัญหาในการแข็งตัวของเลือด มีลักษณะทางกายภาพพิเศษแตกต่างจากเนื้อเยื่อบริเวณอื่นคือ หลังการผ่าตัดจะมีเลือดออกมากและนานกว่าบริเวณผิวหนังอื่น ๆ นอกจากนั้น Malette *et al.* (1983) พบว่าสารละลายโคโตซานสามารถนำไปใช้ห้ามเลือดในการผ่าตัดเส้นเลือด aorta ของสุนัขได้อย่างมีประสิทธิภาพ อย่างไรก็ตาม Kind *et al.* (1990) รายงานผลในทางตรงกันข้ามคือเมื่อนำสารละลายโคโตซานมาทดสอบ bleeding time กับตับของหนูพันธุ์ Sprague-Dawley พบว่าทำให้ค่า bleeding time มากกว่าชุดควบคุม ทั้งในสภาพที่ใช้สารป้องกันการแข็งตัวของเลือดคือ heparin และไม่ใช่ และเมื่อนำแผลมาทดสอบทางเนื้อเยื่อวิทยาพบว่า การใช้โคโตซานทำให้ตับมีการอักเสบเพิ่มขึ้น มี cellular necrosis และ foreign body reaction สูง

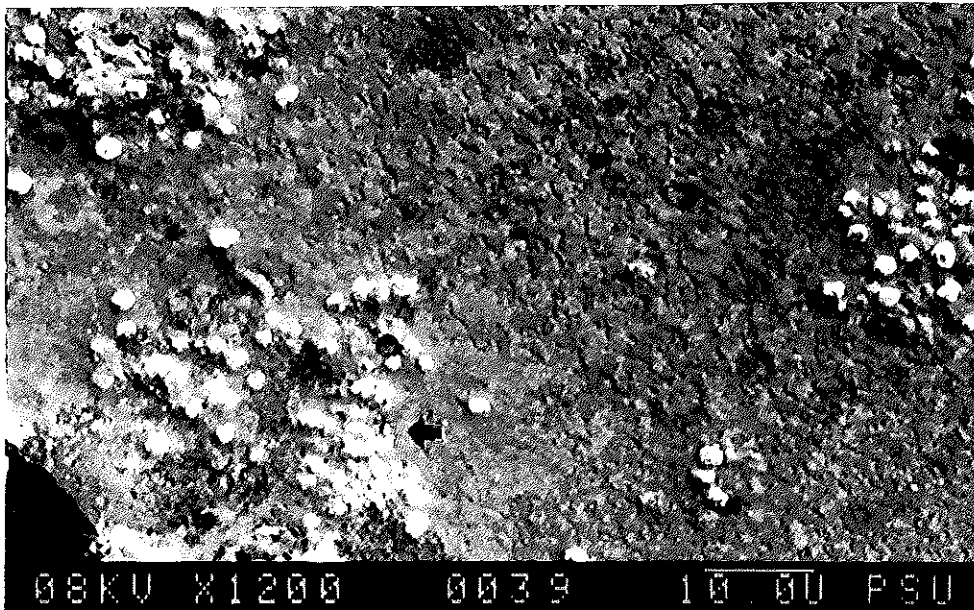


รูปที่ 18 ลักษณะของเม็ดเลือดแดงก่อนและหลังการเติมสารละลายโคโตซานภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

- ก. เม็ดเลือดแดงก่อนการเติมสารละลายโคโตซาน (ลูกศรชี้)
 ข. เม็ดเลือดแดงหลังเติมสารละลายโคโตซาน



ก



ข

รูปที่ 19 ลักษณะของเกล็ดเลือดก่อนและหลังการเติมสารละลายโคโตซานภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

ก. เกล็ดเลือดก่อนเติมสารละลายโคโตซาน (ลูกศรชี้)

ข. เกล็ดเลือดหลังเติมสารละลายโคโตซาน (ลูกศรชี้)

3.5 ผลการทดสอบหาตำแหน่งที่เหมาะสมของการทำแผลบริเวณหลังของหนูเพื่อการตรวจทางเนื้อเยื่อวิทยา

ผลการทดลองการสมานแผล 3 ตำแหน่งที่บริเวณหลังของหนูได้แก่ กลาง ซ้ายและขวา หลังหยดสารละลาย 0.9% NaCl, 1% กรดอะซิติก เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ผ่าตัดแต่ไม่ได้หยดสารใด ๆ พบว่าแผลตำแหน่งกลางของทุกชุดการทดลองสมานช้ากว่าแผลซ้ายและขวา ทั้งนี้เนื่องจากการเคลื่อนไหวของร่างกาย ทำให้แผลที่ตำแหน่งซึ่งอยู่เหนือกระดูกสันหลังเกิดการขยับมากกว่าจึงมีผลรบกวนต่อการสมานของเนื้อเยื่อ อย่างไรก็ตามเมื่อนำไปตรวจสอบทางเนื้อเยื่อวิทยา พบว่าหลังการผ่าตัด 10 วัน แผลกลางของทุกชุดการทดลองมีลักษณะคล้ายกันคือ epithelial cell เชื่อมติดกัน มีจำนวนไฟโบรบลาสต์ ไฟโบรไซต์ ระดับปานกลางประมาณ 60 เซลล์/field (x400) การเรียงตัวยังไม่ชัดเจนและคอลลาเจนเข้ามาบริเวณแผลมีระดับปานกลาง มีการเรียงตัวหลวม ๆ พบหลอดเลือดฝอยที่สร้างขึ้นใหม่ประมาณ 1-20 หลอด/ field (x400) มีเม็ดเลือดขาวชนิด lymphocyte และ macrophage ประมาณ 1-50 เซลล์/ field (x400) ส่วนค่าสังเกตในการสมานของแผลตำแหน่งซ้ายและขวาของทุกชุดการทดลองพบว่ามีระดับการสมานแผลที่ดีกว่าตำแหน่งกลาง และไม่แตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 14) ทั้งนี้ตัดสินจากจำนวนไฟโบรบลาสต์ ไฟโบรไซต์ และคอลลาเจนไฟเบอร์ที่มีอยู่ในระดับปกติถึงใกล้เคียงกับผิวหนังปกติที่ไม่ทำการผ่าตัดคือมีปริมาณไฟโบรบลาสต์และไฟโบรไซต์ประมาณ 10-39 เซลล์/field คอลลาเจนไฟเบอร์เริ่มเรียงตัวเป็นมัดมีช่องว่างระหว่างมัดชัดเจนกว่าเนื้อเยื่อของตำแหน่งกลาง ซึ่งแสดงว่าแผลตำแหน่งซ้ายและขวาของทุกชุดการทดลองมีระดับการสมานของแผลที่ใกล้เคียงกับผิวหนังปกติที่ไม่ทำการผ่าตัด (ตารางที่ 14)

ตารางที่ 15 แสดงผลการทดสอบทางเนื้อเยื่อวิทยาที่ 21 วันหลังการผ่าตัด พบว่าแผลทั้ง 3 ตำแหน่ง คือกลาง ซ้ายและขวา ค่าการสังเกตต่าง ๆ ไม่แตกต่างกันทางสถิติ และระหว่างชุดทดลองคือ แผลที่ใช้ 0.9% NaCl, 1% กรดอะซิติก และแผลไม่ใช้สารใดก็ไม่แตกต่างกัน

นอกจากนั้นผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าการสมานแผลเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์หลังการผ่าตัด 21 วัน แสดงว่าสภาวะและวิธีการที่ใช้สำหรับสัตว์ทดลองอยู่ในระดับที่น่าพอใจ ตลอดการทดลองไม่พบปรากฏการณ์ติดเชื้อ (infection) เกิดขึ้นที่บริเวณแผล ดังนั้นตลอดการทดลองเกี่ยวกับการสมานของแผลในที่นี้จึงเลือกเฉพาะตำแหน่งซ้ายและขวาสำหรับการตรวจสอบปฏิกิริยาของเนื้อเยื่อบริเวณแผล (tissue reactions) และเลือกระยะเวลา 10 และ 21 วันหลังการผ่าตัด

ตารางที่ 14 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติจากการทดสอบทางเนื้อเยื่อวิทยาของการศึกษาตำแหน่งของการทำแผลบริเวณหลังของหนูแรท ได้แก่ กลาง, ซ้าย และขวา เป็นเวลา 10 วัน

สิ่งที่ตรวจ	ไม่ใช้สารใด			0,9%NaCl			1%กรดอะซิติก		
	กลาง	ซ้าย	ขวา	กลาง	ซ้าย	ขวา	กลาง	ซ้าย	ขวา
Ep ^{ns}	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Fb	3 ^a	1 ^b	2 ^{ab}	3 ^a	2 ^a	2 ^a	3 ^a	1 ^b	2 ^{ab}
Fc	3 ^a	1 ^b	2 ^{ab}	3 ^a	2 ^a	2 ^a	3 ^a	1 ^b	2 ^{ab}
Cd	3 ^a	1 ^b	2 ^{ab}	3 ^a	2 ^a	2 ^a	3 ^a	1 ^b	1 ^{ab}
Cf	1 ^a	2 ^{ab}	2 ^{ab}	1 ^a	2 ^{bc}	1 ^{ac}	1 ^a	3 ^b	3 ^{ab}
Vc ^{ns}	2	1	2	2	2	2	2	2	2
Lm ^{ns}	2	1	1	2	1	1	2	2	1
Mc ^{ns}	2	1	1	2	1	2	2	1	1
Hair ^{ns}	1	2	2	2	2	1	1	1	1

ns : ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (p>0.05)

ค่าฐานนิยมตัวเลขในแถวเดียวกันที่กำกับด้วยตัวอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างกันทางสถิติจากการตรวจโดยใช้โปรแกรม

Nonparametric แบบ Kruskal-wallis

Ep: ลักษณะของ epithelial cell, Fb: จำนวนไฟโบรบลาส, Fc: ไฟโบรไซท์, Cd: ปริมาณคอลลาเจนไฟเบอร์, Cf: การเรียงตัวของคอลลาเจนไฟเบอร์,

Vc: ปริมาณหลอดเลือดฝอย, Lm: ปริมาณ lymphocyte, Mc: ปริมาณ macrophage, Hair: ปริมาณ hair follicles

ตารางที่ 15 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติจากการทดสอบทางเนื้อเยื่อวิทยาของกระดูกขาต่าแห่งของการทำแผลบริเวณหลังของหนูแรท ได้แก่ กลาง, ซ้าย และขวา เป็นเวลา 21 วัน

สิ่งที่ตรวจ	ไม่ใช้สารใด			0,9%NaCl			1%กรดอะซิติก		
	กลาง	ซ้าย	ขวา	กลาง	ซ้าย	ขวา	กลาง	ซ้าย	ขวา
Ep ^{ns}	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Fb ^{ns}	2	2	2	2	2	3	3	2	2
Fc ^{ns}	2	2	2	2	2	2	3	2	2
Cd ^{ns}	2	2	2	2	2	3	3	2	2
Cf ^{ns}	2	2	2	2	2	1	2	2	2
Vc ^{ns}	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Lm ^{ns}	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Mc ^{ns}	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Hair ^{ns}	2	2	2	1	1	1	2	2	2

ns : ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (p>0.05)

Ep: ลักษณะของ epithelial cell, Fb: จำนวนไฟโบรบลาสต์, Fc: ไฟโบรไซต์, Cd: ปริมาณคอลลาเจนไฟเบอร์, Cf: การเรียงตัวของคอลลาเจนไฟเบอร์,

Vc: ปริมาณหลอดเลือดฝอย, Lm: ปริมาณ lymphocyte, Mc: ปริมาณ macrophage, Hair: ปริมาณ hair follicles

ตารางที่ 16 ผลการตรวจทางเนื้อเยื่อวิทยาจากแผลเดียวกันซึ่งแบ่งตำแหน่งของแผลเป็น 3 ส่วน ได้แก่ proximal, middle และ distal หลังผ่าตัดครบ 10 และ 21 วัน จากการทดลอง 2 ซ้ำ

10 วัน

สิ่งที่ตรวจ	Proximal		Middle		Distal	
	1	2	1	2	1	2
Ep	2	3	-	3	3	2
Fb	2	1	3	2	1	2
Fc	2	1	3	2	1	2
Cd	-	1	2	3	1	2
Cf	1	3	1	1	3	1
Vc	2	1	2	2	1	2
Lm	4	3	3	2	1	3
Mc	4	3	3	2	1	3
Hair	1	3	1	1	4	1

21 วัน

สิ่งที่ตรวจ	Proximal		Middle		Distal	
	1	2	1	2	1	2
Ep	3	3	3	3	3	3
Fb	2	1	2	3	1	1
Fc	2	1	2	3	1	1
Cd	2	1	2	2	1	1
Cf	2	3	1	2	3	3
Vc	2	1	2	1	1	1
Lm	2	1	2	1	1	-
Mc	2	1	3	1	1	-
Hair	4	3	3	1	4	4

- แทนไม่พบเซลล์ดังกล่าว

Ep: ลักษณะของ epithelial cell, Fb: จำนวนไฟโบรบลาส, Fc: จำนวนไฟโบรไซต์, Cd: ปริมาณคอลลาเจนไฟเบอร์, Cf: การเรียงตัวของคอลลาเจนไฟเบอร์, Vc: ปริมาณหลอดเลือดฝอย, Lm: ปริมาณ lymphocyte, Mc: ปริมาณ macrophage, Hair: ปริมาณ hair follicles

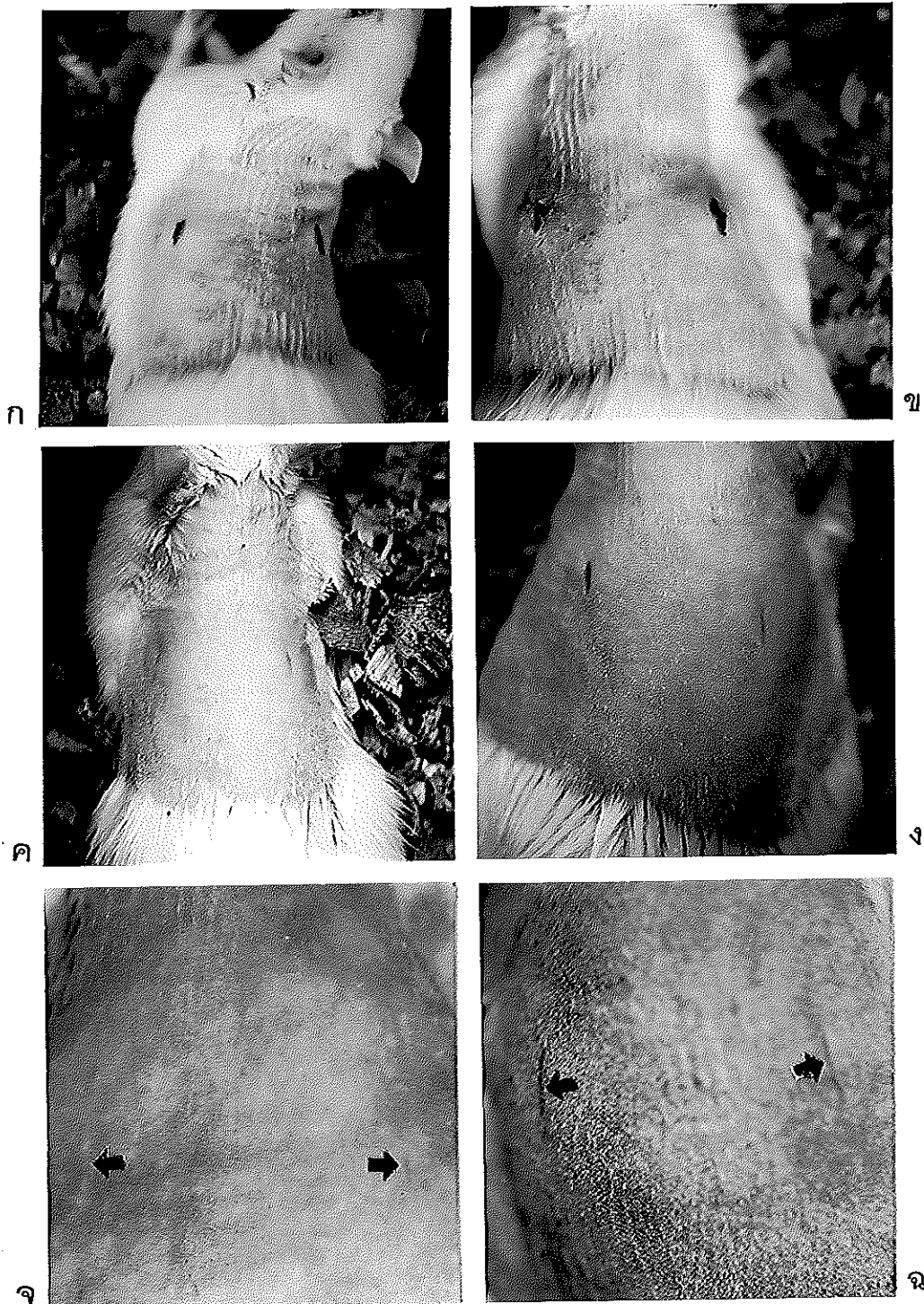
3.6 ผลการเลือกตำแหน่งของการตัดแบ่ง (section) ที่เหมาะสมในแผลเดียวกันเพื่อใช้เป็นมาตรฐานในการตรวจทางเนื้อเยื่อวิทยา

ตารางที่ 16 แสดงผลการตรวจสอบทางเนื้อเยื่อวิทยาจากแผลเดียวกันซึ่งแบ่งตำแหน่งตามความยาวของแผลออกเป็น 3 ส่วน คือ proximal, middle และ distal หลังการผ่าตัด 10 และ 21 วัน พบว่าค่าสังเกตในการสมานของแผลจากทุกตำแหน่งไม่แตกต่างกันทางสถิติ เนื่องจากตำแหน่ง proximal และ distal อยู่ใกล้กับผิวหนังที่ไม่ทำการผ่าตัดซึ่งอาจทำให้อ่านผลผิดพลาดจากความเป็นจริงได้ ดังนั้นตลอดการทดลองนี้จึงเลือกตำแหน่ง middle มาใช้เป็นมาตรฐานเพื่อลดความแปรปรวนจากการตัดแบ่ง (section) ให้น้อยที่สุด

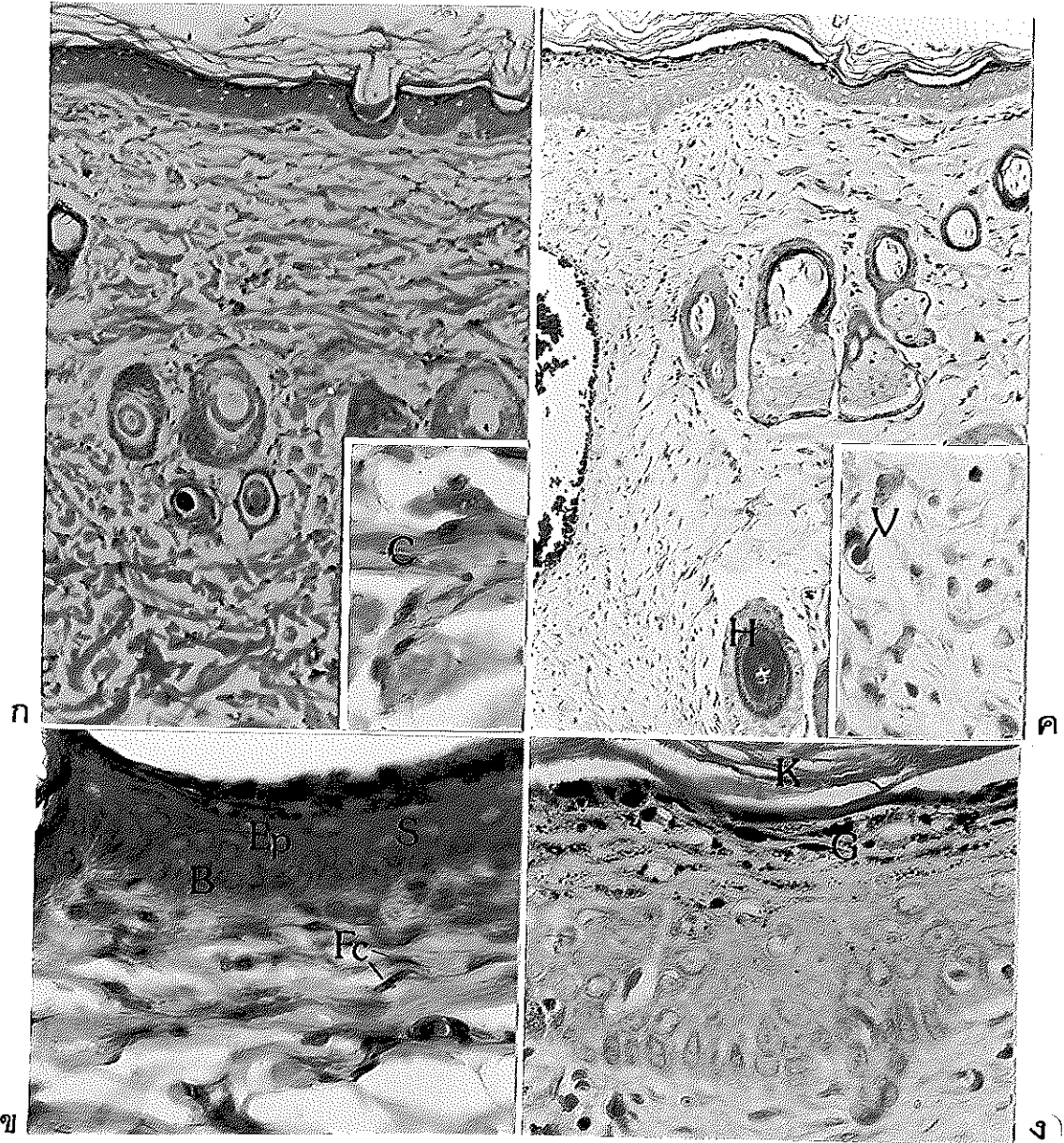
3.7 ประสิทธิภาพการสมานแผลของการใช้โคโคซานจากแหล่งและรูปแบบที่แตกต่างกัน

3.7.1 ผลของการใช้โคโคซานที่ละลายใน 1% กรดอะซิติกต่อการสมานแผล

รูปที่ 20 แสดงลักษณะแผลเมื่อใช้โคโคซานจากเปลือกกุ้งและกระดองปลาหมึกที่ละลายใน 1% กรดอะซิติก เปรียบเทียบกับแผลที่ใช้เฉพาะ 1% กรดอะซิติก หลังผ่าตัดเป็นเวลา 3, 10 และ 21 วัน จะเห็นว่าหลังการผ่าตัด 3 วัน แผลมีขนาดเล็กลง แต่ปากแผลยังเปิดอยู่และบวมเล็กน้อย (รูปที่ 20ก และ ข) จากนั้นแผลจะเริ่มตกละเอียดและหลุดออกไปเมื่อผ่าตัดครบ 10 วัน ปากแผลปิด สะกิดหลุดออกไปเกือบทั้งหมด (รูปที่ 20ค และ ง) และหลังการผ่าตัด 21 วัน พบว่าปากแผลเชื่อมติดกันสนิท ทั้งที่ใช้และไม่ใช้สารละลายโคโคซาน (รูปที่ 20จ และ ฉ) จากนั้นตัดชิ้นเนื้อบริเวณแผลหลังการผ่าตัดที่เวลาต่าง ๆ กันดังกล่าวไปตรวจสอบทางเนื้อเยื่อวิทยาโดยย้อมสี H&E (Hematoxylin เป็น basic dye จะย้อมติดบริเวณที่เป็น acid คือ ดิสก์ม่วง เซลล์ที่ย้อมติดสีได้แก่นิวเคลียส เซลล์ไฟโบรบลาสต์ ไฟโบรไซท์ ส่วนสี Eosin เป็น acid dye จะย้อมติดบริเวณที่เป็น basic ย้อมติดสีแดง ได้แก่ คอลลาเจนไฟเบอร์ เม็ดเลือดแดง และเซลล์ eosinophil)

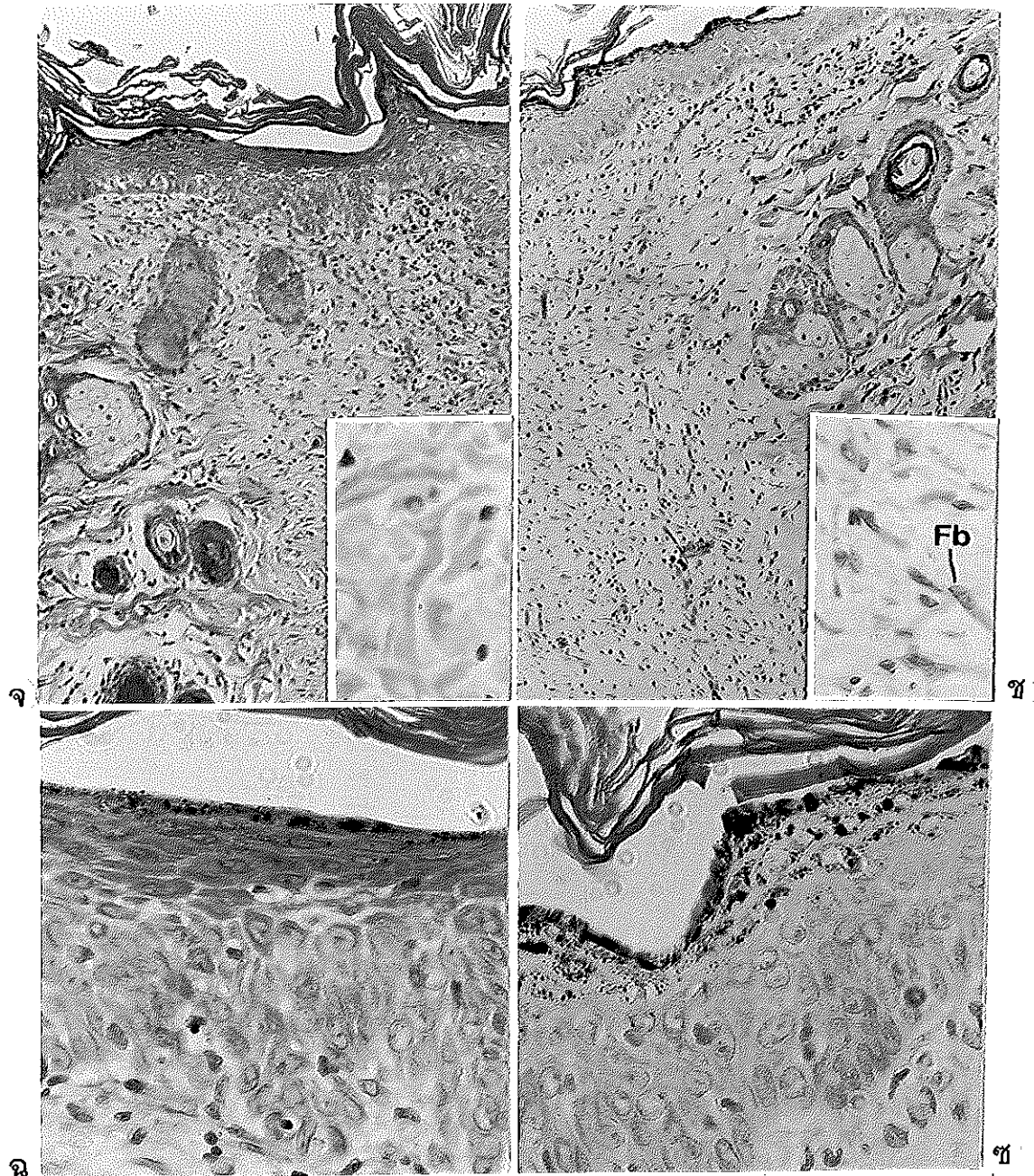


รูปที่ 20 แสดงแผลผ่าตัดหลังจากใช้ไดโธซานที่ละลายใน 1% กรดอะซิติค เป็นเวลา 3, 10 และ 21 วัน
 แผลซ้าย-ขวาหลังจากใช้ 1% กรดอะซิติค 3 วัน, ก; 10 วัน, ค; 21 วัน, ง;
 แผลซ้ายหลังจากใช้สารละลายไดโธซานจากเปอร์ออกไซด์มีความเข้มข้น 8 มก./มล. และ
 แผลขวาใช้สารละลายไดโธซานจากกระดองปลาหมึกมีความเข้มข้น 4 มก./มล. 3 วัน, ข; 10 วัน, ง;
 21 วัน, ฉ (ลูกศรชี้แสดงรอยแผลหลังจากการผ่าตัด 21 วัน)



รูปที่ 21 แสดงลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาของการสมานแผลที่ทำการผ่าตัดบริเวณผิวหนังบนหลังหนูแรท หลังจากใช้โคโคซานที่ละลายใน 1% กรดอะซิติก เป็นเวลา 10 วันโดยการย้อมสี hematoxylin และ eosin

- ก. ลักษณะผิวหนังที่ไม่ทำการผ่าตัด (X100), รูปเล็กมุมขวาล่าง: C แสดงการเรียงตัวเป็นมัดของคอลลาเจนไฟเบอร์ (X400)
- ข. Ep แสดงการเรียงตัวของเซลล์ในชั้น epidermis ของผิวหนังปกติที่ไม่ผ่าตัด, S : Spinous layer, B : Basal layer, Fc : เซลล์ไฟโบรไซท์ (X400)
- ค. ลักษณะผิวหนังที่ผ่าตัดแล้วใช้ 1% กรดอะซิติก (X100) H: hair follicle, รูปมุมขวาล่างเล็ก: แสดงการเรียงตัวของคอลลาเจนไฟเบอร์แบบหลวม ๆ และการเรียงของไฟโบรบลาสต์ที่ยังไม่เป็นระเบียบ (X400), V: หลอดเลือดฝอยที่เข้ามาบริเวณแผล
- ง. แสดงการเรียงตัวของเซลล์ชั้น epidermis จากข้อ ค. ที่ไม่เป็นระเบียบและเซลล์มีการบวม, K: keratin, G: granular layer (X400)



รูปที่ 21 (ต่อ)

- จ. ลักษณะผิวหนังที่ผ่าตัดแล้วใช้สารละลายโคโคซานจากกระดองปลาหมึกมีความเข้มข้น 4 มก./มล. (X100), รูปเล็กมุมขวาล่าง: แสดงการเรียงตัวของคอลลาเจนไฟเบอร์ซึ่งกระจัดกระจายไม่ชัดเจน (X400)
- ฉ. แสดงการเรียงตัวของเซลล์ชั้น epidermis จากข้อ จ ที่ไม่เป็นระเบียบและเซลล์บวมยาว (X400)
- ช. ลักษณะผิวหนังที่ผ่าตัดแล้วใช้สารละลายโคโคซานจากเปลือกกุ้งมีความเข้มข้น 8 มก./มล. (X100), รูปเล็กมุมขวาล่าง : Fb แสดงเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่เข้ามาบริเวณแผลจำนวนมาก และยังมีเรียงตัวไม่เป็นระเบียบ (X400)
- ซ. แสดงการเรียงตัวของเซลล์ชั้น epidermis จากข้อ ช ที่ไม่เป็นระเบียบและเซลล์บวม (X400)

ตารางที่ 17 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติจากการทดสอบทางเนื้อเยื่อวิทยาของหนูแรทที่ใช้
ผงโคโคซานละลายใน 1% กรดอะซิติก ครบ 10 วัน

สิ่งที่ตรวจ	ผิวหนังปกติ ที่ไม่ผ่าตัด	โคโคซานจาก		
		1% กรดอะซิติก	กระดองปลาหมึก (4 มก/มล)	เปลือกกุ้ง (8 มก/มล)
Ep	3 ^a	2 ^b	2 ^b	2 ^b
Fb	1 ^a	3 ^b	3 ^b	3 ^b
Fc	1 ^a	3 ^b	3 ^b	3 ^b
Cd	1 ^a	3 ^b	3 ^b	3 ^b
Cf	3 ^a	1 ^b	1 ^b	1 ^b
Vc	1 ^a	2 ^b	2 ^b	2 ^b
Lm	1 ^a	2 ^b	2 ^b	2 ^b
Mc	1 ^a	2 ^b	2 ^b	3 ^b
Hair	4 ^a	1 ^b	1 ^b	1 ^b

ค่าฐานนิยมตัวเลขในแถวเดียวกันที่กำกับด้วยตัวอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างกันทางสถิติจากการตรวจ
โดยใช้การโปรแกรม Nonparametric แบบ Kruskal-wallis

Ep: ลักษณะของ epithelial cell, Fb: จำนวนไฟโบรบลาสต์, Fc: ไฟโบรไซต์, Cd: ปริมาณคอลลาเจนไฟเบอร์,

Cf: การเรียงตัวของคอลลาเจนไฟเบอร์, Vc: ปริมาณหลอดเลือดฝอย, Lm: ปริมาณ lymphocyte,

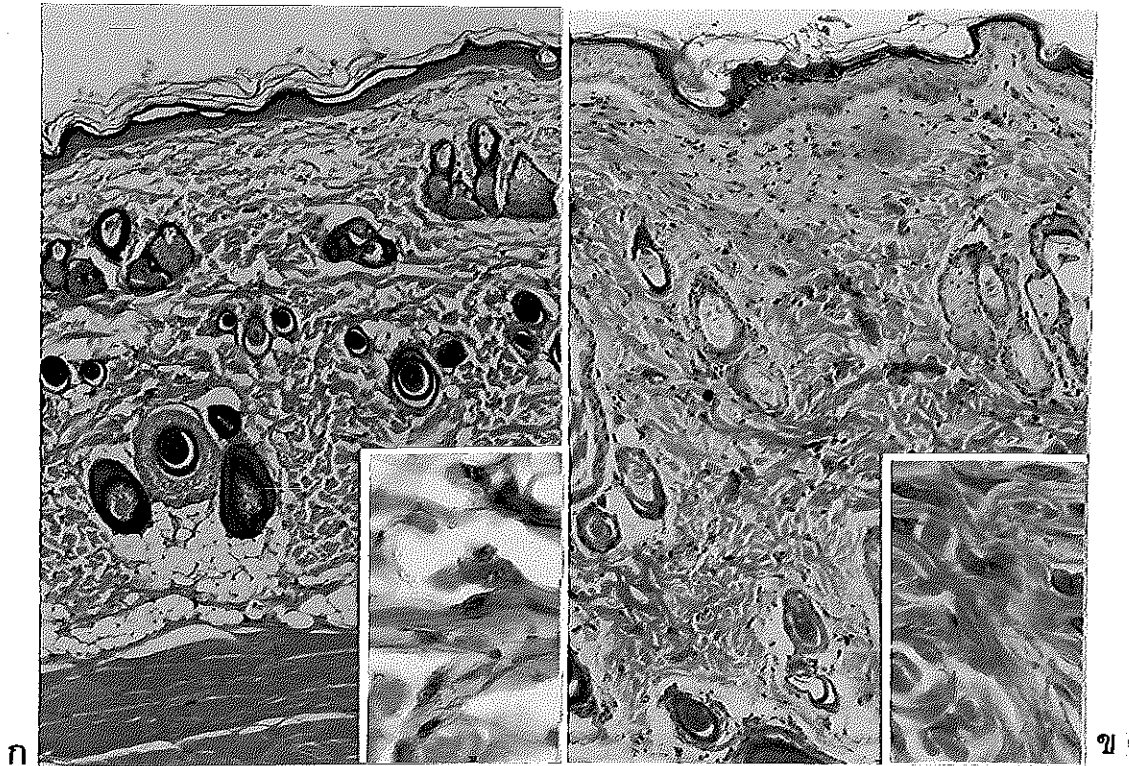
Mc: ปริมาณ macrophage, Hair: ปริมาณ hair follicles

รูปที่ 21 และ ตารางที่ 17 แสดงผลทางเนื้อเยื่อวิทยาของแผลที่ใช้สารละลาย โคโตซานจากกระดองปลาหมึก, เปลือกกุ้ง และ 1% กรดอะซิติกหลังการผ่าตัด 10 วัน เปรียบเทียบกับผิวหนัง ปกติที่ไม่ทำการผ่าตัด

รูปที่ 21ก-ข แสดงลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาของผิวหนังปกติที่ไม่ผ่าตัดจะเห็นว่า ชั้น epithelial cell เชื่อมติดกันตลอด โดยในชั้น epidermis ประกอบด้วย keratinized layer, granular layer, spinous layer, basal layer ซึ่งเซลล์เหล่านี้ ทำหน้าที่ในการสร้าง keratin ให้กับผิวหนัง (Damjanov, 1996) เซลล์ชั้น epidermis เรียงเป็นระเบียบ และแบ่งแนวชัดเจนจากชั้น dermis ด้วย basement membrane จำนวนไฟโบรบลาสต์ ไฟโบรไซท์มีในระดับปกติประมาณ 10-19 เซลล์/field (x400) และคอลลาเจนไฟเบอร์พบ ในระดับปกติ มีลักษณะเรียงตัวอัดแน่นเป็นมัดชัดเจน ติดสีชมพูเข้ม มีช่องว่างระหว่างมัด ชัดเจน พบเส้นหลอดเลือดฝอยกระจายอยู่บางบริเวณคือ บาง field พบ 1-2 หลอด บาง field ไม่พบ พบ lymphocyte และ macrophage บางบริเวณคือ บาง field พบ 1-5 เซลล์ บาง field ไม่พบ hair follicles มีจำนวนมากกว่า 10 follicles/ field (x400)

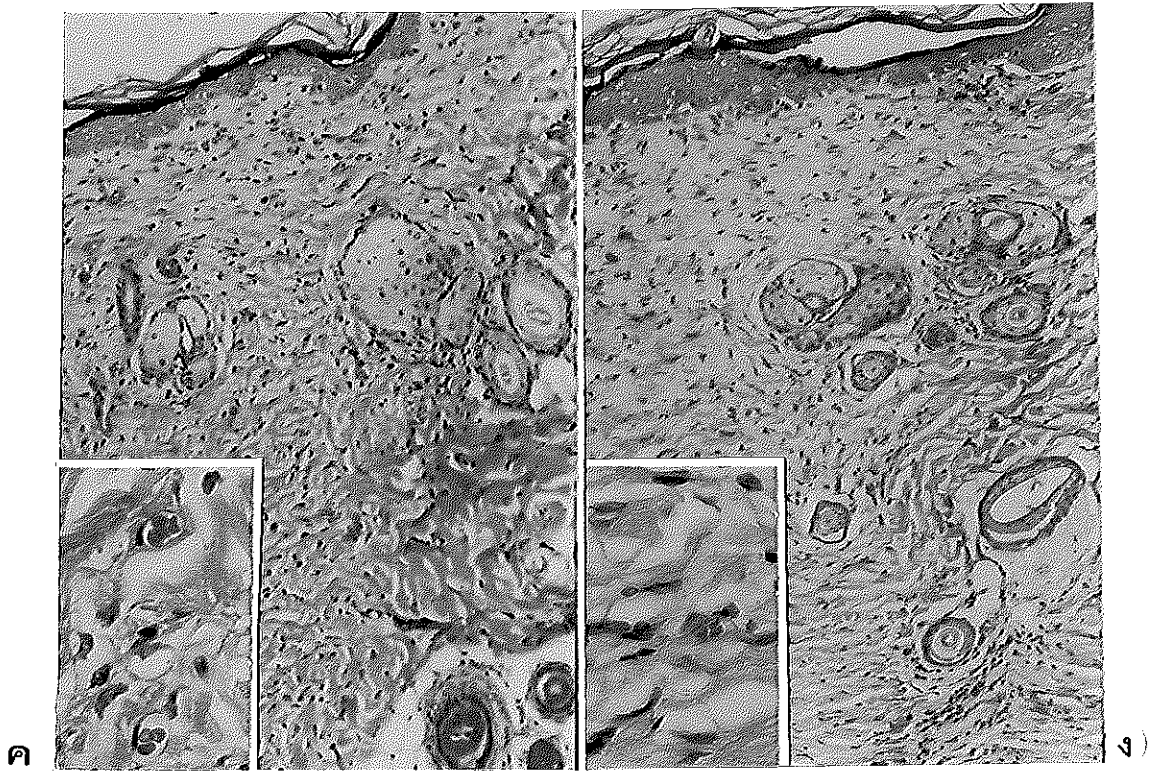
รูปที่ 21ค-ง แสดงลักษณะแผลที่ใช้ 1% กรดอะซิติกจะเห็นว่า epithelial cell เชื่อมติดกันแต่ชั้น epidermis นานกว่าปกติ เซลล์มีลักษณะยาวกว่าปกติและเรียงตัวแบบ หลวม ๆ ยังแบ่งชั้นไม่ชัดเจนจากชั้น dermis จำนวนของไฟโบรบลาสต์และไฟโบรไซท์มี ระดับปานกลางประมาณ 40-60 เซลล์ เรียงตัวไม่เป็นระเบียบ คอลลาเจนไฟเบอร์มีมาก แต่เรียงแบบหลวม ๆ ติดสีชมพูอ่อน มีหลอดเลือดฝอยกระจายอยู่ทั่วไป 1-20 หลอด/ field พบ lymphocyte และ macrophage กระจาย 1-50 เซลล์/ field มี hair follicles ที่สร้างขึ้นใหม่ 1-3 follicles/ field ลักษณะปฏิกิริยาของเนื้อเยื่อเช่นนี้แสดงให้เห็นได้ว่าแผลยังอยู่ในระยะเริ่มมีการสมานแผลซึ่งเห็นได้ชัดเจนจากปริมาณของคอลลา เจนไฟเบอร์ที่พบมากและเรียงตัวแบบหลวม ๆ และมีเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบแบบ เรื้อรัง (chronic inflammation) เข้ามาบริเวณแผลคือ lymphocyte และ macrophage

รูปที่ 21จ-ฉ และ 21ซ-ช แสดงลักษณะแผลที่ใช้โคโตซานจากกระดองปลาหมึก เข้มข้น 4 มก./มล. และจากเปลือกกุ้งเข้มข้น 8 มก./มล. ที่ละลายใน 1% กรดอะซิติกตาม ลำดับ จะเห็นว่าลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาบางส่วนคล้ายกับแผลที่ใช้ 1% กรด อะซิติก (รูปที่ 21ค) แต่มีลักษณะที่ต่างกันคือแผลที่ใช้โคโตซานจากเปลือกกุ้งเข้มข้น 8 มก./มล. ตามลำดับ มีปริมาณของ macrophage 51-100 เซลล์/ field ซึ่งมากกว่าแผลที่ใช้โคโตซานกระดอง ปลาหมึกเข้มข้น 4 มก./มล. และ 1% กรดอะซิติก อย่างไรก็ตามจากการทดสอบทางสถิติ พบว่าไม่มีความแตกต่างกัน (ตารางที่ 17) ปฏิกิริยาของเนื้อเยื่อเช่นนี้แสดงว่าแผลยังอยู่ใน ระยะเริ่มของการสมานซึ่งยังคงมีอาการอักเสบแบบเรื้อรัง



รูปที่ 22 แสดงลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาของการสมานแผลที่ทำการผ่าตัดบริเวณหลังหนูแรทหลังจากใช้โคโตซานที่ละลายใน 1% กรดอะซิติก เป็นเวลา 21 วันโดยย้อมสี H&E

- ก. ลักษณะผิวหนังที่ไม่ทำการผ่าตัด (X50), รูปเล็กมุมขวาล่าง: แสดงการเรียงตัวของคอลลาเจนไฟเบอร์เป็นมัด (X400)
- ข. ลักษณะผิวหนังที่ผ่าตัดแล้วใช้ 1% กรดอะซิติก (X100), รูปมุมขวาล่างเล็ก: แสดงการเรียงตัวของคอลลาเจนไฟเบอร์เริ่มเป็นมัด (X400)



รูปที่ 22 (ต่อ)

- ค. ลักษณะผิวหนังที่ผ่าตัดแล้วใช้สารละลายโคโคซานจากกระดองปลาหมึกมีความเข้มข้น 4 มก./มล. (X100), รูปเล็กมุมซ้ายล่าง: แสดงการเรียงตัวของคอลลาเจนไฟเบอร์เริ่มเป็นมัดและมีหลอดเลือดฝอยแทรกอยู่ (X400)
- ง. ลักษณะผิวหนังที่ผ่าตัดแล้วใช้สารละลายโคโคซานจากเปลือกกุ้งมีความเข้มข้น 8 มก./มล. (X100), รูปเล็กมุมซ้ายล่าง: แสดงการเรียงตัวของคอลลาเจนไฟเบอร์เริ่มเป็นมัด มีหลอดเลือดฝอยแทรกอยู่และไฟโบรไซต์เรียงตัวในแนวเดียวกัน (X400)

ตารางที่ 18 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติจากการทดสอบทางเนื้อเยื่อวิทยาของหนูแรทที่ใช้
ผงโคโคซานละลายใน 1% กรดอะซิติก ครบ 21 วัน

สิ่งที่ตรวจ	ผิวหนังปกติ ที่ไม่ผ่าตัด	โคโคซานจาก		
		1% กรดอะซิติก	กระดองปลาหมึก (4 มก/มล)	เปลือกกุ้ง (8 มก/มล)
Ep ^{ns}	3	3	3	3
Fb	1 ^a	2 ^b	2 ^b	2 ^b
Fc	1 ^a	2 ^b	2 ^b	2 ^b
Cd	1 ^a	2 ^b	2 ^b	3 ^{bc}
Cf	3 ^a	2 ^b	3 ^{ab}	2 ^b
Vc	1 ^a	2 ^b	2 ^b	2 ^b
Lm	1 ^a	1 ^a	1 ^a	2 ^b
Mc	1 ^a	1 ^a	1 ^a	2 ^b
Hair	3 ^a	2 ^b	2 ^b	2 ^b

ns : ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p > 0.05$)

ค่าฐานนิยมตัวเลขในแถวเดียวกันที่กำกับด้วยตัวอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างกันทางสถิติจากการตรวจ
โดยใช้การโปรแกรม Nonparametric แบบ Kruskal-wallis

Ep: ลักษณะของ epithelial cell, Fb: จำนวนไฟโบรบลาส, Fc: ไฟโบรไซต์, Cd: ปริมาณคอลลาเจนไฟเบอร์,

Cf: การเรียงตัวของคอลลาเจนไฟเบอร์, Vc: ปริมาณหลอดเลือดฝอย, Lm: ปริมาณ lymphocyte,

Mc: ปริมาณ macrophage, Hair: ปริมาณ hair follicles

รูปที่ 22ก-ง แสดงลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาของแผลที่ใช้สารละลายโคโคซาน จากกระดองปลาหมึก เปลือกกุ้ง และ 1% กรดอะซิติก หลังการผ่าตัด 21 วันเปรียบเทียบกับผิวหนังปกติที่ไม่ทำการผ่าตัด ตารางที่ 18 แสดงผลวิเคราะห์ทางสถิติของการตรวจทางเนื้อเยื่อวิทยา

รูปที่ 22ก แสดงลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาของผิวหนังปกติที่ไม่ผ่าตัด

รูปที่ 22ข แสดงลักษณะแผลผ่าตัดที่ใช้ 1% กรดอะซิติก จะเห็นว่า epithelial cell เชื่อมติดกันมีความหนาปกติ มีจำนวนไฟโบรบลาส และไฟโบรไซท์ระดับใกล้เคียงปกติ ประมาณ 20-39 เซลล์/ field เรียงตัวไม่เป็นระเบียบ ปริมาณคอลลาเจนไฟเบอร์มีระดับปานกลาง เริ่มมีลักษณะตัวอัดกันแน่นเป็นมัดเรียงตัวในแนวตั้ง (ภาพเล็กมุมขวาล่าง) พบหลอดเลือดฝอย 1-20 หลอด/ field ปริมาณเซลล์ lymphocyte และ macrophage พบบางบริเวณ เซลล์กล้ามเนื้อเชื่อมติดกันปกติ และมี hair follicles ที่สร้างขึ้นใหม่ 4-6 follicles/ field ปฏิกริยาของเนื้อเยื่อแสดงว่าการสมานแผลที่เกิดขึ้นใกล้เคียงปกติโดยทราบได้จากการเรียงตัวของคอลลาเจนไฟเบอร์ ปริมาณหลอดเลือดฝอยที่พบน้อยและปริมาณของเซลล์ lymphocyte และ macrophage ที่มีบางบริเวณเหมือนเนื้อเยื่อปกติที่ไม่ผ่าตัด

รูปที่ 22ค แสดงลักษณะแผลที่ใช้โคโคซานจากกระดองปลาหมึกที่ละลายใน 1% กรดอะซิติกความเข้มข้น 4 มก./มล. ลักษณะที่เห็นได้ชัดเจนคือ ปากแผลแคบลง ซึ่งเป็นลักษณะของการหดตัวของแผลปัจจุบันพบว่าเกิดจาก myofibroblast ในเนื้อเยื่อที่กำลังมีการซ่อมแซม (granulation tissue) ซึ่งเปลี่ยนรูปร่างมาจากไฟโบรบลาสและสร้างสารพวก actinomyosin คล้ายกับเซลล์กล้ามเนื้อเรียบ ช่วยทำให้เยื่อผิว (epithelial membrane) เข้ามาคลุมแผลได้เร็วขึ้น (กอบกุล ตั้งสินมั่นคง, 2540) และมีลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาของการสมานแผลส่วนใหญ่ที่เหมือนกับแผลที่ใช้ 1% กรดอะซิติก พบเซลล์ไฟโบรบลาสน้อยลง แต่เซลล์ไฟโบรไซท์พบมากขึ้นและเรียงตัวในแนวขนานอย่างเป็นระเบียบ คอลลาเจนมีลักษณะเรียงตัวอัดแน่นเป็นมัดเห็นช่องว่างระหว่างมัดชัดเจน แต่ยังมีขนาดของมัดเล็กกว่าผิวหนังปกติที่ไม่ผ่าตัด ปฏิกริยาของเนื้อเยื่อแสดงว่าการสมานแผลที่เกิดขึ้นใกล้เคียงปกติ

รูปที่ 22ง แสดงลักษณะแผลที่ใช้โคโคซานจากเปลือกกุ้งที่ละลายใน 1% กรดอะซิติกความเข้มข้น 8 มก./มล. มีบางลักษณะที่เหมือนกับแผลที่ใช้ 1% กรดอะซิติก และจากการสังเกตลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาที่ต่างกันคือ การเรียงของเซลล์ไฟโบรไซท์ที่เรียงตัวในแนวขนานกันเป็นระเบียบกว่า และคอลลาเจนไฟเบอร์อัดแน่นเป็นมัดเรียงตัวในแนว

ขนานกันแต่ยังมีขนาดมัดที่เล็กกว่าแผลที่ใช้โคโตซานจากกระดองปลาหมึก แต่เมื่อเปรียบเทียบกันทางสถิติพบว่าไม่แตกต่างกัน แต่ที่แตกต่างกันทางสถิติคือ ปริมาณเซลล์ lymphocyte และ macrophage พบ 1-50 เซลล์/ field อยู่ใกล้กับชั้นกล้ามเนื้อ มีจำนวนมากกว่าแผลที่ใช้ 1% กรดอะซิติก และแผลที่ใช้โคโตซานจากกระดองปลาหมึก เข้มข้น 4 มก./มล. ซึ่งแสดงว่า ยังมีการอักเสบแบบเรื้อรังอยู่

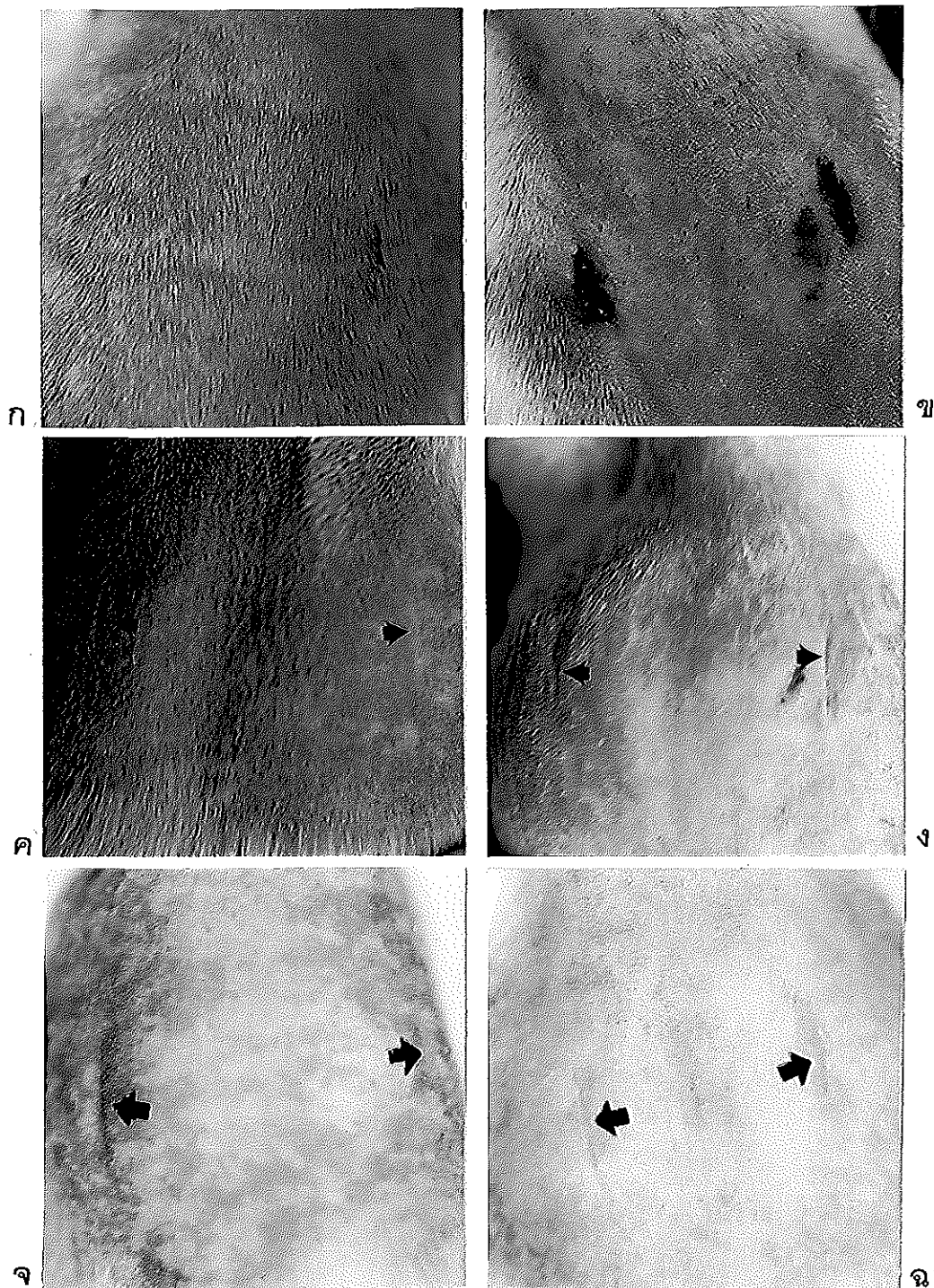
เมื่อเปรียบเทียบการสมานแผลที่ 10 กับ 21 วันหลังการผ่าตัดจะเห็นได้ว่าที่ 21 วันทุกชุดการทดลองมีการสมานแผลดีขึ้น คือคอลลาเจนไฟเบอร์เริ่มเรียงตัวเป็นมัด และปริมาณของเซลล์ lymphocyte และ macrophage มีปริมาณลดลงจนอยู่ในระดับปกติคือพบบางบริเวณและมี hair follicles เพิ่มมากขึ้น และเมื่อเปรียบเทียบกันระหว่างชุดทดลองพบว่าแผลที่ใช้โคโตซานจากกระดองปลาหมึกที่ละลายใน 1% กรดอะซิติกความเข้มข้น 4 มก./มล. มีการสมานแผลดีที่สุด รองลงมาคือแผลที่ใช้โคโตซานจากเปลือกกุ้งที่ละลายใน 1% กรดอะซิติกความเข้มข้น 8 มก./มล. และแผลที่ใช้ 1% กรดอะซิติก

จากการทดสอบทางเนื้อเยื่อวิทยาของการสมานแผลในการทดลองนี้ให้คะแนนเป็นข้อมูลเชิงเปรียบเทียบคือมี 5 ระดับ ทำให้ผลการวิเคราะห์ทางสถิติที่ได้จึงแตกต่างกันไม่ชัดเจน ซึ่งลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาที่ปรากฏมีรายละเอียดมากกว่าคะแนนที่ให้ จึงตัดสินใจจากลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาโดยรวมเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อปกติที่ไม่ผ่าตัด

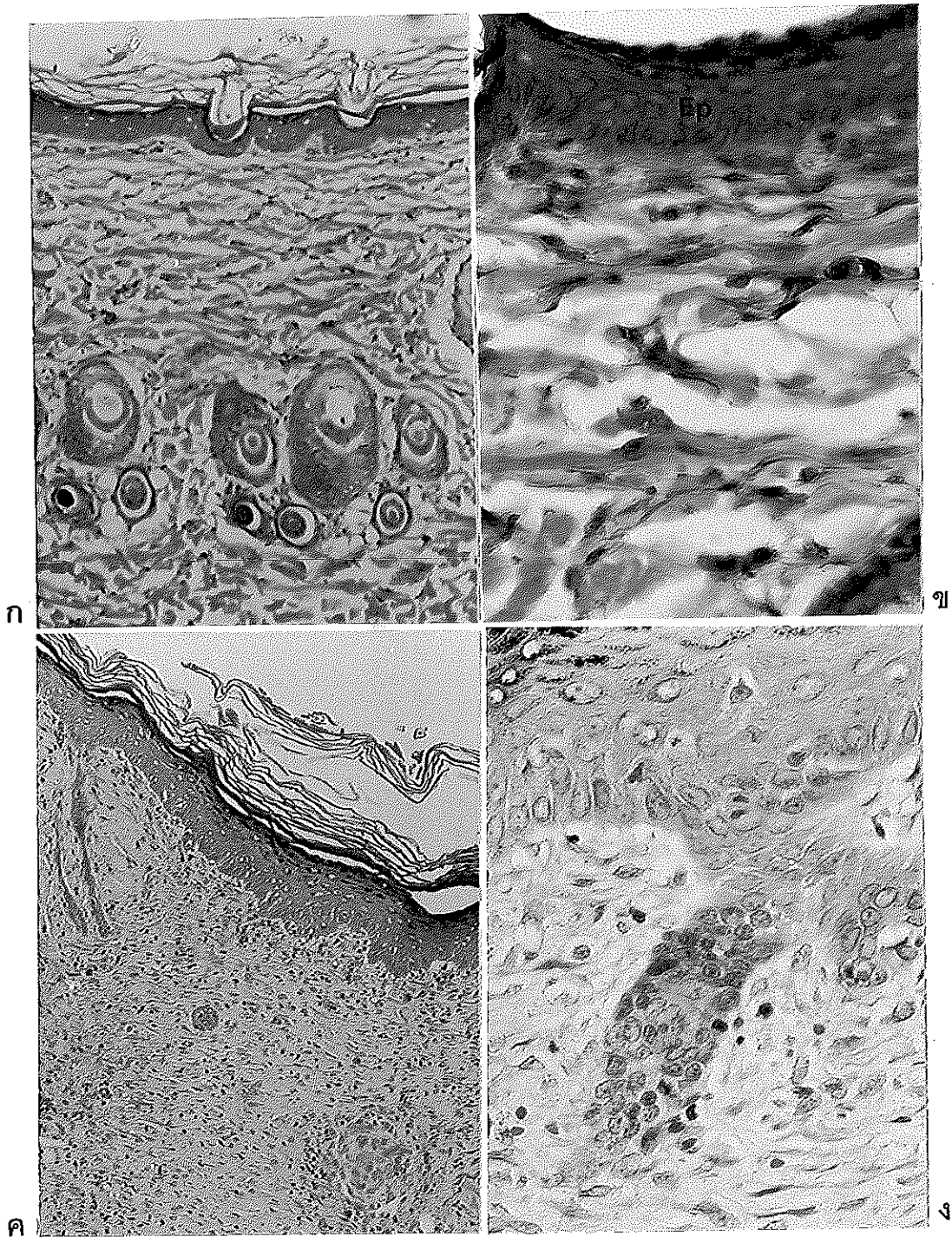
3.7.2 ผลของการใช้สารละลายโคโตซานในรูปสปีนจ์ต่อการการสมานแผล

รูปที่ 23 แสดงลักษณะแผลเมื่อใช้สารละลายโคโตซานจากเปลือกกุ้งและกระดองปลาหมึกในรูปสปีนจ์เปรียบเทียบกับแผลที่ใช้ 0.9% NaCl หลังผ่าตัดเป็นเวลา 3, 10 และ 21 วัน

รูปที่ 23ก, ค และ จ แสดงแผลตำแหน่งซ้ายและขวาที่ใช้ 0.9% NaCl เป็นเวลา 3, 10 และ 21 วัน ตามลำดับ จะเห็นว่าหลังผ่าตัด 3 วัน แผลเริ่มปิด มีขนาดเล็กลง ไม่มีการอักเสบรอบ ๆ แผล หลังจากนั้นแผลตกละเอียดและหลุดออกไป ปากแผลติดกันสนิทหลังการผ่าตัด 10 วัน แต่ยังคงเห็นรอยแผลอยู่ และหลังผ่าตัด 21 วัน พบรอยแผลเชื่อมติดกันสนิท



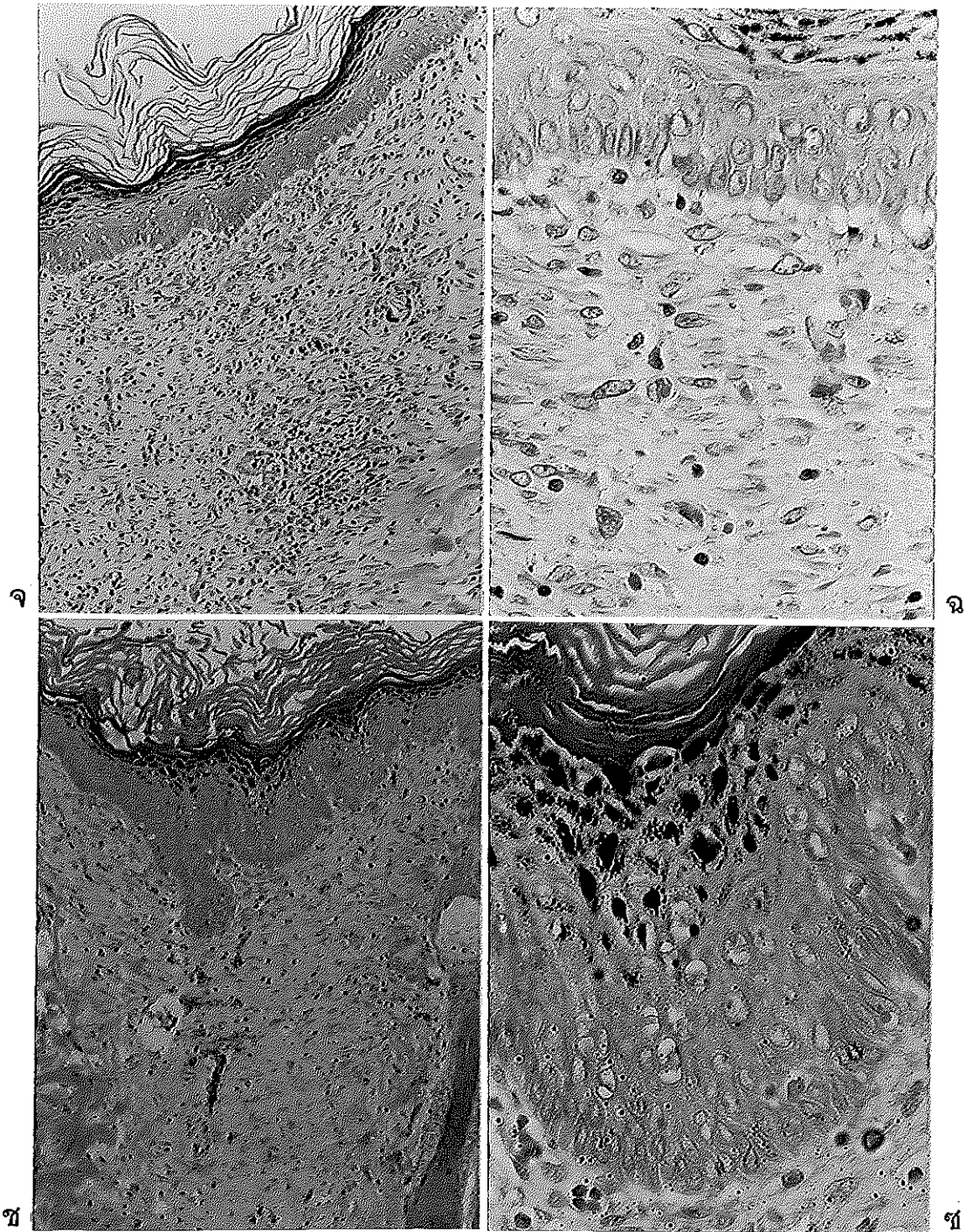
รูปที่ 23 แสดงแผลผ่าตัดหลังจากใช้สปิงจ์โคโคซานที่ละลายใน 0.9% NaCl เป็นเวลา 3, 10 และ 21 วัน
 แผลชาย-ขวาหลังจากใช้ 0.9% NaCl 3 วัน, ก; 10 วัน, ค; 21 วัน, จ
 แผลซ้ายหลังจากใช้สารละลายโคโคซานจากเปลือกกุ้งในรูปสปิงจ์และแผลขวาใช้สารละลาย
 โคโคซานจากกระดองปลาหมึกในรูปสปิงจ์ความเข้มข้น 8 มก./มล. 3 วัน, ข; 10 วัน, ง; 21 วัน, ฉ
 (ลูกศรชี้แสดงรอยแผลหลังจากการผ่าตัด 10 และ 21 วัน)



รูปที่ 24 แสดงลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาของการสมานแผลที่ทำการผ่าตัดบริเวณผิวหนังบนหลังหนูแรทหลังจากใช้สปีนจ์โคโตซานที่ละลายใน 0.9% NaCl เป็นเวลา 10 วันโดยการย้อมสี H&E

ก. ลักษณะผิวหนังที่ไม่ทำการผ่าตัด (X100) ข. แสดงการเรียงตัวเป็นมัดของคอลลาเจนไฟเบอร์ จากข้อ ก. Ep: แสดงการเรียงตัวของเซลล์ในชั้น epidermis ของผิวหนังปกติ (X400)

ค. ลักษณะผิวหนังที่ผ่าตัดแล้วใช้ 0.9% NaCl (X100) ง. แสดงการเรียงตัวของเซลล์ชั้น epidermis จากข้อ ค. ที่ยังไม่เป็นระเบียบและเซลล์ยังบวมอยู่ เซลล์ไฟโบรบลาสต์และไฟโบรไซต์ที่เรียงในแนวขนานกับผิว (X400)



รูปที่ 24 (ต่อ)

- จ. ลักษณะผิวหนังที่ผ่าตัดแล้วใช้สารละลายโคโคซานจากกระดองปลาหมึกในรูปสปีนจ์ความเข้มข้น 8 มก./มล. (X100) จ. แสดงการเรียงตัวของเซลล์ชั้น epidermis จากข้อ จ ที่ยังไม่เป็นระเบียบ และเซลล์ยังบวมอยู่และเซลล์ไฟโบรบลาสและไฟโบรไซท์ที่เรียงในแนวขนานกับผิว (X400)
- ข. ลักษณะผิวหนังที่ผ่าตัดแล้วใช้สารละลายโคโคซานจากเปลือกกุ้งในรูปสปีนจ์ความเข้มข้น 8 มก./มล. (X100) ข. แสดงการเรียงตัวของเซลล์ชั้น epidermis จากข้อ ข ที่ไม่เป็นระเบียบ ชั้นของเซลล์หนาและยังบวมอยู่ (X400)

ตารางที่ 19 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติจากการทดสอบทางเนื้อเยื่อวิทยาของหนูแรทที่ใช้โคโตซานในรูปแบบผง
ที่ละลายใน 0.9% NaCl ครบ 10 วัน

สิ่งที่ตรวจ	ผิวหนังปกติ ที่ไม่ผ่าตัด	0.9% NaCl	โคโตซานจาก	
			กระดองปลาหมึก (8 มก/มล)	เปลือกกุ้ง (8 มก/มล)
Ep ^{ns}	3	3	3	3
Fb	1 ^a	2 ^b	2 ^b	2 ^b
Fc	1 ^a	2 ^b	2 ^b	2 ^b
Cd	1 ^a	2 ^b	2 ^b	2 ^b
Cf	3 ^a	2 ^b	2 ^b	1 ^b
Vc	1 ^a	2 ^b	2 ^b	2 ^b
Lm	1 ^a	1 ^a	2 ^b	4 ^b
Mc	1 ^a	1 ^a	2 ^b	4 ^b
Hair	3 ^a	2 ^b	1 ^c	1 ^c

ns : ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p > 0.05$)

ค่าฐานนิยมตัวเลขในแถวเดียวกันที่กำกับด้วยตัวอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างกันทางสถิติจากการตรวจ
โดยใช้การโปรแกรม Nonparametric แบบ Kruskal-wallis

Ep: ลักษณะของ epithelial cell, Fb: จำนวนไฟโบรบลาส, Fc: ไฟโบรไซท์, Cd: ปริมาณคอลลาเจนไฟเบอร์,

Cf: การเรียงตัวของคอลลาเจนไฟเบอร์, Vc: ปริมาณหลอดเลือดฝอย, Lm: ปริมาณ lymphocyte,

Mc: ปริมาณ macrophage, Hair: ปริมาณ hair follicles

รูปที่ 23ข, ง และ ฉ แสดงผลจากการใช้สารละลายโคโคซานจากเปลือกกุ้ง (แผลซ้าย) และกระดองปลาหมึก (แผลขวา) ในรูปสปีนจ์ความเข้มข้น 8 มก./มล. หลังผ่าตัดเป็นเวลา 3, 10 และ 21 วัน ตามลำดับ จะเห็นว่าหลังผ่าตัด 3 วัน แผลที่ใช้สารละลายโคโคซานจากทั้งสองแหล่งปากแผลเปิดมีอาการบวมแดงรอบ ๆ แต่จะค่อย ๆ หายไป และตกสะเก็ดในระยะต่อมา หลังผ่าตัด 10 วัน สะเก็ดหลุดหมด ปากแผลปิดสนิท แต่ยังเห็นรอยผ่าตัดชัดเจน รอยผ่าจางลงจนเกือบมองไม่เห็นหลังผ่าตัด 21 วัน

รูปที่ 24 แสดงผลทางเนื้อเยื่อวิทยาของแผลหลังผ่าตัด 10 วันดังกล่าวข้างต้นโดยการย้อมด้วยสี H&E และผลการวิเคราะห์ทางสถิติของการทดสอบแสดงในตารางที่ 19

รูปที่ 24ก-ข แสดงลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาของผิวหนังปกติที่ไม่ทำการผ่าตัด

รูปที่ 24ค-ง แสดงลักษณะแผลที่ใช้ 0.9% NaCl จะเห็นว่า epithelial cell เชื่อมติดกัน และชั้น epidermis เรียงตัวกันหลวม ๆ และเซลล์มีลักษณะยืดยาว มีความหนาของเซลล์มากกว่าผิวหนังปกติที่ไม่ผ่าตัด จำนวนของเซลล์ไฟโบรบลาสต์มากกว่าไฟโบรไซต์เล็กน้อยแต่ยังมีอยู่ในระดับใกล้เคียงผิวหนังปกติที่ไม่ผ่าตัด เซลล์มีการเรียงแบบขนานกัน ส่วนคอลลาเจนไฟเบอร์มีระดับปานกลางและเริ่มอัดตัวเป็นมัดชัดเจน หลอดเลือดฝอยพบ 1-20 หลอด/ field (x400) เซลล์ lymphocyte และ macrophage พบกระจายบางบริเวณ พบปริมาณของ hair follicles 4-6 follicles/ field (x400) ปฏิกริยาของเนื้อเยื่อเช่นนี้แสดงให้เห็นว่าการสมานแผลที่เกิดขึ้นใกล้เป็นปกติโดยสังเกตจากการเรียงตัวของคอลลาเจนไฟเบอร์ ปริมาณหลอดเลือดฝอยที่พบน้อยและปริมาณของเซลล์ lymphocyte และ macrophage ที่พบเหมือนผิวหนังปกติที่ไม่ผ่าตัด

รูปที่ 24จ-ฉ แสดงลักษณะแผลใช้สารละลายโคโคซานจากกระดองปลาหมึกในรูปสปีนจ์เข้มข้น 8 มก./มล. มีลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาของการสมานแผลส่วนใหญ่เหมือนกันผิวหนังที่ใช้ 0.9% NaCl จำนวนของเซลล์ไฟโบรบลาสต์และไฟโบรไซต์มีปริมาณใกล้เคียงกันอยู่ในระดับใกล้เคียงผิวหนังปกติ การเรียงของเซลล์บางบริเวณเรียงตัวขนานกัน บางบริเวณเรียงยังไม่เป็นระเบียบ คอลลาเจนไฟเบอร์อัดกันเป็นมัดชัดเจนกว่าแผลที่ใช้ 0.9% NaCl และสารละลายโคโคซานจากเปลือกกุ้ง แต่การเรียงตัวยังไม่ชัดเจนบางบริเวณเรียงในแนวอนบางบริเวณเรียงในแนวตั้ง เซลล์ lymphocyte และ macrophage พบ 1-50 เซลล์/field (x400) ซึ่งมากกว่าแผลที่ใช้ 0.9% NaCl และมี hair follicles บริเวณแผลเพียง 1-3 follicles/field ซึ่งทั้ง 3 ลักษณะมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับ

ผิวหนังปกติที่ไม่ผ่าตัด และแผลที่ใช้ 0.9% NaCl (ตารางที่ 19) จากปฏิกิริยาของเนื้อเยื่อ เช่นนี้แสดงให้เห็นว่าบริเวณแผลยังมีการอักเสบแบบเรื้อรัง

รูปที่ 24ช-ซ แสดงลักษณะแผลที่ใช้สารละลายโคโคซานจากเปลือกกุ้งใน รูปสปันจ์เข้มข้น 8 มก./มล. epithelial cell เชื่อมติดกัน ชั้น epidermis เรียงแบบ หลวม ๆ และเซลล์มีลักษณะยืดยาว มีความหนาของเซลล์มากกว่าแผลที่ใช้ 0.9% NaCl และสารละลายโคโคซานจากกระดองปลาหมึก จำนวนของเซลล์ไฟโบรบลาสต์มีปริมาณ มากกว่าไฟโบรไซต์และเรียงไม่เป็นระเบียบ คอลลาเจนไฟเบอร์ยังมีการเรียงแบบหลวม ๆ หลอดเลือดฝอยพบ 1-20 หลอด/field (x400) และลักษณะที่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับ แผลที่ใช้ 0.9% NaCl คือ ปริมาณเซลล์ lymphocyte และ macrophage พบมากกว่า 100 เซลล์/field และมี hair follicles ที่สร้างขึ้นใหม่ 1-3 follicles/field (ตารางที่ 19) จากปฏิกิริยาของเนื้อเยื่อเช่นนี้แสดงให้เห็นว่าบริเวณแผลมีการอักเสบแบบเรื้อรังและมีความรุนแรงกว่าแผลที่ใช้สารละลายโคโคซานจากกระดองปลาหมึกในรูปสปันจ์เข้มข้น 8 มก./มล. และระดับการสมานแผลยังอยู่ในระยะเริ่มต้นโดยคอลลาเจนไฟเบอร์ที่พบยัง เรียงตัวกันแบบหลวม ๆ และปริมาณ hair follicles ก็พบในปริมาณน้อย

รูปที่ 25 แสดงลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาของการสมานแผลของแผลที่ใช้ สารละลายโคโคซานจากเปลือกกุ้ง กระดองปลาหมึกในรูปสปันจ์และ 0.9% NaCl หลัง ผ่าตัด 21 วันเปรียบเทียบกับผิวหนังปกติที่ไม่ผ่าตัด โดยย้อมด้วยสี H&E และผลการ วิเคราะห์ทางสถิติของการทดสอบแสดงในตารางที่ 20

รูปที่ 25ก-ข แสดงลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาของผิวหนังที่ไม่ทำการผ่าตัด

รูปที่ 25ค-ง แสดงลักษณะแผลผ่าตัดที่ใช้ 0.9% NaCl จะเห็นว่า

epithelial cell เชื่อมติดกัน เซลล์ยังเรียงตัวแบบหลวม ๆ ชั้น basement membrane ยังแบ่งระหว่างชั้น epidermis กับชั้น dermis ไม่ชัดเจน มีจำนวนของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ และไฟโบรไซต์อยู่ในระดับใกล้เคียงกับผิวหนังปกติ เซลล์บริเวณที่อยู่ใกล้ชั้น epithelial cell เรียงขนานในแนวเดียวกัน แต่บริเวณกลางแผลยังมีการเรียงไม่เป็นระเบียบ คอลลาเจนไฟเบอร์มีระดับปานกลางและเริ่มอัดกันเป็นมัดเรียงขนานกัน หลอดเลือดฝอย ที่เข้ามาบริเวณแผล 1-20 หลอด/field (x400) เซลล์ lymphocyte และ macrophage พบกระจาย 1-50 เซลล์/field และมี hair follicles สร้างใหม่ 1-3 follicles/field

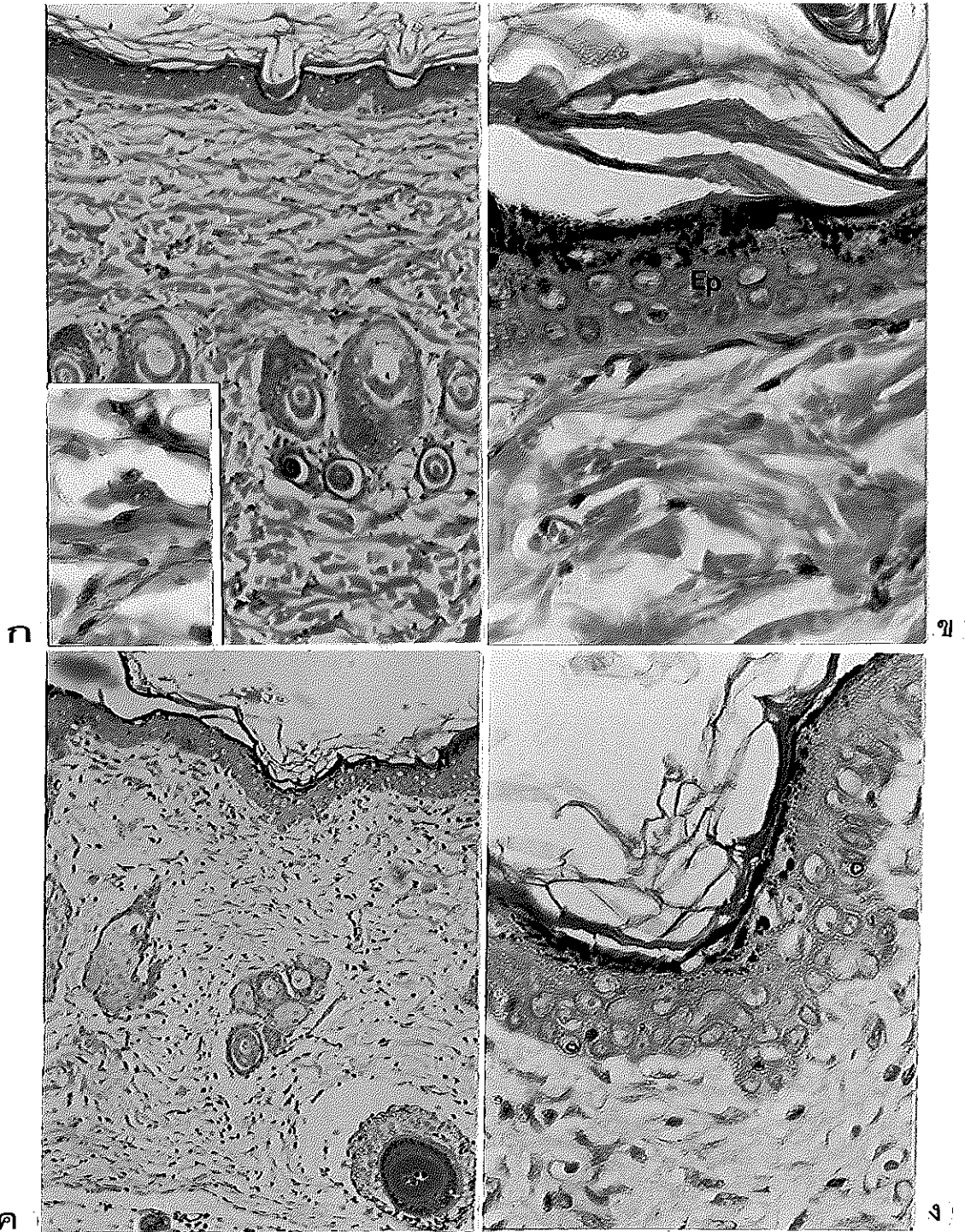
รูปที่ 25จ-ฉ แสดงลักษณะแผลที่ใช้สารละลายโคโคซานจากกระดอง ปลาหมึกในรูปสปันจ์เข้มข้น 8 มก./มล. พบลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาของการสมานแผล บางลักษณะเหมือนกับแผลที่ใช้ 0.9% NaCl ลักษณะที่พบต่างกันได้แก่ epidermis เรียง

เป็นระเบียบเป็นชั้นบาง ๆ ชั้น basement membrane แบ่งชัดเจนจากชั้น dermis ไฟโบรไซท์เรียงตัวในแนวขนานเป็นระเบียบ คอลลาเจนไฟเบอร์อัดกันเป็นมัดชัดเจน เรียงขนานกัน และมีช่องว่างระหว่างมัดไฟเบอร์ชัดเจนกว่าแผลที่ใช้โคโตซานจากเปลือกกุ้งในรูปสปันจ์เข้มข้น 8 มก./มล. และพบเซลล์ lymphocyte และ macrophage กระจายอยู่ใกล้กับชั้นกล้ามเนื้อ

รูปที่ 25ช-ช แสดงลักษณะแผลที่ใช้สารละลายโคโตซานจากเปลือกกุ้งในรูปสปันจ์เข้มข้น 8 มก./มล. พบลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาของการสมานแผลบางลักษณะที่เหมือนกับแผลที่ใช้ 0.9% NaCl เซลล์ไฟโบรไซท์เริ่มเรียงตัวขนานกัน แต่คอลลาเจนไฟเบอร์เข้ามาอยู่แบบหลวม ๆ และบางบริเวณเริ่มอัดกันเป็นมัด ที่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญคือ macrophage พบ 51-100 เซลล์/field (x400) โดยอยู่กันเป็นกระจุกใกล้ชั้นกล้ามเนื้อ ซึ่งมากกว่าที่พบในแผลที่ใช้ 0.9% NaCl และแผลที่ใช้สารละลายโคโตซานจากกระดูกปลาหมึกในรูปสปันจ์เข้มข้น 8 มก./มล.

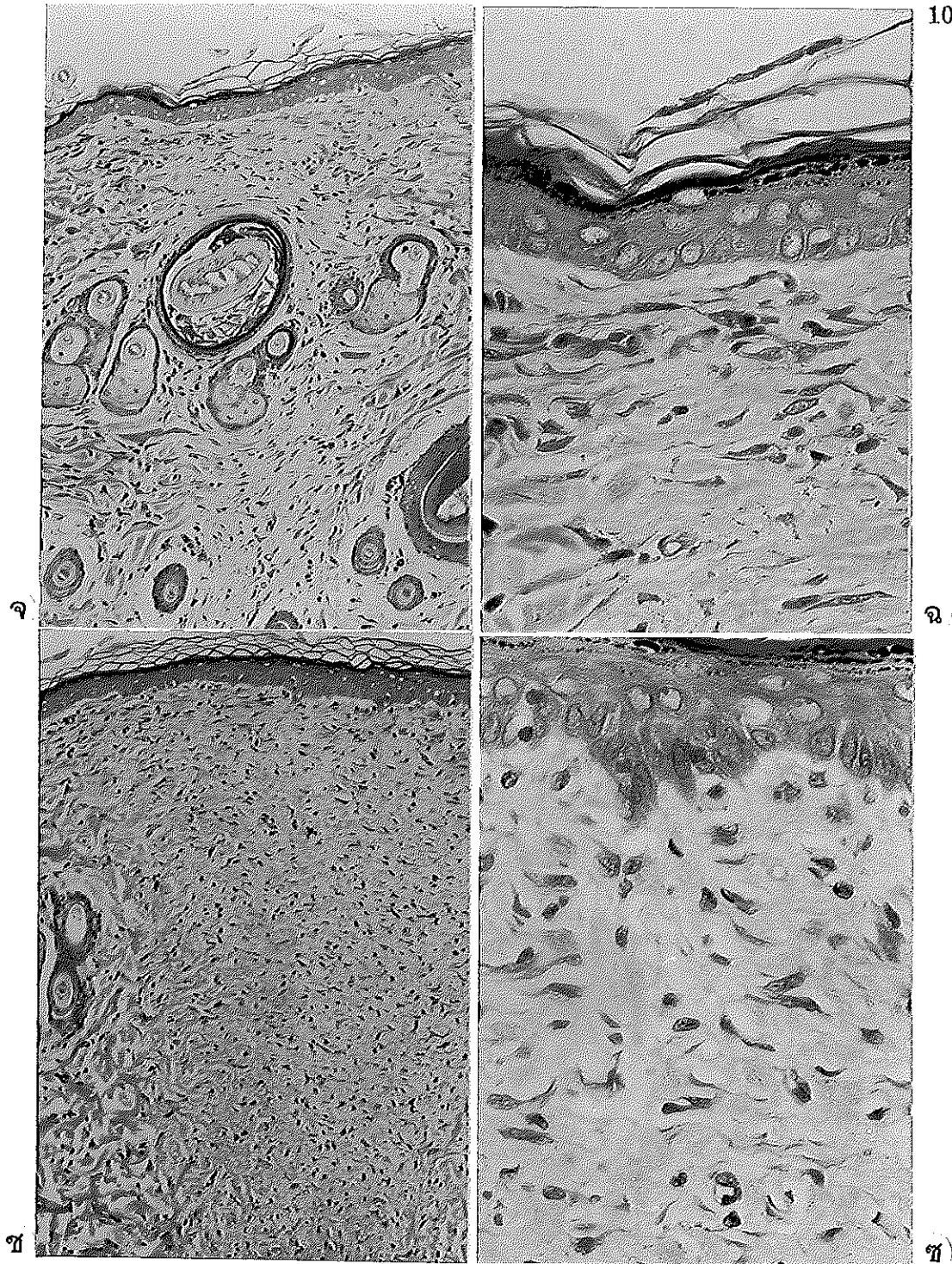
จากผลทางเนื้อเยื่อวิทยาที่ 21 วันหลังผ่าตัดจะเห็นได้ว่าแผลผ่าตัดที่ใช้สารละลายโคโตซานจากกระดูกปลาหมึกในรูปสปันจ์เข้มข้น 8 มก./มล. มีการสมานแผลที่ดีกว่าแผลที่ใช้สารละลายโคโตซานจากเปลือกกุ้งในรูปสปันจ์เข้มข้น 8 มก./มล. และชุดควบคุมที่ใช้ 0.9% NaCl และจากผลการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าในแต่ละชุดทดลองไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่จากการสังเกตในรายละเอียดยังมีความแตกต่างกัน นอกจากนั้นยังพบว่าการสมานแผลที่เกิดขึ้นยังไม่เสร็จสมบูรณ์ ซึ่งแสดงว่าจะต้องใช้เวลาในการสมานแผลที่มากกว่า 21 วันจึงจะทำให้เนื้อเยื่อดังกล่าวหายเป็นปกติได้

จากการเปรียบเทียบโคโตซานในรูปสารละลายด้วยกันพบว่าการใช้โคโตซานจากกระดูกปลาหมึกในรูปผงที่ละลายใน 1% กรดอะซิติก ความเข้มข้น 4 มก./มล. สามารถส่งเสริมการสมานแผลได้ดีกว่าโคโตซานจากแหล่งเดียวกันในรูปสปันจ์ที่ละลายใน 0.9% NaCl ความเข้มข้น 8 มก./มล. ซึ่งเมื่อพิจารณาข้อดีก็คือความเข้มข้นที่ใช้ต่ำกว่า และลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาที่บ่งบอกถึงการสมานแผลที่ดีก็คือ คอลลาเจนไฟเบอร์เรียงตัวเป็นมัดชัดเจนกว่า และในชั้น epidermis เซลล์มีความบางใกล้เคียงกับผิวหนังปกติที่ไม่ทำการผ่าตัดและยังพบว่าเซลล์ lymphocyte และ macrophage มีปริมาณน้อยกว่า



รูปที่ 25 แสดงลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาของการสมานแผลที่ทำการผ่าตัดบริเวณผิวหนังบนหลังหนูแรทหลังจากใช้สับินจิตโตซานที่ละลายใน 0.9% NaCl เป็นเวลา 21 วันโดยย้อมสี H&E

- ก. ลักษณะผิวหนังที่ไม่ทำการผ่าตัด (X100), รูปเล็กมุมซ้ายล่าง : แสดงการเรียงตัวเป็นมัดของคอลลาเจนไฟเบอร์(X400) ข. Ep แสดงการเรียงตัวของเซลล์ในชั้น epidermis ของผิวหนังปกติ
- ค. ลักษณะผิวหนังที่ผ่าตัดแล้วใช้ 0.9% NaCl (X100) ง. แสดงการเรียงตัวของเซลล์ชั้น epidermis จากข้อ ค ที่เรียงตัวแบบหลวม ๆ และการเรียงตัวของไฟโบรบลาสและไฟโบรไซท์ รวมทั้งคอลลาเจนไฟเบอร์ที่เรียงตัวในแนวขนานกับผิว (X400)



รูปที่ 25 (ต่อ)

- จ. ลักษณะผิวหนังที่ผ่าตัดแล้วใช้สารละลายโคโคซานจากกระดองปลาหมึกในรูปสปีนจ์ความเข้มข้น 8 มก./มล. (X100) ฉ. แสดงการเรียงตัวของเซลล์ชั้น epidermis จากข้อ จ เป็นชั้นบาง และเซลล์ไฟโบรบลาสต์ และไฟโบรไซท์ รวมทั้งคอลลาเจนไฟเบอร์ที่เรียงตัวในแนวขนานกับผิว (X400)
- ข. ลักษณะผิวหนังที่ผ่าตัดแล้วใช้สารละลายโคโคซานจากเปลือกกุ้งในรูปสปีนจ์ความเข้มข้น 8 มก./มล. (X100) ช. แสดงการเรียงตัวของเซลล์ชั้น epidermis จากข้อ ช ที่เรียงตัวแบบหลวม ๆ และการเรียงตัวของไฟโบรบลาสต์และไฟโบรไซท์ที่เรียงตัวในแนวตั้งฉากกับผิว คอลลาเจนไฟเบอร์เริ่มเรียงอัดตัวเป็นมัด (X400)

ตารางที่ 20 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติจากการทดสอบทางเนื้อเยื่อวิทยาของหนูแรทที่ใช้โคโคซานในกลุ่มบินซ์
ที่ละลายใน 0.9% NaCl ครบ 21 วัน

สิ่งที่ตรวจ	ผิวหนังปกติ ที่ไม่ผ่าตัด	0.9% NaCl	โคโคซานจาก	
			กระดองปลาหมึก (8 มก/มล)	เปลือกกุ้ง (8 มก/มล)
Ep ^{ns}	3	3	3	3
Fb	1 ^a	2 ^b	2 ^b	2 ^b
Fc	1 ^a	2 ^b	2 ^b	2 ^b
Cd	1 ^a	2 ^b	2 ^b	2 ^b
Cf	3 ^a	2 ^b	2 ^b	2 ^b
Vc	1 ^a	2 ^b	2 ^b	2 ^b
Lm	1 ^a	2 ^b	2 ^b	2 ^b
Mc	1 ^a	2 ^b	2 ^b	3 ^c
Hair	3 ^a	1 ^b	1 ^b	1 ^b

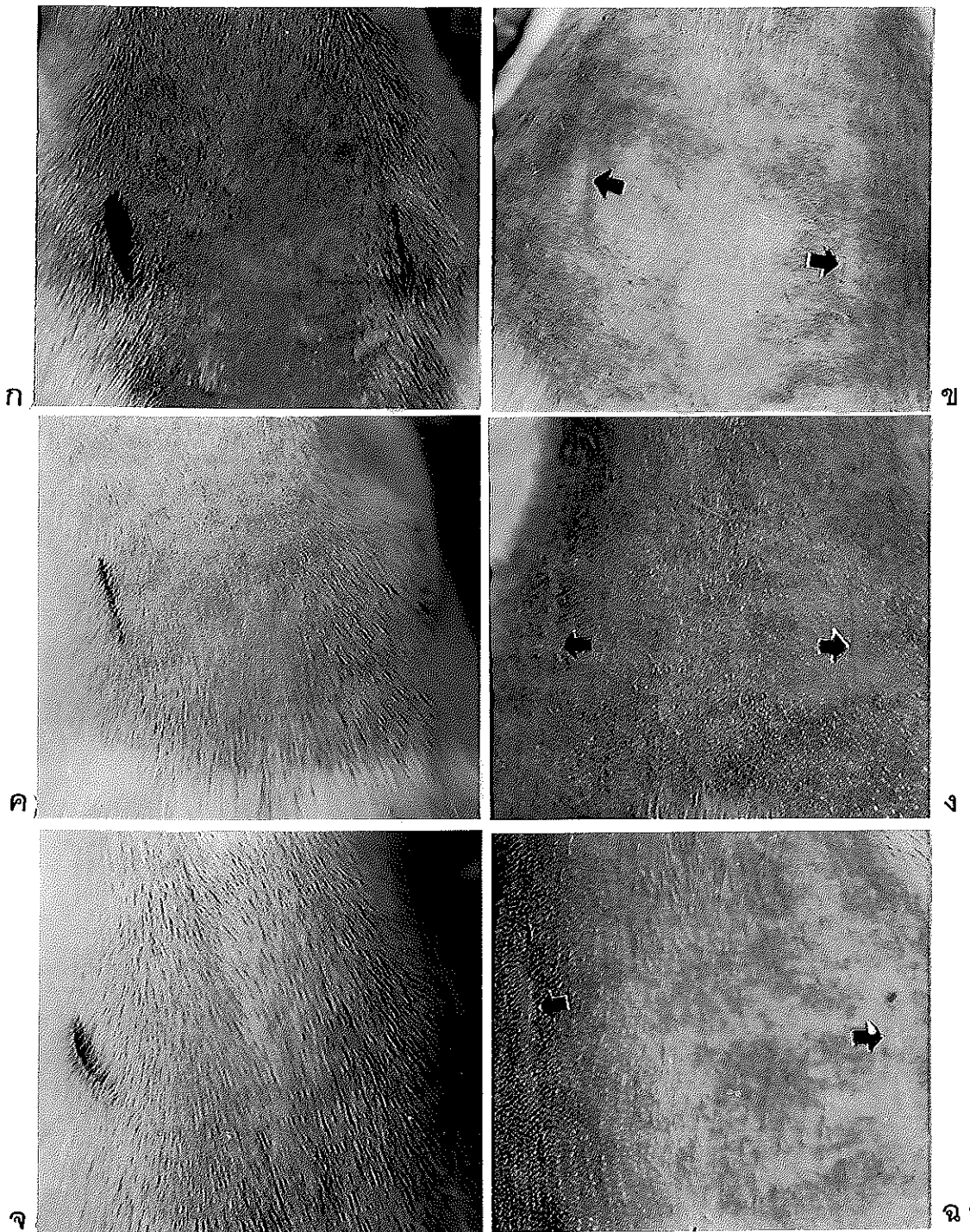
ns : ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p > 0.05$)

ค่าฐานนิยมตัวเลขในแถวเดียวกันที่กำกับด้วยตัวอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างกันทางสถิติจากการตรวจ
โดยใช้โปรแกรม Nonparametric แบบ Kruskal-wallis

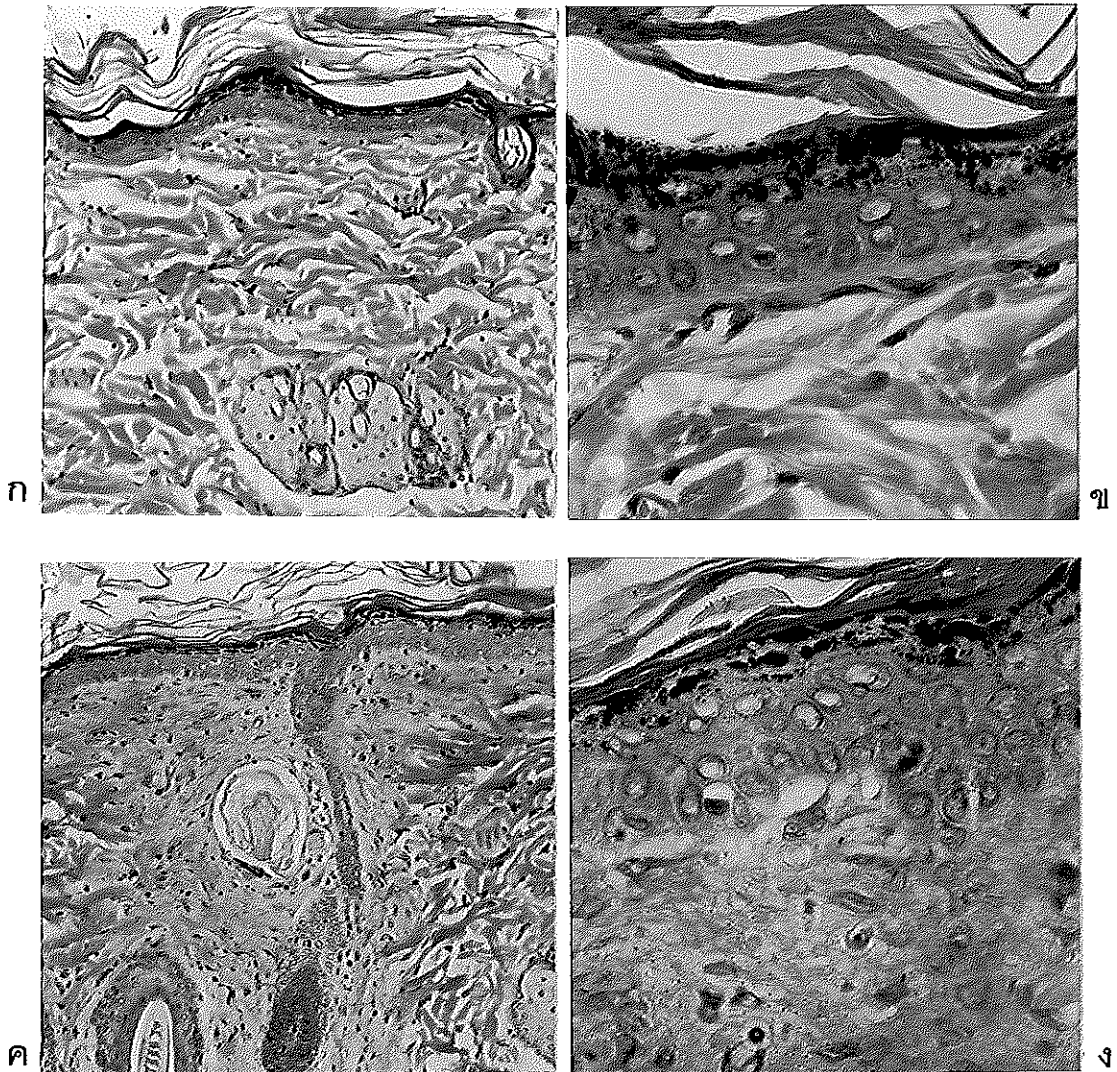
Ep: ลักษณะของ epithelial cell, Fb: จำนวนไฟโบรบลาสต์, Fc: ไฟโบรไซท์, Cd: ปริมาณคอลลาเจนไฟเบอร์,

Cf: การเรียงตัวของคอลลาเจนไฟเบอร์, Vc: ปริมาณหลอดเลือดฝอย, Lm: ปริมาณ lymphocyte,

Mc: ปริมาณ macrophage, Hair: ปริมาณ hair follicles

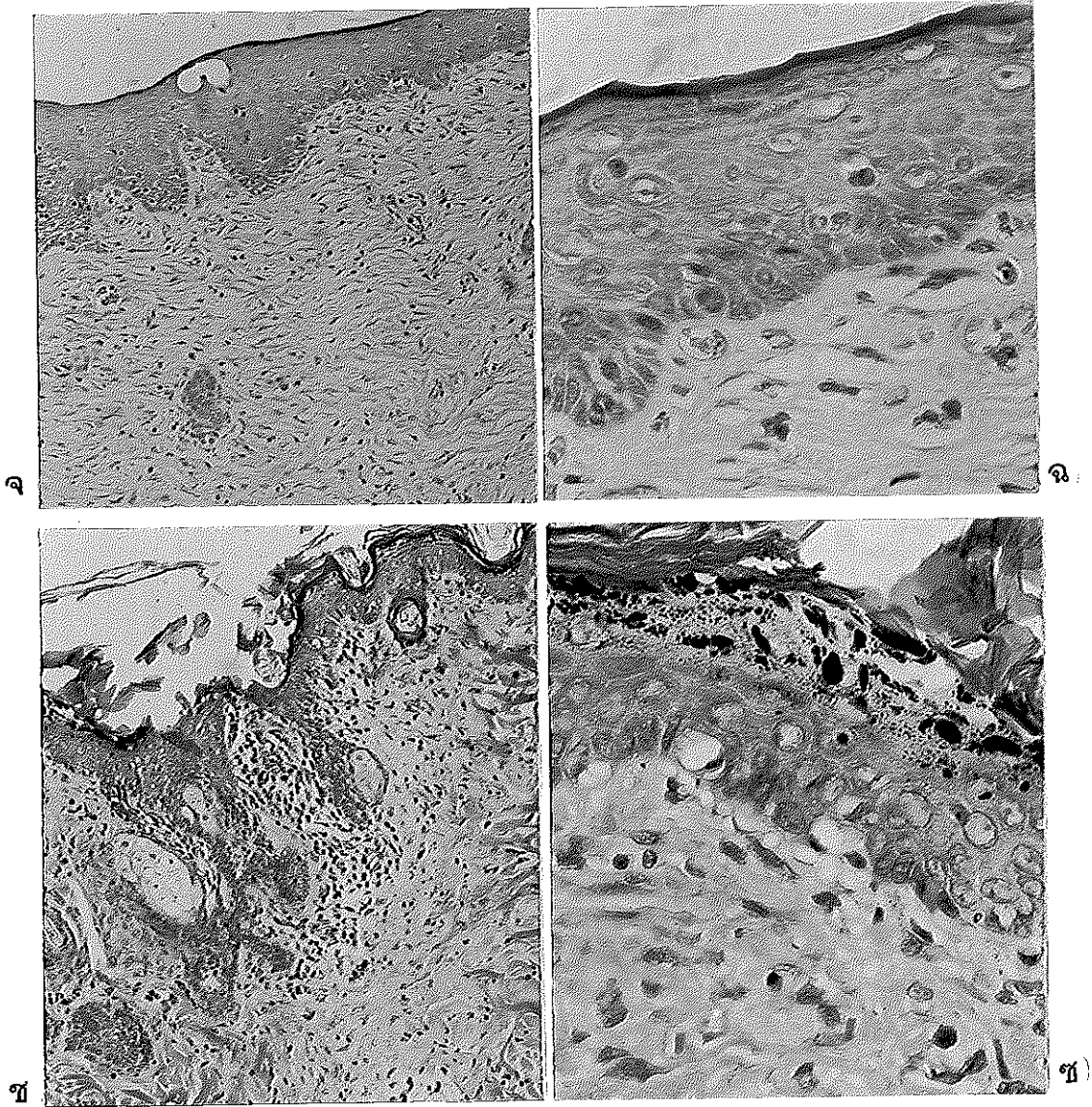


รูปที่ 26 แสดงแผลผ่าตัดหลังจากใช้โคตินและโคโตซานในรูปผงเป็นเวลา 3 และ 21 วัน
 แผลซ้ายใช้ผงโคตินจากเปลือกกุ้งและแผลขวาใช้ผงโคตินจากกระดองปลาหมึกหลังผ่าตัด 3 วัน, ก;
 21 วัน, ข
 แผลซ้ายไม่ใส่สารใด ๆ และแผลขวาใช้ผงโคโตซานจากเปลือกกุ้งหลังผ่าตัด 3 วัน, ค; 21 วัน, ง
 แผลซ้ายไม่ใส่สารใด ๆ และแผลขวาใช้ผงโคโตซานจากกระดองปลาหมึกหลังผ่าตัด 3 วัน, ฉ;
 21 วัน, ฉ (ลูกศรชี้แสดงรอยแผลหลังการผ่าตัด 21 วัน)



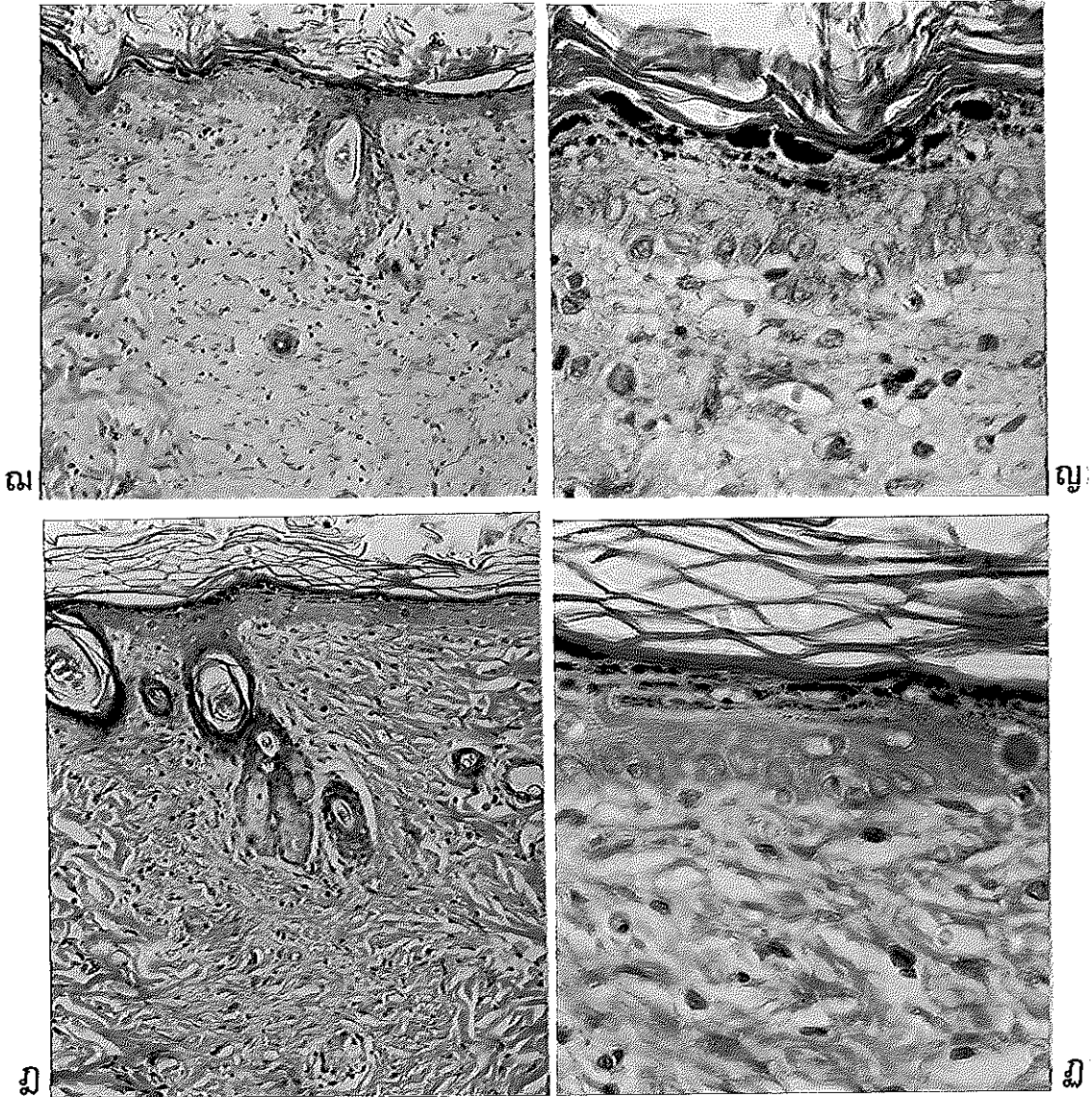
รูปที่ 27 แสดงลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาของการสมานแผลที่ทำการผ่าตัดบริเวณผิวหนังบนหลังของหนูแรท หลังจากใส่ผงโคคินหรือโคโคซาน เป็นเวลา 21 วัน โดยการย้อมสี H&E

- ก. ผิวหนังปกติที่ไม่ทำการผ่าตัด (X100) ข. Ep แสดงการเรียงตัวของเซลล์ในชั้น epidermis ของผิวหนังปกติ และการเรียงของคอลลาเจนไฟเบอร์ที่อัดตัวเป็นมัด (X400)
- ค. ผิวหนังที่ผ่าตัดแต่ไม่ใส่สารใด ๆ (X100) ง. แสดงการเรียงตัวของเซลล์ในชั้น epidermis จากข้อ ค เซลล์เรียงไม่เป็นระเบียบ และไฟโบรบลาสและไฟโบรไซต์ยังเรียงตัวไม่เป็นระเบียบ คอลลาเจนไฟเบอร์เริ่มอัดเป็นมัด (X400)



รูปที่ 27 (ต่อ)

- จ. ผิวหนังที่ผ่าตัดและใช้โคโตซานจากกระดองปลาหมึกในรูปผง (X100) ฉ. แสดงการเรียงตัวของเซลล์ในชั้น epidermis จากข้อ จ เซลล์หนาเรียงตัวแบบหลวม ๆ เซลล์ไฟโบรบลาส ไฟโบรไซต์ และคอลลาเจนไฟเบอร์เรียงในแนวขนานกับผิว (X400)
- ช. ผิวหนังที่ผ่าตัดและใช้โคโตซานจากเปลือกกุ้งในรูปผง (X100) ซ. จากข้อ ช แสดงการเรียงตัวของเซลล์ในชั้น epidermis หนาและเรียงตัวแบบหลวม ๆ เซลล์ไฟโบรบลาส และไฟโบรไซต์มีการเรียงตัวในแนวตั้งฉากกับผิว (X400)



รูปที่ 27 (ต่อ)

- ณ. ผิวหนังที่ผ่าตัดและใช้โคตินจากกระดูกปลาหมึกในรูปผง (X100) ณ. จากข้อ ณ แสดงการเรียงตัวของเซลล์ในชั้น epidermis เซลล์บวมและเรียงตัวไม่เป็นระเบียบ ไฟโบรไซท์ ไฟโบรบลาสและคอลลาเจนไฟเบอร์เรียงตัวในแนวขนานกับผิว (X400)
- ญ. ผิวหนังที่ผ่าตัดและใช้โคตินจากเปลือกกุ้งในรูปผง (X100) ญ. แสดงการเรียงตัวของเซลล์ในชั้น epidermis บางเป็นระเบียบ ไฟโบรไซท์ ไฟโบรบลาส และคอลลาเจนไฟเบอร์เรียงตัวในแนวขนานกับผิว (X400)

ตารางที่ 21 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติจากการทดสอบทางเนื้อเยื่อวิทยาของหนูแรทที่ใช้โคโตซานและโคติน
 ในรูปผง ครบ 21 วัน

สิ่งที่ตรวจ	ผิวหนังปกติ		โคโตซานจาก		โคตินจาก	
	ไม่ผ่าตัด	ไม่ใช้สารใดๆ	กระดองปลานมึก	เปลือกกุ้ง	กระดองปลานมึก	เปลือกกุ้ง
Ep ^{ns}	3	3	3	3	3	3
Fb	1 ^a	2 ^b	3 ^b	2 ^b	2 ^b	2 ^b
Fc	1 ^a	2 ^b	3 ^b	2 ^b	2 ^b	2 ^b
Cd	1 ^a	2 ^b	2 ^b	2 ^b	2 ^b	2 ^b
Cf	3 ^a	2 ^b	2 ^b	2 ^b	2 ^b	2 ^b
Vc	1 ^a	2 ^b	2 ^b	2 ^b	2 ^b	2 ^b
Lm	1 ^{ac}	1 ^{bc}	3 ^b	2 ^b	2 ^b	2 ^b
Mc ^{ns}	1	1	3	2	2	2
Hair ^{ns}	3	2	1	2	2	2

ns : ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p>0.05$)

ค่าฐานนิยมตัวเลขในแถวเดียวกันที่กำกับด้วยตัวอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างกันทางสถิติจากการตรวจ
 โดยใช้โปรแกรม Nonparametric แบบ Kruskal-wallis

Ep: ลักษณะของ epithelial cell, Fb: จำนวนไฟโบร بلاส, Fc: ไฟโบรไซท์, Cd: ปริมาณคอลลาเจนไฟเบอร์,
 Cf: การเรียงตัวของคอลลาเจนไฟเบอร์, Vc: ปริมาณหลอดเลือดฝอย, Lm: ปริมาณ lymphocyte,
 Mc: ปริมาณ macrophage, Hair: ปริมาณ hair follicles

3.7.3 ผลของการใช้โคตินและโคโคซานในรูปผงต่อการสมานแผล

รูปที่ 26ก, ค และ จ แสดงแผลเมื่อใช้โคตินหรือโคโคซานจากกระดองปลาหมึกและจากเปลือกกุ้งในรูปผงหลังจากผ่าตัด 3 วัน เปรียบเทียบกับแผลผ่าตัดที่ไม่ใช้สารใด ๆ จะเห็นว่าทั้งแผลที่ใช้ผงโคตินหรือโคโคซานมีลักษณะไม่แตกต่างกันจากแผลผ่าตัดที่ไม่ใช้สารใด ๆ คือปากแผลเปิดและยังคงแดงอยู่ บางแผลเริ่มปิดไม่พบอาการบวมรอบ ๆ แผล หลังจากนั้นแผลเริ่มตกสะเก็ดและหลุดลอกออกไป รูปที่ 26ข, ง และ ฉ แสดงแผลหลังผ่าตัด 21 วัน พบว่าปากแผลปิดเชื่อมติดกันสนิท มองเห็นรอยแผลผ่าตัดจาง และเมื่อตัดชั้นเนื้อบริเวณแผลศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาโดยการย้อมด้วยสี H&E แสดงดังรูปที่ 27ก-ฎ และผลการวิเคราะห์ทางสถิติแสดงดังตารางที่ 21

รูปที่ 27ก-ข แสดงลักษณะของเนื้อเยื่อวิทยาของผิวหนังที่ไม่ทำการผ่าตัด

รูปที่ 27ค-ง แสดงลักษณะแผลผ่าตัดที่ไม่ใช้สารใด ๆ ใสแผล หลังผ่าตัด 21 วัน ชั้น epithelial cell เชื่อมติดกัน ชั้น epidermis บางและเซลล์เรียงไม่เป็นระเบียบ ไฟโบรบลาสต์และไฟโบรไซต์มีปริมาณใกล้เคียงผิวหนังปกติที่ไม่ผ่าตัด แต่ยังคงเรียงไม่เป็นระเบียบ คอลลาเจนไฟเบอร์มีระดับปานกลางบริเวณกลางแผลยังเรียงตัวแบบหลวม ๆ และบริเวณขอบของแผลเริ่มอัดตัวเป็นมัด พบหลอดเลือดฝอย 1-20 หลอด/field (x400) เซลล์ lymphocyte และ macrophage พบบางบริเวณ และมี hair follicles 4-6 follicles/field

รูปที่ 27จ-ฉ แสดงลักษณะแผลผ่าตัดที่ใช้ผงโคโคซานจากกระดองปลาหมึก จะเห็นว่า epithelial cell เชื่อมติดกัน ชั้น epidermis หนาเรียงตัวแบบหลวม ๆ เซลล์ไฟโบรบลาสต์ ไฟโบรไซต์มีระดับปานกลางและเรียงในแนวขนาน คอลลาเจนไฟเบอร์ มีระดับปานกลางและเริ่มอัดตัวเป็นมัดเรียงในแนวขนานกัน พบหลอดเลือดฝอย 1-20 หลอด/field (x400) เซลล์ lymphocyte และ macrophage 51-100 เซลล์/field กระจายอยู่ใกล้ชั้นกล้ามเนื้อ hair follicles บริเวณแผลที่สร้างขึ้นใหม่ 1-3 follicles/field จากปฏิกิริยาของเนื้อเยื่อเช่นนี้แสดงให้เห็นได้ว่าแผลยังมีการอักเสบแบบเรื้อรังและการสมานแผลที่เกิดขึ้นใกล้เป็นปกติ

รูปที่ 27ช-ซ แสดงผลทางเนื้อเยื่อวิทยาของแผลที่ใช้ผงโคโคซานจากเปลือกกุ้ง จะเห็นว่า epithelial cell เชื่อมติดกัน epidermis หดเข้าหากันและวางตัวเป็นคลื่นเมื่อเปรียบเทียบกับผิวหนังปกติ epidermis มีผิวเรียบและเรียงเป็นระเบียบ ชั้น epidermis หนากว่าแผลที่ใช้ผงโคโคซานจากกระดองปลาหมึก และยังคงเรียงแบบหลวม ๆ เซลล์ไฟโบรบลาสต์ และไฟโบรไซต์มีระดับใกล้เคียงกับผิวหนังปกติที่ไม่ผ่าตัด และมีการ

เรียงตัวในแนวตั้งฉากกับผิว คอลลาเจนมีระดับปานกลางและเริ่มอัดเป็นมัดเรียงในแนวเดียวกับไฟโบรบลาส พบหลอดเลือดฝอย 1-20 หลอด/field (x400) พบเซลล์ lymphocyte และ macrophage 1-50 เซลล์/field กระจายอยู่ใกล้กับชั้น epidermis และพบ hair follicles บริเวณแผลที่สร้างขึ้นใหม่ 4-6 follicles/field ปฏิกริยาของเนื้อเยื่อเช่นนี้แสดงว่ายังคงมีการอักเสบแบบเรื้อรังอยู่ แต่พบเซลล์ lymphocyte และ macrophage อยู่น้อยกว่าแผลที่ใช้ผงโคโคซานจากกระดองปลาหมึก และระดับการสมานแผลยังอยู่ในระยะเริ่มต้นซึ่งสังเกตจากลักษณะการจัดเรียงของไฟโบรบลาส ไฟโบรไซท์และคอลลาเจนไฟเบอร์

รูปที่ 27ฉ-ญ แสดงผลทางเนื้อเยื่อวิทยาของแผลที่ใช้ผงโคโคซานจากกระดองปลาหมึกจะเห็นว่า epithelial cell เชื่อมติดกัน ชั้น epidermis เซลล์ยังบวมอยู่และเรียงตัวไม่เป็นระเบียบ ไฟโบรไซท์มีปริมาณมากกว่าเซลล์ไฟโบรบลาสและมีระดับใกล้เคียงกับผิวหนังปกติที่ไม่ผ่าตัด และมีการเรียงตัวในแนวขนานกับผิวเช่นเดียวกับคอลลาเจนไฟเบอร์ซึ่งเริ่มมีการอัดตัวเป็นมัดเล็ก ๆ กระจายอยู่ในระดับปานกลาง พบหลอดเลือดฝอย 1-20 หลอด/field (x400) เซลล์ lymphocyte และ macrophage 51-100 เซลล์/field กระจายอยู่ใกล้ชั้นกล้ามเนื้อและกำลังห้อมล้อมวัตถุเป็นชิ้นเล็ก ๆ ใส ซึ่งอาจเป็นผงโคโคซานที่ยังดูดซึมไม่หมด และพบ hair follicles บริเวณแผลที่สร้างขึ้นใหม่ 4-6 follicles/field จากปฏิกริยาของเนื้อเยื่อจะเห็นได้ว่ายังคงมีการอักเสบแบบเรื้อรังอยู่ และการสมานแผลที่เกิดขึ้นใกล้เป็นปกติ

รูปที่ 27ฉ-ฎ แสดงผลทางเนื้อเยื่อวิทยาของแผลที่ใช้ผงโคโคซานจากเปลือกกุ้งจะเห็นว่า epithelial cell เชื่อมติดกัน เซลล์บางมีลักษณะใกล้เคียงกับผิวหนังปกติ ไฟโบรไซท์และไฟโบรบลาสมีระดับปานกลาง คือ 40-60 เซลล์/field (x400) และคอลลาเจนไฟเบอร์เรียงในแนวขนานกับผิวเรียงตัวอัดเป็นมัดชัดเจน พบหลอดเลือดฝอย 1-20 หลอด/field ในชั้น dermis ยังคงพบผงโคโคซาน lymphocyte และ macrophage จำนวนมากเหมือนกับผิวหนังที่ใช้โคโคซานจากกระดองปลาหมึก

ตารางที่ 21 แสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าแผลที่ใช้และไม่ใช้โคโคซานหรือโคโคซานจากกระดองปลาหมึกและเปลือกกุ้งในรูปผงลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาไม่มีความแตกต่างกัน

เมื่อเปรียบเทียบการเร่งสมานแผลระหว่างโคโคซานทั้ง 2 แหล่งในรูปผงกับชุดควบคุมที่ผ่าตัดแต่ไม่ใช้สารใด ๆ พบว่าโคโคซานจากกระดองปลาหมึกมีการสมานแผลดีกว่าโคโคซานจากเปลือกกุ้งและชุดควบคุม โดยในชั้น epidermis ของทุกชุดทดลอง

เซลล์มีการเรียงตัวแบบหลวม ๆ เหมือนกัน ลักษณะที่เห็นได้ชัดเจนคือแผลที่ใช้โคโตซาน จากกระดองปลาหมึกมีคอลลาเจนไฟเบอร์เรียงเป็นมัด เซลล์ไฟโบรบลาสต์และไฟโบรไซท์ เรียงในแนวขนานเป็นระเบียบกว่าแผลที่ใส่โคโตซานจากเปลือกกุ้ง แต่แผลที่ใช้โคโตซาน จากทั้ง 2 แหล่งยังคงพบโคโตซานเหลืออยู่บริเวณชั้น dermis และชั้น subcutaneous ซึ่งย้อมติดสีแดงและมีเซลล์ lymphocyte และ macrophage เข้ามาจำนวนมาก

เมื่อเปรียบเทียบการเร่งสมานแผลของโคตินทั้ง 2 แหล่งในรูปผง กับชุด ควบคุมที่ผ่าตัดแต่ไม่ใช้สารใด ๆ พบว่าแผลที่ใส่โคตินจากเปลือกกุ้งมีการสมานแผลดีกว่า โคตินจากกระดองปลาหมึกและชุดควบคุม แผลที่ใช้โคตินจากเปลือกกุ้งในชั้น epidermis เซลล์บางมีลักษณะใกล้เคียงกับผิวหนังปกติ คอลลาเจนไฟเบอร์อัดตัวเป็นมัดชัดเจน ในขณะที่แผลที่ใช้โคตินจากกระดองปลาหมึกเซลล์ยังอยู่แบบหลวม ๆ และแผลจากที่ใช้ โคตินจากทั้ง 2 แหล่ง ยังคงพบโคตินผงเหลืออยู่บริเวณแผลย้อมติดสีชมพู และเซลล์ lymphocyte และ macrophage เข้ามาอยู่รอบ ๆ จำนวนมาก

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างโคตินและโคโตซานจากกระดองปลาหมึกในรูปผง ต่อการเร่งสมานแผล พบว่าโคโตซานจากกระดองปลาหมึกส่งเสริมการสมานแผลดีกว่า

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างโคตินจากเปลือกกุ้งกับโคโตซานจากกระดอง ปลาหมึกในรูปผง พบว่าโคตินจากเปลือกกุ้งส่งเสริมการสมานแผลดีกว่า โดย epidermis ของแผลที่ใช้โคตินจากเปลือกกุ้งบางกว่าและมีลักษณะใกล้เคียงกับผิวหนังปกติมากกว่าและ คอลลาเจนไฟเบอร์เรียงเป็นมัดชัดเจน ในขณะที่แผลที่ใช้โคโตซานจากกระดองปลาหมึก ชั้น epidermis หนากว่าปกติ

บริเวณแผลที่ทำการผ่าตัดที่มีการใช้โคตินและโคโตซานนั้นพบเซลล์ macrophage เป็นจำนวนมาก อาจเนื่องจากการกระตุ้นโดยโคโตซาน Muzzarelli (1996 อ้างโดย Muzzarelli, 1997) กล่าวว่า macrophage จะสังเคราะห์ lysozyme ออกมาย่อยโคตินหรือโคโตซานให้เป็นโมเลกุลคู่ (oligomer) โดยไปกระตุ้น macrophage ให้สร้าง nitric oxide กระตุ้น oxygen species, tumor necrosis factor- α , interferon และ interleukin-1 macrophage ที่ถูกกระตุ้นจะทำให้มีการเพิ่มขึ้นของ lysozyme, chitinase และ N-acetyl- β -D-glucosaminidase ซึ่งจะเข้าไปย่อยโคติน และโคโตซานให้เป็นโมเลกุลเดี่ยว โดยโมเลกุลเดี่ยวของ aminosugar ทำให้มีการสร้าง ไฟโบรบลาสต์โดยปฏิกิริยาของ interleukin-1 และการทำงานร่วมกันของ chondroitin 4- และ 6-sulfate, hyaluronan และ keratan sulfate ซึ่งเป็นตัวชักนำให้มีการ เข้ามาของคอลลาเจน ซึ่งจะขึ้นอยู่กับ chito-oligomers ด้วย

Peluso *et al.* (1994) ทำการศึกษาโดยฝังแผ่นฟิล์มโคโตซานเข้าไปใต้หนังกำพร้าของหนูแรทพบว่าหลังจาก 14 วัน การสมานแผลยังเกิดขึ้นไม่สมบูรณ์ และ Muzzarelli *et al.* (1988 อ้างโดย Peluso *et al.*, 1994) กล่าวว่า การย่อยของโคโตซานที่ใส่เข้าไปในสัตว์ทดลองจะเกิดขึ้นสมบูรณ์หลังจาก 60 วัน และการกำจัดโคโตซานสามารถเห็นได้ชัดเจนเพราะมีการย่อยสลายโดย lysozyme และเอนไซม์ชนิดอื่น ๆ ในร่างกาย

Yomata *et al.* (1990 อ้างโดย Peluso *et al.*, 1994) กล่าวว่า อัตราการย่อยสลายแผ่นฟิล์มโคโตซานด้วยเอนไซม์นั้นขึ้นอยู่กับระดับการกำจัดหมู่อะซิติกในขั้นตอนการผลิตโคโตซาน (degree of deacetylation) คืออัตราการย่อยสลายลดลงเมื่อระดับการกำจัดหมู่อะซิติกเพิ่มขึ้น และในสภาวะ pH เป็นกรดจะทำให้เกิดการอักเสบบริเวณที่ใช้ได้ และยังส่งเสริมการย่อยได้มากกว่าในสภาวะที่ pH เป็นกลาง

ในการตัดสินระดับของการสมานแผลนั้นมีปรากฏในรายงานหลายฉบับ แผลที่มีการสมานแผลเกิดขึ้นมักพบเซลล์ที่เข้ามาบริเวณแผลคือ โฟโบรบลาส พร้อมกับคอลลาเจนที่มีปริมาณมากขึ้น นอกจากนี้ยังมีหลอดเลือดฝอยที่สร้างขึ้นใหม่ (Biagini *et al.*, 1991; Peluso *et al.*, 1994; Damjanov, 1996 and DaCosta *et al.*, 1998) นอกจากการสังเกตการหายของแผลจากลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาแล้วยังมีวิธีอื่นๆ อีกเช่น การวัดค่า wound strength โดยการนำชิ้นเนื้อบริเวณที่ศึกษาการสมานแผลไปวัดค่าของแรงดึงที่ทำให้ชิ้นเนื้อขาดออกจากกัน ซึ่งค่าของ wound strength จะแปรผันตามปริมาณของคอลลาเจน โดยพบว่าเนื้อเยื่อของแผลที่มีการสมานแผลดีกว่าจะมีค่า wound strength ที่มากกว่า (DaCosta *et al.*, 1998) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาครั้งนี้ โดยพบว่า แผลที่มีการสมานดีกว่าจะมีคอลลาเจนไฟเบอร์ที่อัดตัวกันเป็นมัดและเรียงในแนวขนานกับผิวซึ่งถ้านำไปวัดค่า wound strength ก็จะทำให้ได้ค่าที่สูงกว่าแผลที่คอลลาเจนไฟเบอร์มีการเรียงตัวแบบหลวม ๆ

3.8 ผลการศึกษาความปลอดภัยของการใช้โคโตซานกับสัตว์ทดลอง

3.8.1 ผลกระทบหลังการฉีดสารละลายโคโตซานเข้าใต้ผิวหนังของหนูทดลอง

เมื่อนำสารละลายโคโตซานซึ่งเตรียมจากรูปผงทั้งจากกระดองปลาหมึกและเปลือกกุ้งที่ละลายใน 1% กรดอะซิติก ให้มีความเข้มข้น 8 และ 4 มก./มล. และสารละลายโคโตซานทั้ง 2 แห่งในรูปสปันจ์ที่ละลายใน 0.9% NaCl ให้มีความเข้มข้นเท่ากันคือ 4 มก./มล. ฉีดเข้าใต้ผิวหนังที่บริเวณต้นคอทั้งด้านซ้ายและขวาของหนูทดลอง สังเกตการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นหลังการฉีดทันที หลังการฉีด 6, 12, 24 ชั่วโมง, 2, 40 และ 61 วัน

พบว่าในระยะแรกจะเกิดอาการบวมรอบบริเวณที่ฉีดสารละลายทุกชนิดที่ทดสอบ แต่บริเวณซึ่งฉีดเฉพาะ 1% กรดอะซิติก และ 0.9% NaCl (เป็นชุดควบคุม) อาการบวมจะค่อย ๆ หายไปภายในเวลาประมาณ 6 ชั่วโมง

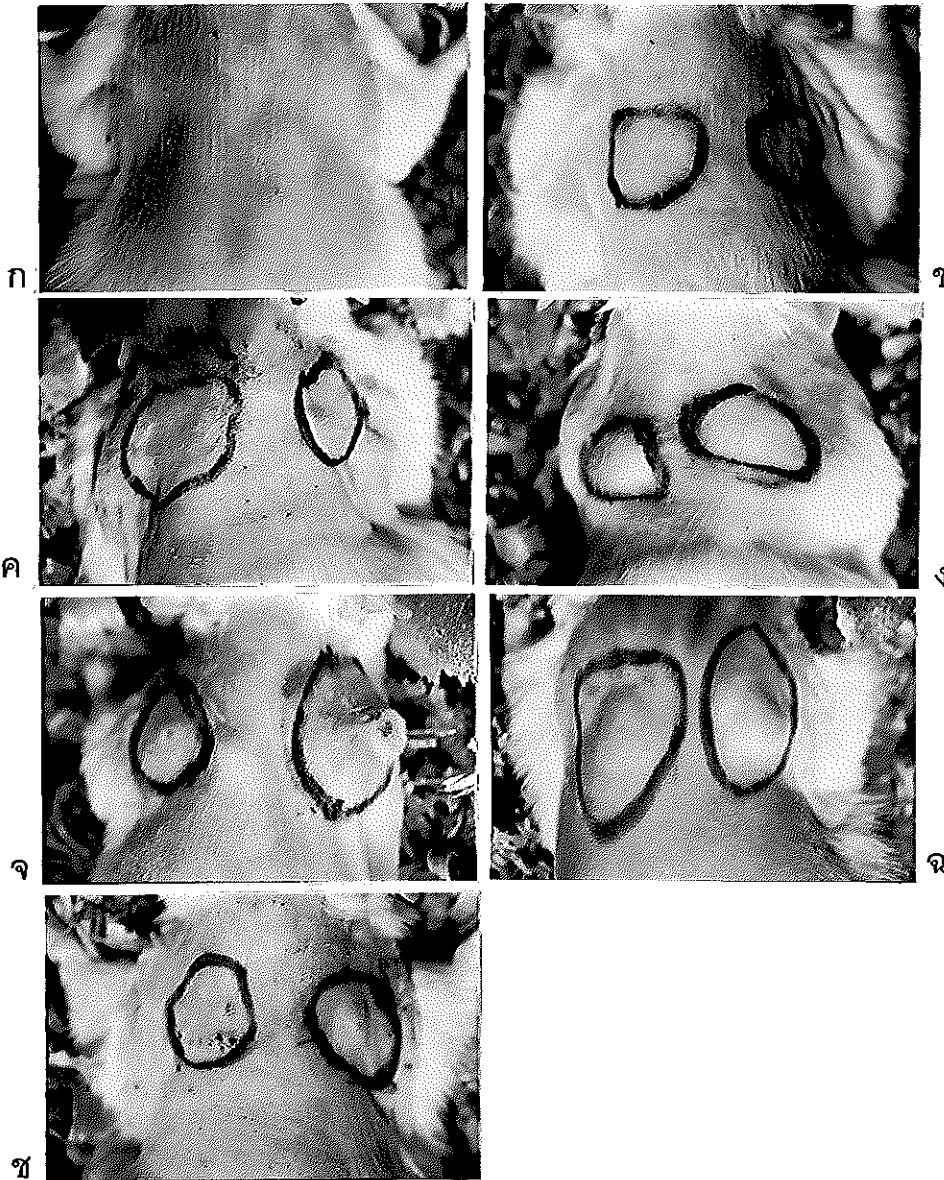
หลังจากฉีดสารละลายตัวอย่าง 12 ชั่วโมง พบว่าบริเวณที่ฉีดสารละลายโคโคซานจากเปลือกกุ้งทั้งในรูปผงและสปันจ์ มีการบวมระดับปานกลาง เมื่อเปรียบเทียบกับบริเวณที่ฉีดสารละลายโคโคซานกระดองปลาหมึกทั้งรูปผงและสปันจ์เกิดอาการบวมระดับน้อยถึงปานกลาง

หลังจากฉีดสารตัวอย่าง 24 ชั่วโมง โดยทั่วไปจะสังเกตเห็นอาการบวมลดลง โดยบริเวณที่ฉีดสารละลายโคโคซานจากเปลือกกุ้งและกระดองปลาหมึกในรูปผง และเปลือกกุ้งในรูปสปันจ์ มีอาการบวมในระดับปานกลางถึงน้อย เมื่อเปรียบเทียบกับบริเวณที่ฉีดสารละลายโคโคซานจากกระดองปลาหมึกในรูปสปันจ์ยังคงมีการบวมอยู่ในระดับน้อย

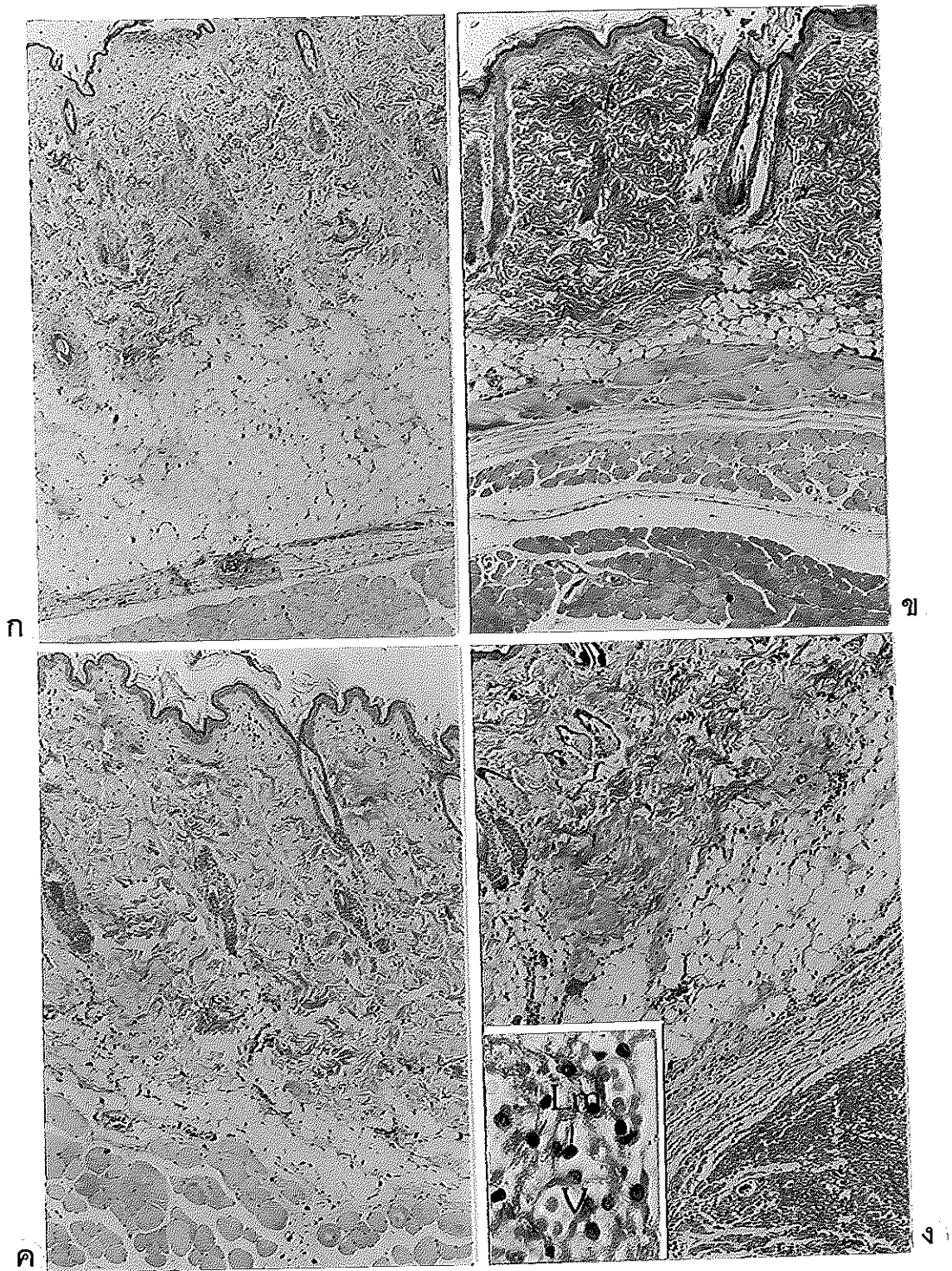
เมื่อสังเกตการเปลี่ยนแปลงหลังการฉีดสารละลายตัวอย่างทุก ๆ 2 วัน พบว่าอาการบวมค่อย ๆ ลดลง รูปที่ 28ก-ข แสดงผลกระทบที่เกิดขึ้นหลังการฉีด 40 วันเป็นที่น่าสังเกตว่าบริเวณที่ฉีดสารละลายโคโคซานจากเปลือกกุ้งทั้งในรูปผงและรูปสปันจ์ยังคงมีอาการบวมระดับน้อย เมื่อเปรียบเทียบกับบริเวณที่ฉีดสารละลายโคโคซานจากกระดองปลาหมึกทั้งในรูปผงและสปันจ์จะเห็นอาการบวมในระดับน้อยถึงน้อยมาก และจากการสัมผัสบริเวณดังกล่าวจะพบลักษณะเป็นก้อนแข็งภายใน

รูปที่ 29ก-ข และตารางที่ 22 แสดงผลการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาโดยการย้อมสี H&E ของบริเวณที่ฉีดสารละลายโคโคซานต่าง ๆ หลังการทดลอง 40 วันจะเห็นว่าลักษณะทางเนื้อเยื่อของบริเวณที่ฉีดเฉพาะ 1% กรดอะซิติก 0.9% NaCl และ ผิวหนังปกติที่ไม่ฉีดสารละลายใด ๆ ไม่มีความแตกต่างกัน (รูปที่ 29ก-ค) เมื่อเปรียบเทียบกับระหว่างบริเวณที่ฉีดสารละลายซึ่งเตรียมจากโคโคซานในรูปผงทั้งจากเปลือกกุ้งและกระดองปลาหมึกที่ความเข้มข้น 8 มก./มล. และ 4 มก./มล. ตามลำดับ พบว่ามีลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาที่ไม่แตกต่างกันคือ epithelial cell เชื่อมติดกัน บริเวณชั้น dermis และ ระหว่างชั้น dermis กับชั้นกล้ามเนื้อ (subcutaneous tissue) พบจำนวนเซลล์ไฟโบรบลาสต์ และไฟโบรไซท์มีระดับปานกลางคือ 40-60 เซลล์/field (x400) เรียงตัวในแนวขนานกับผิว แต่ในระดับที่ต่ำลงไปจากชั้น subcutaneous tissue เซลล์ยังเรียงไม่เป็นระเบียบ คอลลาเจนไฟเบอร์มีอยู่ในระดับมากเป็นบริเวณกว้าง และมีการเรียงตัวแบบหลวม ๆ พบหลอดเลือดฝอยแทรกอยู่ 1-20 หลอด/field (x400) (รูปที่ 29ง-จ) และยังพบเซลล์ lymphocyte และ macrophage มากกว่า 100 เซลล์/field (รูปที่ 29ฉ)

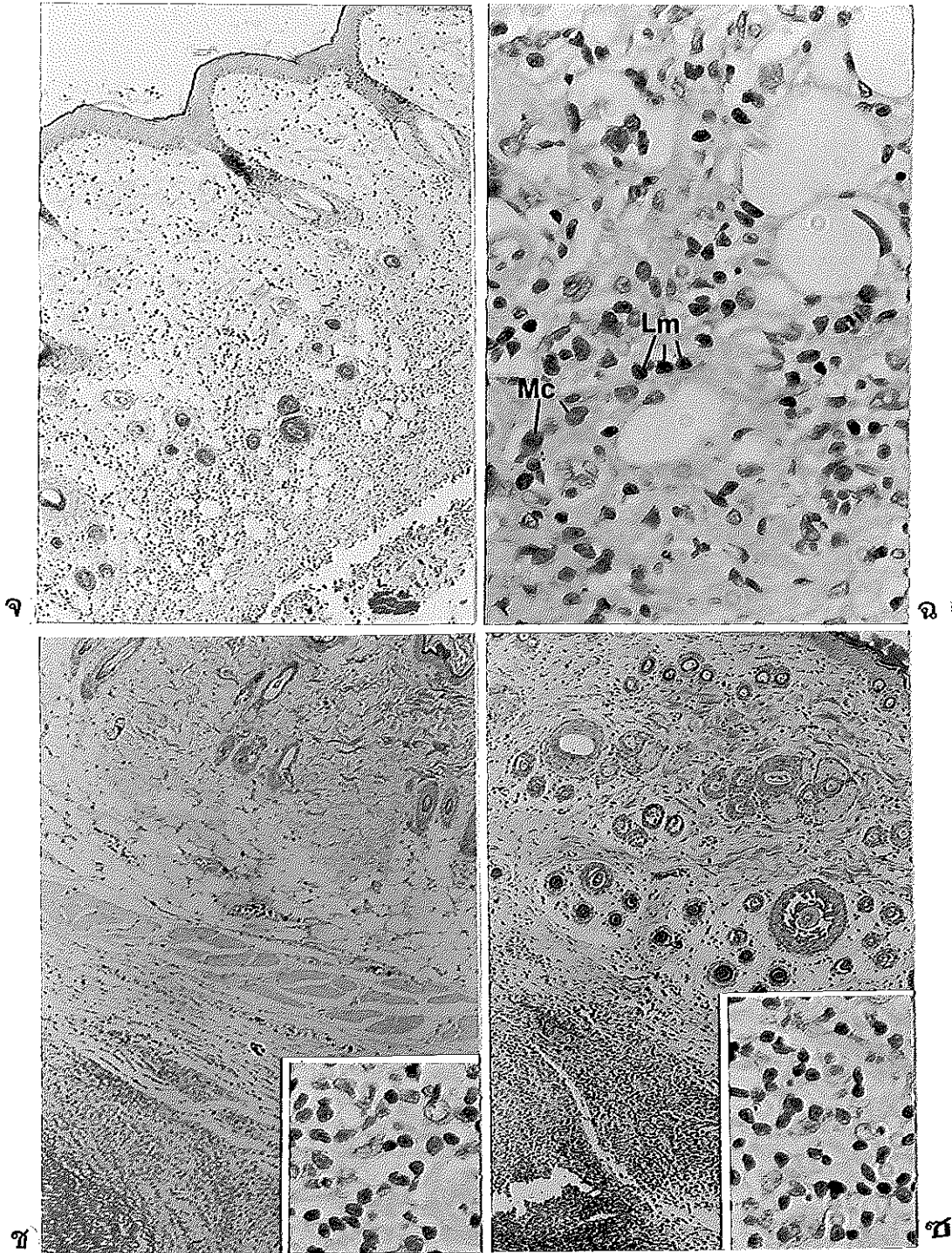
ส่วนบริเวณเนื้อเยื่อที่ฉีดสารละลายจากสปันจ์โคโคซานจากเปลือกกุ้งเข้มข้น 8 มก./มล. ลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาไม่แตกต่างทางสถิติกับบริเวณที่ใช้สารละลายโคโคซานจากเปลือกกุ้งและกระดูกปลาหมึก เพียงแต่บริเวณชั้น dermis ของเนื้อเยื่อที่ฉีดสารละลายจากสปันจ์โคโคซานจากเปลือกกุ้งมีปริมาณของไฟโบรบลาสและไฟโบรไซต์น้อยกว่าคืออยู่ในระดับใกล้เคียงปกติ (รูปที่ 29ข) เนื้อเยื่อบริเวณที่ฉีดสารละลายสปันจ์โคโคซานจากกระดูกปลาหมึกเข้มข้น 8 มก./มล. พบเซลล์ไฟโบรบลาส และไฟโบรไซต์มีอยู่ในระดับปกติ และมีคอแลเจนไฟเบอร์อยู่ในระดับปานกลางเริ่มเรียงตัวเป็นมัด แต่พบเซลล์ lymphocyte และ macrophage อยู่มากกว่า 100 เซลล์/field อยู่บริเวณชั้น subcutaneous tissue (รูปที่ 29ข)



- รูปที่ 28 แสดงอาการอักเสบซึ่งเกิดขึ้นรอบ ๆ บริเวณที่ฉีดสารละลายโคโตซานตัวอย่างชนิดต่าง ๆ เข้าใต้ผิวหนึ่งบริเวณต้นคอกหนูแรทเป็นเวลา 40 วัน
- ก. ไม่ฉีดสารใด ๆ ข. ฉีด 0.9% NaCl ค. ฉีด 1% กรดอะซิติก
- ง. ฉีดสารละลายโคโตซานจากเปลือกกุ้งในรูปผงที่ละลายใน 1% กรดอะซิติก ความเข้มข้น 8 มก./มล.
- จ. ฉีดสารละลายโคโตซานจากกระดองปลาหมึกในรูปผงที่ละลายใน 1% กรดอะซิติก ความเข้มข้น 4 มก./มล.
- ฉ. ฉีดสารละลายโคโตซานจากเปลือกกุ้งในรูปสปริงที่ละลายใน 0.9 % NaCl ความเข้มข้น 8 มก./มล.
- ช. ฉีดสารละลายโคโตซานจากกระดองปลาหมึกในรูปสปริงที่ละลายใน 0.9% NaCl ความเข้มข้น 8 มก./มล.



รูปที่ 29 แสดงการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาที่บริเวณผิวหนังหนุ่ดลองหลังการฉีดสารละลายโคโคซานตัวอย่างชนิดต่าง ๆ เข้าใต้ผิวหนัง เป็นเวลา 40 วัน
 ก. ไม่ฉีดสารใด ๆ ข. ฉีด 0.9% NaCl ค. ฉีด 1% กรดอะซิติก
 ง. ฉีดสารละลายโคโคซานจากเปลือกกุ้งในรูปผงที่ละลายใน 1% กรดอะซิติก ความเข้มข้น 8 มก./มล.,
 รูปเล็กมุมซ้ายล่าง : Lm คือ lymphocyte และ V คือหลอดเลือดฝอยที่เข้ามาบริเวณชั้น subcutaneous tissue



รูปที่ 29 (ต่อ)

- ก. นีดสารละลายโคโคซานจากกระดองปลาหมึกในรูปผงที่ละลายใน 1% กรดอะซิติก ความเข้มข้น 4 มก./มล.
 ข. จากข้อ ก (x400) Lm คือ lymphocyte และ Mc คือ macrophage ที่เข้ามาบริเวณชั้น subcutaneous tissue
 ค. นีดสารละลายโคโคซานจากเปลือกกุ้งในรูปสปินจ์ที่ละลายใน 0.9% NaCl ความเข้มข้น 8 มก./มล., รูปเล็กมุมขวาล่าง : แสดงบริเวณชั้น subcutaneous tissue (x400)
 ง. นีดสารละลายโคโคซานจากกระดองปลาหมึกในรูปสปินจ์ที่ละลายใน 0.9% NaCl ความเข้มข้น 8 มก./มล., รูปเล็กมุมขวาล่าง : แสดงบริเวณชั้น subcutaneous tissue (x400) ที่มี lymphocyte และ macrophage จำนวนมาก

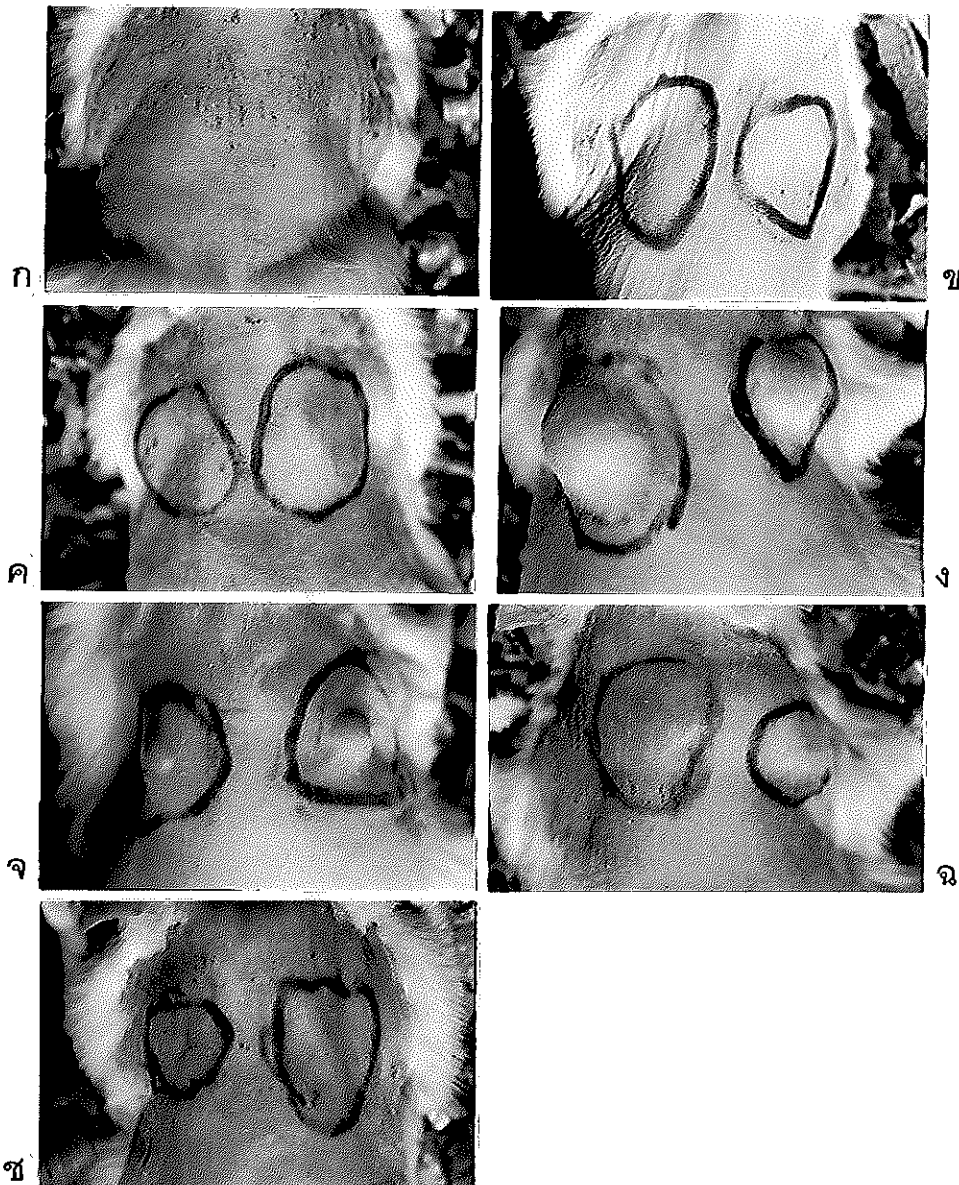
ตารางที่ 22 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติจากการทดสอบความเป็นพิษโดยการฉีดสารละลายโคโคซานเข้าใต้ผิวหนัง (subcutaneous) ครบ 40 วัน

สิ่งที่ตรวจ	ไม่ฉีดสาร	0.9%NaCl	1% กรดอะซิติก	ผงโคโคซาน+1% กรดอะซิติก		สปีนจ์โคโคซาน+0.9% NaCl	
				เปลือกกุ้ง	กระดองปลาหมึก	เปลือกกุ้ง	กระดองปลาหมึก
				8 มก./มล.	4 มก./มล.	8 มก./มล.	8 มก./มล.
Ep ^{ns}	3	3	3	3	3	3	3
Fb	1 ^a	1 ^a	1 ^{ac}	3 ^{bc}	3 ^{bc}	2 ^{bd}	1 ^{acd}
Fc	1 ^a	1 ^a	1 ^{ac}	3 ^{bc}	3 ^{bc}	2 ^{bd}	1 ^{acd}
Cd	1 ^a	1 ^a	1 ^{ac}	3 ^{bc}	3 ^b	3 ^b	2 ^a
Cf	3 ^a	3 ^a	3 ^{ac}	1 ^{bc}	1 ^{bd}	1 ^{bd}	2 ^{acd}
Vc	1 ^a	1 ^a	1 ^{ac}	2 ^{ab}	2 ^b	2 ^b	2 ^{bc}
Lm	1 ^a	1 ^a	1 ^{ac}	4 ^{bc}	4 ^b	4 ^b	4 ^{bc}
Mc	1 ^a	1 ^a	1 ^{ac}	4 ^{bc}	4 ^b	4 ^b	4 ^{bc}
Hair ^{ns}	2	3	3	1	2	2	3

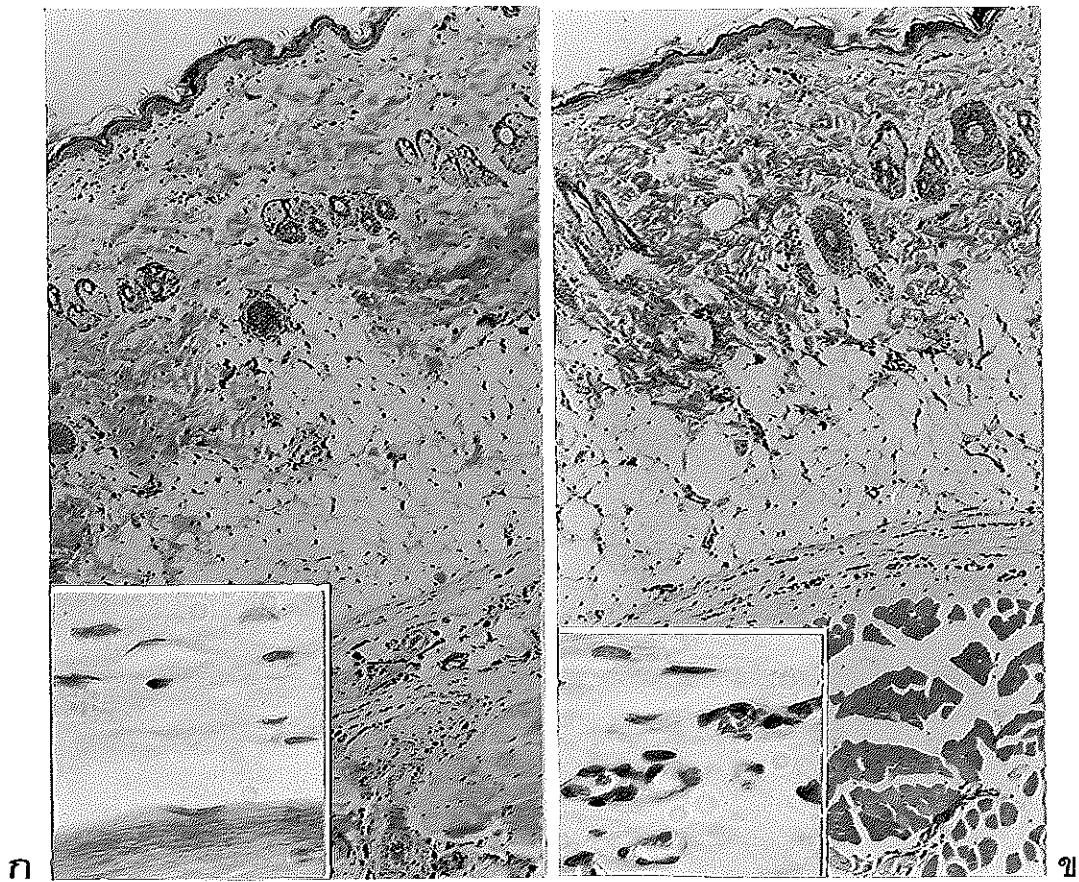
ns : ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p>0.05$)

ค่าฐานนิยมตัวเลขใหม่แถวเดียวกันที่กำกับด้วยตัวอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างกันทางสถิติจากการตรวจโดยใช้โปรแกรม Nonparametric แบบ Kruskal-wallis

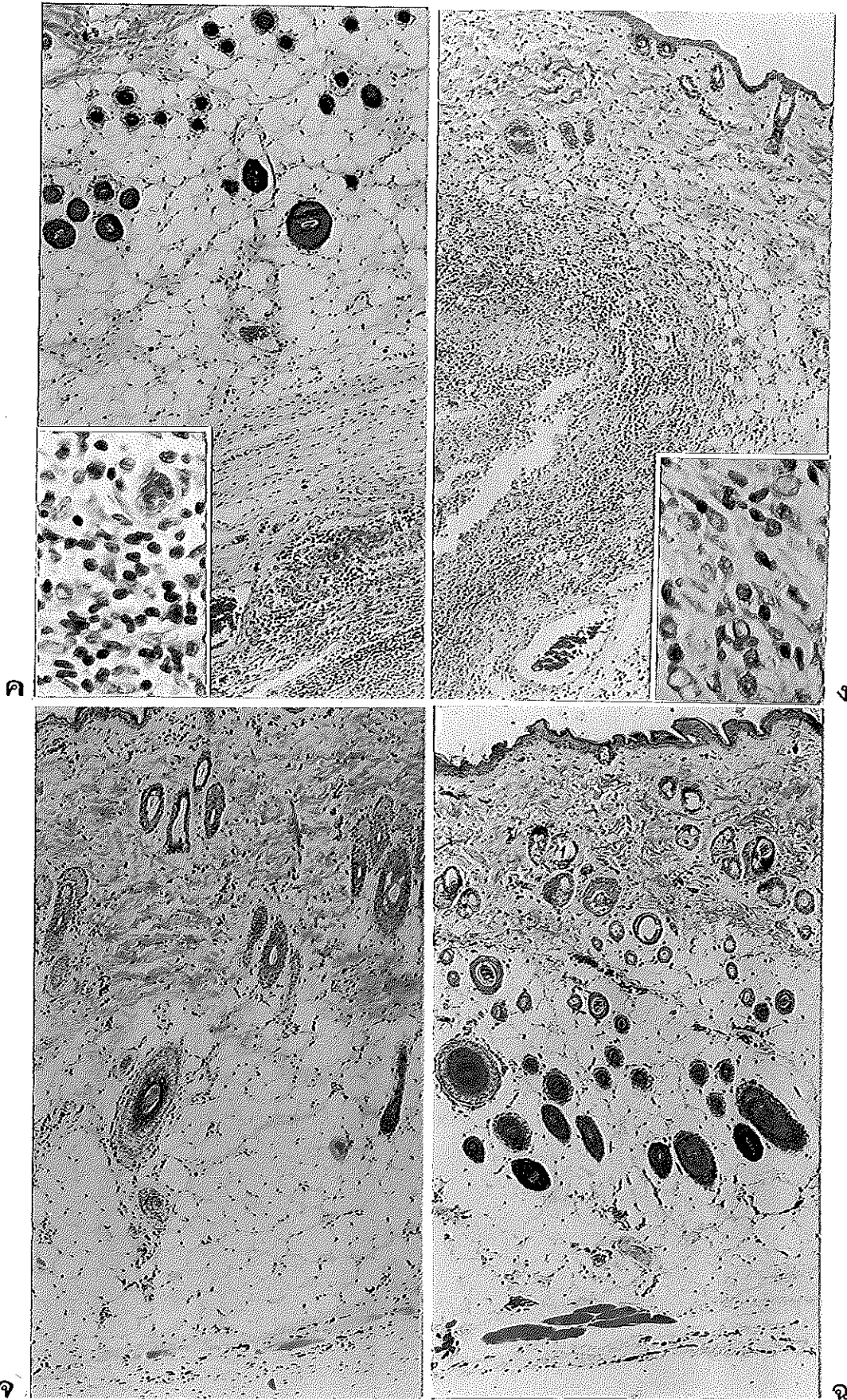
Ep: ลักษณะของ epithelial cell, Fb: จำนวนไฟโบรบลาส, Fc: ไฟโบรไซท์, Cd: ปริมาณคอลลาเจนไฟเบอร์, Cf: การเรียงตัวของคอลลาเจนไฟเบอร์, Vc: ปริมาณหลอดเลือดฝอย, Lm: ปริมาณ lymphocyte, Mc: ปริมาณ macrophage, Hair: ปริมาณ hair follicles



- รูปที่ 30 แสดงอาการอักเสบซึ่งเกิดขึ้นรอบ ๆ บริเวณที่ฉีดสารละลายโคโคซานตัวอย่างชนิดต่าง ๆ เข้าใต้ผิวหนังบริเวณต้นคอหมูแรท เป็นเวลา 61 วัน
- ก. ไม่ฉีดสารใด ๆ ข. ฉีด 0.9% NaCl ค. ฉีด 1% กรดอะซิติก
- ง. ฉีดสารละลายโคโคซานจากเปลือกกุ้งในรูปผงที่ละลายใน 1% กรดอะซิติก ความเข้มข้น 8 มก./มล.
- จ. ฉีดสารละลายโคโคซานจากกระดองปลาหมึกในรูปผงที่ละลายใน 1% กรดอะซิติก ความเข้มข้น 4 มก./มล.
- ฉ. ฉีดสารละลายโคโคซานจากเปลือกกุ้งในรูปสปีนจ์ที่ละลายใน 0.9 % NaCl ความเข้มข้น 8 มก./มล.
- ช. ฉีดสารละลายโคโคซานจากกระดองปลาหมึกในรูปสปีนจ์ที่ละลายใน 0.9% NaCl ความเข้มข้น 8 มก./มล.



- รูปที่ 31 แสดงการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาที่บริเวณผิวหนังหนุทลดลงหลังการฉีดสารละลายโคโคซานตัวอย่างชนิดต่าง ๆ เข้าใต้ผิวหนัง เป็นเวลา 61 วัน
- ก. ฉีด 0.9% NaCl, รูปเล็กมุมขวาล่าง : แสดงบริเวณชั้น subcutaneous tissue ที่มีไฟโบรบลาสและไฟโบรไซต์กระจายอยู่ใกล้ชั้นกล้ามเนื้อ
 - ข. ฉีด 1% กรดอะซิติก, รูปเล็กมุมซ้ายล่าง : แสดงบริเวณชั้น subcutaneous tissue ที่มีไฟโบรไซต์และหลอดเลือดฝอยกระจายอยู่เหมือนในผิวหนังปกติที่ไม่ฉีดสารใด ๆ
 - ค. ฉีดสารละลายโคโคซานจากเปลือกกุ้งในรูปผงที่ละลายใน 1% กรดอะซิติก ความเข้มข้น 8 มก./มล., รูปเล็กมุมซ้ายล่าง : แสดงบริเวณชั้น subcutaneous tissue ที่ยังมีเซลล์ lymphocyte และ macrophage อยู่จำนวนมาก
 - ง. ฉีดสารละลายโคโคซานจากกระดองปลาหมึกในรูปผงที่ละลายใน 1% กรดอะซิติก ความเข้มข้น 4 มก./มล., รูปเล็กมุมขวาล่าง : แสดงบริเวณชั้น subcutaneous tissue ที่ยังมีเซลล์ lymphocyte และ macrophage อยู่จำนวนมาก
 - จ. ฉีดสารละลายโคโคซานจากเปลือกกุ้งในรูปสปันจ์ที่ละลายใน 0.9% NaCl ความเข้มข้น 8 มก./มล.
 - ฉ. ฉีดสารละลายโคโคซานจากกระดองปลาหมึกในรูปสปันจ์ที่ละลายใน 0.9% NaCl ความเข้มข้น 8 มก./มล.



รูปที่ 31 (ต่อ)

ตารางที่ 23 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติจากการทดสอบความเป็นพิษโดยการฉีดสารละลายโคโคซานเข้าใต้ผิวหนัง (subcutaneous) ครบ 61 วัน

	ไม่ฉีดสาร	0.9%NaCl	1% กรดอะซิติก	ผงโคโคซาน+1% กรดอะซิติก		สปีนจ์โคโคซาน+0.9% NaCl	
				เปลือกกุ้ง	กระดองปลาหมึก	เปลือกกุ้ง	กระดองปลาหมึก
				8 มก./มล.	4 มก./มล.	8 มก./มล.	8 มก./มล.
Ep ^{ns}	3	3	3	3	3	3	3
Fb	1 ^a	1 ^a	1 ^a	3 ^b	3 ^b	3 ^b	1 ^a
Fc	1 ^a	1 ^a	1 ^a	3 ^b	3 ^b	3 ^b	1 ^a
Cd	1 ^a	1 ^a	1 ^a	3 ^b	3 ^b	3 ^b	1 ^a
Cf	3 ^a	3 ^a	3 ^a	1 ^b	1 ^b	1 ^b	3 ^{ab}
Vc	1 ^a	1 ^a	1 ^a	2 ^b	2 ^b	2 ^b	2 ^{ab}
Lm	1 ^a	1 ^a	1 ^a	4 ^b	3 ^b	3 ^b	2 ^a
Mc	1 ^a	1 ^a	1 ^a	4 ^b	3 ^b	3 ^b	2 ^a
Hair ^{ns}	3	4	4	4	3	3	4

ns : ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (p>0.05)

ค่าฐานนิยมตัวเลขในแถวเดียวกันที่กำกับด้วยตัวอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างกันทางสถิติจากการตรวจโดยใช้โปรแกรม Nonparametric แบบ Kruskal-wallis

Ep: ลักษณะของ epithelial cell, Fb: จำนวนไฟโบรบลาสต์, Fc: ไฟโบรไซต์, Cd: ปริมาณคอลลาเจนไฟเบอร์, Cf: การเรียงตัวของคอลลาเจนไฟเบอร์, Vc: ปริมาณหลอดเลือดฝอย, Lm: ปริมาณ lymphocyte, Mc: ปริมาณ macrophage, Hair: ปริมาณ hair follicles

รูปที่ 30ก-ข แสดงผลกระทบทที่เกิดขึ้นหลังการฉีดสารละลายโคโคซานเข้าใต้ผิวหนัง 61 วัน พบว่าบริเวณที่ฉีดโคโคซานจากเปลือกกุ้งทั้งในรูปผงและรูปสปันจ์ความเข้มข้น 8 มก./มล. (รูปที่ 30ง และ ฉ) ยังคงมีอาการบวมในระดับปานกลางถึงน้อย และจากการสัมผัสบริเวณดังกล่าวจะพบลักษณะเป็นก้อนแข็งคล้ายมีน้ำอยู่ภายใน เมื่อเปรียบเทียบกับบริเวณที่ฉีดสารละลายโคโคซานจากกระดองปลาหมึกในรูปผงและสปันจ์ทั้ง 2 ความเข้มข้นจะพบอาการบวมในระดับน้อยถึงน้อยมาก (รูปที่ 30จ และ ช)

รูปที่ 31ก-ฉ และตารางที่ 23 แสดงผลการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาโดยการย้อมสี H&E บริเวณที่ฉีดสารละลายโคโคซานชนิดต่าง ๆ หลังการทดลอง 61 วัน จะเห็นว่าลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาของบริเวณที่ฉีดสารละลาย 1% กรดอะซิติก 0.9% NaCl และผิวหนังปกติไม่มีความแตกต่างกัน (รูปที่ 31ก-ข) คือพบ epithelial cell เชื่อมติดกัน เซลล์ไฟโบรบลาส ไฟโบรไซท์ 10-19 เซลล์/field (x400) และคอลลาเจนไฟเบอร์มีจำนวนปกติอัดตัวเป็นมัด พบหลอดเลือดฝอย เซลล์ lymphocyte และ macrophage กระจายบางบริเวณ มี hair follicles 7-9 follicles/field

จากการตัดเนื้อเยื่อบริเวณที่ฉีดสารละลายโคโคซานชนิดต่าง ๆ หลัง 61 วัน ไปทำการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา พบว่าบริเวณที่ฉีดสารละลายโคโคซานในรูปผงจากเปลือกกุ้งความเข้มข้น 8 มก./มล. มีเซลล์ไฟโบรบลาสและไฟโบรไซท์ในระดับปานกลาง มีคอลลาเจนไฟเบอร์อยู่ในระดับมากเรียงตัวกันอย่างหลวม ๆ มีหลอดเลือดฝอยแทรกอยู่ 1-20 หลอด/field และยังคงพบ lymphocyte และ macrophage อยู่ปริมาณมากกว่า 100 เซลล์/field บริเวณชั้น subcutaneous tissue (รูปที่ 31ค) ลักษณะดังกล่าวนี้คล้ายกับบริเวณที่ฉีดสารละลายโคโคซานในรูปสปันจ์ความเข้มข้นเดียวกัน ที่แตกต่างกันเล็กน้อยคือกรณีหลังมีเซลล์ lymphocyte และ macrophage ปริมาณน้อยกว่าคือพบ 51-100 เซลล์/field (รูปที่ 31จ)

สำหรับบริเวณที่ฉีดสารละลายโคโคซานในรูปผงจากกระดองปลาหมึกความเข้มข้น 4 มก./มล. (รูปที่ 31ง) พบการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อเช่นเดียวกับการฉีดสารละลายโคโคซานจากเปลือกกุ้งในรูปสปันจ์ความเข้มข้น 8 มก./มล. อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบกับบริเวณที่ฉีดสารละลายโคโคซานในรูปสปันจ์จากกระดองปลาหมึกความเข้มข้น 8 มก./มล. (รูปที่ 31ฉ) จะเห็นว่ามีการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อน้อยมากจนใกล้เคียงกับชุดควบคุมที่ฉีดสารละลาย 1% กรดอะซิติก และ 0.9% NaCl คือ พบเซลล์ไฟโบรบลาส ไฟโบรไซท์ 10-19 เซลล์/field (x400) และคอลลาเจนไฟเบอร์มีในระดับปกติการเรียงตัวอัดกันเป็นมัด มีเซลล์ lymphocyte และ macrophage 1-50 เซลล์/field

หลังจากฉีดสารละลายโคโตซานเข้าใต้ผิวหนังหนูทดลอง 61 วัน ซึ่งยังคงมีอาการบวมของผิวหนังบริเวณนั้นอาจเนื่องมาจากปริมาณที่ฉีดมากเกินไปที่จะย่อยสลายไปภายในเวลาดังกล่าว ดังนั้นจึงควรศึกษาหาปริมาณที่เหมาะสมต่อไป

จากการศึกษาของ Tanaka *et al.* (1997) ฉีดโคโตซานที่ได้จากกระดองปู 5 มก. เข้าใต้ผิวหนังของหนูโมซัง พบว่ามีการบวมที่บริเวณที่ฉีดสารตัวอย่างเข้าใต้ผิวหนังเมื่อนำเนื้อเยื่อบริเวณดังกล่าวไปศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา พบเซลล์ที่มีหลายนิวเคลียสมีเซลล์แตก แต่ไม่พบเซลล์แบคทีเรีย และไม่พบเซลล์ผิดปกติบริเวณเนื้อเยื่ออื่น ๆ และมีการตั้งข้อสังเกตว่าเซลล์ที่มีหลายนิวเคลียสอาจถูกกระตุ้นจากสิ่งแปลกปลอม (foreign body) บริเวณที่ฉีดสารตัวอย่างเข้าไป ส่วนโคตินสามารถย่อยได้บางส่วนโดยเอนไซม์ของเซลล์ที่มีหลายนิวเคลียส macrophage และเนื้อเยื่อบริเวณนั้น ๆ (เช่น lysozyme) แต่โคโตซานเป็นอนุภาคที่ย่อยได้ยากในสัตว์ทดลอง และไม่มีการเคลื่อนย้ายโดย macrophage ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากโมเลกุลของโคโตซานมีขนาดใหญ่

3.8.2 ผลการศึกษาอาการไข้ (pyrogenicity) และการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักตัวของหนูทดลองหลังการฉีดสารละลายโคโตซาน

ตารางที่ 24 แสดงให้เห็นว่าอุณหภูมิร่างกายในหนูทดลองไม่เปลี่ยนแปลงมากนักหลังการฉีดสารละลายโคโตซานชนิดต่าง ๆ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ฉีดสารละลาย 1% กรดอะซิติก และ 0.9% NaCl โดยอยู่ระหว่าง 36.9-38.5⁰ซ โดยหนูแรกมีอุณหภูมิร่างกายปกติเป็น 38.2⁰ซ (ปานเทพ รัตนกร, 2535) ตารางนี้แสดงผลการศึกษาเพียงระยะเวลา 7 วัน แต่ผลการทดลองจริงตลอดระยะเวลา 61 วัน ก็ให้ผลเช่นเดียวกัน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสาเหตุ 2 ประการ คือ ประการแรก ผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการย่อยสลายโคโตซานส่วนใหญ่คือ D-glucosamine ซึ่งมี pyrogenic effect น้อยกว่า N-acetyl-D-glucosamine ประการที่สอง กระบวนการย่อยสลายโคโตซานที่บริเวณเนื้อเยื่อเกิดขึ้นอย่างช้า ๆ ระดับของ D-glucosamine ในกระแสเลือดจึงไม่เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจนมีผลกระทบต่ออัตราการ catabolism ของสารดังกล่าว ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับรายงานของ Rao และ Sharma (1997) ที่ใช้โคโตซานฟิล์มจากเปลือกกุ้งฝังใต้ผิวหนังกระต่ายและพบว่าไม่ทำให้สัตว์ทดลองเป็นไข้

ตารางที่ 24 ผลของโคโคซานต่ออุณหภูมิร่างกายหนูที่ฉีดสารละลายโคโคซานเข้าใต้ผิวหนังบริเวณหลังต้นคอ 0.5 มล. วัดอุณหภูมิร่างกายทางทวารก่อนการฉีดสารตัวอย่าง และหลังฉีด 6, 12, 24 ชั่วโมง, 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 วัน แสดงเป็นค่าอุณหภูมิเฉลี่ย ($^{\circ}\text{C}$) \pm SE จากการทดลอง 5 ซ้ำ

ตัวอย่างสารละลาย	อุณหภูมิร่างกายเฉลี่ย ($^{\circ}\text{C}$)									
	0	6hr	12hr	24hr	2d	3d	4d	5d	6d	7d
ไม่ฉีดสารใด	37.5 \pm 0.1	36.9 \pm 0.4	37.6 \pm 0.5	37.5 \pm 0.2	37.8 \pm 0.1	37.6 \pm 0.4	37.7 \pm 0.1	37.7 \pm 0.1	37.5 \pm 0.1	37.5 \pm 0.2
0.9% NaCl	38.4 \pm 0.2	37.8 \pm 0.3	37.4 \pm 0.4	38.2 \pm 0.1	38.5 \pm 0.2	37.5 \pm 0.2	38.1 \pm 0.1	37.9 \pm 0.3	38.1 \pm 0.1	37.9 \pm 0.3
1.0% กรดอะซิติก	38.0 \pm 0.2	36.9 \pm 0.5	37.7 \pm 0.4	37.6 \pm 0.3	38.2 \pm 0.2	37.3 \pm 0.1	37.8 \pm 0.2	37.9 \pm 0.1	37.9 \pm 0.2	37.7 \pm 0.2
โคโคซานจากเปลือกกุ้ง 8 มก./มล.**	37.4 \pm 0.4	37.7 \pm 0.3	38.1 \pm 0.3	37.5 \pm 0.1	38.1 \pm 0.1	37.3 \pm 0.2	37.9 \pm 0.2	37.9 \pm 0.1	37.9 \pm 0.2	37.6 \pm 0.1
โคโคซานจากกระดองปลาหมึก 4 มก./มล.**	37.6 \pm 0.2	37.2 \pm 0.3	37.6 \pm 0.1	37.5 \pm 0.2	37.9 \pm 0.3	37.3 \pm 0.2	37.4 \pm 0.2	37.6 \pm 0.1	37.6 \pm 0.2	37.9 \pm 0.1
สปีนจ์โคโคซานจากเปลือกกุ้ง 8 มก./มล.*	37.8 \pm 0.3	37.4 \pm 0.3	37.9 \pm 0.2	37.6 \pm 0.2	38.1 \pm 0.1	37.4 \pm 0.2	37.7 \pm 0.2	37.6 \pm 0.3	37.7 \pm 0.2	37.8 \pm 0.2
สปีนจ์โคโคซานจากกระดองปลาหมึก 8 มก./มล.*	37.7 \pm 0.1	36.9 \pm 0.3	38.2 \pm 0.2	37.4 \pm 0.3	37.9 \pm 0.1	37.4 \pm 0.2	37.5 \pm 0.1	37.5 \pm 0.2	37.6 \pm 0.3	37.5 \pm 0.1

** โคโคซานในรูปแบบละลายใน 1% กรดอะซิติก

* โคโคซานในรูปแบบสปีนจ์ที่ละลายใน 0.9% NaCl

ตารางที่ 25 น้ำหนักตัวของหนูที่เปลี่ยนแปลงหลังฉีดสารละลายโคโคซานเข้าใต้ผิวหนัง ผลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm S.E. จากการทดลอง 5 ซ้ำ

สารตัวอย่าง	ปริมาณที่ได้รับ (มก.)	น้ำหนักตัวที่เปลี่ยนแปลงไป (%)				
		1 สัปดาห์	2 สัปดาห์	3 สัปดาห์	4 สัปดาห์	5 สัปดาห์
ไม่ฉีดสารใด ๆ	-	-1.5 \pm 1.5	2.1 \pm 1.1	1.0 \pm 1.2	1.4 \pm 2.9	0.8 \pm 2.7
0.9% NaCl	-	-3.9 \pm 1.2	-2.8 \pm 1.5	0.8 \pm 2.1	0.7 \pm 2.1	0.8 \pm 2.4
1.0% กรดอะซิติก	-	-1.3 \pm 1.1	-1.1 \pm 1.0	0.9 \pm 1.7	0.2 \pm 1.6	0.4 \pm 1.6
โคโคซานจากเปลือกกุ้ง	4	-1.1 \pm 1.4	-1.1 \pm 2.6	2.4 \pm 3.4	4.3 \pm 4.2	4.8 \pm 3.4
โคโคซานจากกระดองปลาหมึก	2	-1.2 \pm 1.4	-0.6 \pm 0.9	-2.4 \pm 1.0	-2.9 \pm 1.6	-4.0 \pm 1.9
สปีนจ์โคโคซานจากเปลือกกุ้ง	4	-3.7 \pm 1.1	-3.6 \pm 3.2	-1.5 \pm 0.4	-2.0 \pm 1.6	-2.9 \pm 1.0
สปีนจ์โคโคซานจากกระดองปลาหมึก	4	-0.2 \pm 2.1	-2.2 \pm 3.4	0.5 \pm 2.3	-0.2 \pm 2.7	1.7 \pm 3.1

เครื่องหมายลบ (-) หน้าตัวเลขแสดงถึงน้ำหนักตัวที่ลดลง

ตารางที่ 25 แสดงน้ำหนักตัวของหนูทดลองที่เปลี่ยนแปลงหลังจากการฉีด โคโตซานเข้าทางใต้ผิวหนังโดยซึ่งน้ำหนักสัตว์ทดลองทุก ๆ 2 วัน เป็นเวลา 61 วัน แต่นำ มาเสนอผลเพียง 5 สัปดาห์ ซึ่งผลการทดลองตลอดระยะเวลา 61 วัน ให้ผลเช่นเดียวกัน เปรียบเทียบกับสัตว์ทดลองชุดควบคุมที่ไม่ฉีดสารใด ๆ, ที่ฉีด 0.9% NaCl และ 1% กรด อะซิติก จากผลการทดลองพบว่า การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักสัตว์ทดลองในแต่ละชุดทดลองไม่ มีรูปแบบที่แน่นอน ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักอยู่ในช่วงกว้างทำให้ไม่เห็นแนวโน้ม การเปลี่ยนแปลงที่ชัดเจน ทั้งนี้การลดลงของน้ำหนักอาจเกิดขึ้นจากปัจจัยอื่น เช่น ความเครียดของสัตว์ทดลอง เป็นต้น ซึ่งแสดงให้เห็นว่าโคโตซานที่ฉีดเข้าไปไม่มีผลต่อหนู ทดลอง ซึ่งเป็นการยืนยันการศึกษาของ Tanaka *et al.* (1997) ทำการฉีดโคโตซานจาก กระดองปู 5 มก. เข้าใต้ผิวหนังของหนูโมซ หลังจากซึ่งน้ำหนักทุก 2 สัปดาห์ พบว่าหนูมี น้ำหนักเพิ่มขึ้น

4. สรุป

จากการศึกษาเกี่ยวกับโคติน โคโตซานและการนำไปประยุกต์ใช้ทางการแพทย์ สามารถสรุปได้ดังนี้

1. ด้วยวิธีการในห้องปฏิบัติการนี้พบว่ากระดองปลาหมึก (*Loligo formosana*) และเปลือกกุ้ง (*Penaeus monodon*) สามารถนำมาเตรียมโคโตซานได้ผลผลิต 29.83 และ 17.35% ของน้ำหนักแห้งตามลำดับ
2. ผลผลิตโคโตซานที่เตรียมจาก 2 แหล่งและที่นำมาใช้ศึกษาตลอดการทดลองนี้มีคุณสมบัติสำคัญคือ โคโตซานจากกระดองปลาหมึกและเปลือกกุ้งมีน้ำหนักโมเลกุล 6.35×10^6 และ 2.69×10^6 คาลตัน ตามลำดับ ในขณะที่ระดับการกำจัดหมู่อะซิติก 73.10 และ 92.24% ตามลำดับ
3. เมื่อนำสารละลายโคโตซานในกรดอะซิติกมาทำ freeze-dry จะให้ผลผลิตเป็นรูปสปันจ์ซึ่งมีคุณสมบัติละลายน้ำได้ แต่ความสามารถในการละลายจะลดลงเมื่อนำไปอบที่อุณหภูมิ 100°C หรือผ่านการนิ่งฆ่าเชื้อ
4. โคโตซานจากทั้งสองแหล่งสามารถส่งเสริมการหยุดไหลของเลือดโดยทำให้เม็ดเลือดแดงและเกล็ดเลือดจับตัวกันเป็นกลุ่ม (hemagglutination) แต่ไม่มีผลต่อเม็ดเลือดขาว
5. ประสิทธิภาพการส่งเสริมการหยุดไหลของเลือดด้วยโคโตซานขึ้นอยู่กับแหล่งวัตถุดิบ รูปแบบ ความเข้มข้น และชนิดของสัตว์ทดลอง
6. โคโตซานจากเปลือกกุ้งในรูปสปันจ์ที่ละลายใน 0.9% NaCl ความเข้มข้น 4 มก./มล. มีประสิทธิภาพสูงสุดในการส่งเสริมการหยุดไหลของเลือด โดยทำให้ระยะเวลาการหยุดไหลของเลือดจากการเจาะ tail vein ของหนูทดลองสั้นลง 52% เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม
7. ผลการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการส่งเสริมการสมานแผลทางเนื้อเยื่อวิทยาด้วยโคโตซานจาก 2 แหล่งที่มีคุณสมบัติดังข้อ 2 แสดงให้เห็นว่าโคโตซานจากกระดองปลาหมึกในรูปผงที่ละลายใน 1% กรดอะซิติกและโคโตซาน จากกระดองปลาหมึกในรูปสปันจ์ที่ละลายใน 0.9% NaCl มีประสิทธิภาพในการส่งเสริมการสมานแผลดีที่สุด และรองลงมา ตามลำดับ

8. โคตินและโคโตซานในรูปผงก็มีคุณสมบัติส่งเสริมการสมานแผลเช่นกัน แต่ทำให้เนื้อเยื่อเกิดการอักเสบเรื้อรัง (chronic inflammation) นานกว่า

9. ผลการศึกษาความปลอดภัยในการนำโคโตซานรูปแบบต่าง ๆ ไปประยุกต์ใช้ทางการแพทย์โดยการฉีดสารละลายโคโตซานเข้าใต้ผิวหนังของหนูทดลองพบว่า เนื้อเยื่อจะปล่อยเอนไซม์ออกมาอย่างช้าๆ และถูกดูดซึมในที่สุดโดยไม่ทำให้หนูทดลองเกิดการอักเสบ และไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักตัว

ข้อเสนอแนะเพื่อการศึกษาต่อไป

1. เนื่องจากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าโคโตซานในรูปผงจากกระดองปลาหมึกที่ละลายใน 1% กระดองหมีประสิทธิภาพส่งเสริมการสมานแผลได้ดีกว่าสารละลายจากเปลือกกุ้งที่เตรียมโดยวิธีการเดียวกัน ทั้งนี้อาจเกิดจากปัจจัย 2 ประการคือ ความแตกต่างเนื่องจากลักษณะการเรียงตัวเชิงโครงสร้างของโคโตซาน โดยโคโตซานจากกระดองปลาหมึกมีโครงสร้างเป็น β ในขณะที่จากเปลือกกุ้งเป็น α หรืออาจเกิดจากความแตกต่างของระดับการกำจัดหมู่อะซิติกในโมเลกุลของโคโตซาน จึงไม่สามารถสรุปได้อย่างชัดเจนว่าปัจจัยใดที่เป็นอิทธิพลสำคัญ จึงน่าจะนำมาศึกษาในรายละเอียดต่อไป

2. เนื่องจากโคโตซานในรูปสปิงจ์ละลายน้ำได้ดี ดังนั้นถ้าต้องการนำไปประยุกต์ใช้ปิดแผลโดยตรงอาจทำให้การละลายเกิดขึ้นรวดเร็วเกินไป จึงควรทำการศึกษาหาวิธีทำให้การละลายเกิดขึ้นอย่างช้า ๆ ซึ่งอาจทำได้โดยนำไปนึ่งฆ่าเชื้อหรืออบที่อุณหภูมิและด้วยระยะเวลาที่เหมาะสม นอกจากนั้นควรจะทำการศึกษาต่อไปว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้มีประสิทธิภาพเปลี่ยนแปลงไปหรือไม่

3. ในการนำโคโตซานไปประยุกต์ใช้ทางการแพทย์ควรจะทำการศึกษาทดสอบหาระดับความปลอดภัยตามวิธีมาตรฐานอื่น ๆ เพิ่มเติมเช่น ผลที่เกิดขึ้นกับสัตว์ทดลองทั้งในระยะสั้นและระยะยาวเมื่อฉีดสารละลายเข้าในช่องท้องในระดับที่ต่างกัน การทำให้ระคายเคืองบริเวณต่าง ๆ (ได้แก่ vascular, mucosal, muscular และ subcutaneous) ตามวิธีของ Shintani *et al.* (1967) ผลกระทบต่อระบบเลือด (blood compatibility) ตามวิธีของ Prieur *et al.* (1973) และความสะอาดปราศจากเชื้อโรค (sterility) เป็นต้น

เอกสารอ้างอิง

- กอบกุล ตั้งสินมั่นคง. 2540. Inflammation and Healing. ใน วิทยุ มิตรานันท์ (บรรณาธิการ), *พยาธิวิทยากายวิภาคพื้นฐาน* (พิมพ์ครั้งที่ 2) หน้า 57-91.
กรุงเทพฯ: ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- โครงการตำรา-ศิริราช. 2524. *คู่มือโลหิตวิทยา*, 344 หน้า. กรุงเทพฯ: สาขาวิชาโลหิตวิทยา ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล.
- นพรัตน์ มะเท. 2541. *ฟิล์มที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพจากไคโตซาน : ปัจจัยการผลิตที่มีผลต่อคุณสมบัติของฟิล์ม และการใช้ประโยชน์*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- ปานเทพ รัตนากร. 2535. *คู่มือการใช้สัตว์ทดลอง*, 114 หน้า. ภาควิชาสัตววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- พรวิทย์ ลำเจียกเทศ. 2540. *การตรวจการห้ามเลือดทางห้องปฏิบัติการ*, 159 หน้า.
กรุงเทพฯ: ภาควิชาจุลทรรศนศาสตร์คลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล.
- เวคิน นพินิตย์. 2523. *เทคนิคทางเนื้อเยื่อวิทยา*, 168 หน้า. กรุงเทพฯ.
- สุทธวัฒน์ เบญจกุล. 2533. *แนวทางใช้ประโยชน์จากเปลือกกุ้ง : ไคตินและไคโตแซน*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- สุทธิพรรณ ประสาทแก้ว และนันทรัตน์ โฆมานะสิน. 2533. *คู่มือปฏิบัติการ : จุลทรรศน์วินิจฉัย (เล่มที่ 1) : การทดสอบเกี่ยวกับกระบวนการห้ามเลือด*. ภาควิชาจุลทัศน์คลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- Anderson, C.G., de Pablo, N. and Romo, C.R. 1978. Antarctic kill (*Euphausia superba*) as a source of chitin and chitosan. *Proceedings of the First International Conference on Chitin/Chitosan*. In R.A.A. Muzzarelli and E.R. Pariser (eds.), Cambridge, May, pp. 54-63.
- A.O.A.C. 1984. *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemistry* (4th ed.), A.O.A.C., Washington, D.C.

- Ashford, N.A., Hattis, D. and Murray, A.E. 1977. Industrial prospects for chitin and protein from shellfish wastes. *A Report on the first Marine Industries Business Strategy Program Marine Industry Advisory Service*. In H. Dale and E.M Albert (eds.), Massachusetts, MIT Sea Grant Program, MITSG, pp 77-73.
- Austin, P.R., Brine, C.J., Castle, J.E. and Zikakis, J.P. 1981. Chitin : new facets of research. *Science* 212: 749-753.
- Balassa, L.L. and Prudden, J.F. 1978. Application of chitosan and wound-healing acceleration. *Proceedings of the First International Conference on Chitin/Chitosan*, In R.A.A. Muzzarelli and E.R. Pariser (eds.), Cambridge, May 1978, pp. 296-305.
- Benjakul, S. and Sophanodora, P. 1993. Chitosan production from carapace and shell of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *ASEAN Food J.* 8(4):145-148.
- Biagini, G., Bertani, A., Muzzarelli, R., Damadei, A., DiBnedetto, G., Bellingolli, A., Riccotti, G., Zucchini, C. and Rizzoli, C. 1991. Wound management with N-carboxybutyl chitosan. *Biomaterials.* 2: 281-285.
- Bough, W.A. 1976. Chitosan, a polymer from seafood waste for use in treatment of food processing wastes and activated sludge. *Process Biochem.* 11(1): 13.
- Bough, W.A., Satter, W.L., Wu, A.C.M. and Perkins, B.E. 1978. Influence of chitosan products I : chemical compositions, viscosity and molecular weight distribution of chitosan products. *Biotechnol. Bioeng.* 20: 1931-1943.
- Brandenberg, G., Leibrock, L.G., Shuman, R., Malette, W.G. and Quigley, H.J. 1984. Chitosan : A new topical hemostatic agent for diffuse capillary bleeding in brain tissue. *Neurosurgery.* 15(1): 9-13.
- Brine, C.J. 1984. Chitin: accomplishments and perspectives. In J.H. Zikakis (ed.), *Chitin, Chitosan and Related Enzymes.* pp. XVII-XXII. New York: Academic Press Inc.

- Bronswijk, W.V. 1975. Molecular weight determination by viscometry. *Handbook of Physical Chemistry 301/302 for Student in Department of Chemistry*, pp. 127-130. Australia: Western Australian Institute of Technology.
- Bullock, G., Blazer, V., Tsukuda, S. and Summerfelt, S. 2000. Toxicity of acidified chitosan for cultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*. 185: 273-280.
- Castle, J.E., Deschamps, J.R. and Tice, K. 1984. Ultraviolet absorption spectra of microcrystalline chitins. In J.H. Zikakis (ed.), *Chitin, Chitosan and Related Enzymes*. pp. 119-123. New York: Academic Press Inc.
- Clarke, J.M. and Knowles, C.J. 1994. A new picric acid method to determine the degree of N-acetylation of chitosan. *Asia-Pacific, Chitin and Chitosan Symposium*, Bangi, Malaysia, 24-27 May 1994, pp. 1-9.
- Curotto, E. and Aros, F. 1993. Quantitative determination of chitosan and the percentage of free amino groups. *Anal. Biochem.* 211: 240-241.
- Chu, C.C. and Williams, D.F. 1983. The effect of gamma irradiation on the enzymatic degradation of polyglycolic acid absorbable sutures. *J. Biomed. Mater. Res.* 17: 1029-1040.
- DaCosta, M.L., Regan, M.C., Sader, M.A., Leader, M. and Benchier-Hays, D. 1998. Diphenylhydantoin sodium promotes early and marked angiogenesis and results in increased collagen deposition and tensile strength in healing wounds. *Surgery*. 123(3): 287-293.
- Damjanov, I. 1996. *Histopathology A Color Atlas and Textbook*. 499 pp, Baltimore: Williams and Wilkins.
- Domard, A. and Rinaudo, M. 1983. Preparation and characterization of fully deacetylated chitosan. *Int. J. Biol. Macromol.* 53: 49-52.
- Dutkiewicz, J., Szosland, L., Kucharska, M., Judkiewicz, L. and Ciszewski, R. 1990. Structure-bioactivity relationship of chitin derivatives-

Part I : The effect of solid chitin derivatives on blood coagulation.

J. Bioactive. Compatible. Polym. 5(3): 293-304.

Filar, L.J. and Wirick, M.G. 1978. Bulk and solution properties of chitosan.

Proceeding of the First International Conference on Chitin/Chitosan. R.A.A. Muzzarelli and E.R. Pariser (eds.), Cambridge, May 1978, pp. 169-181.

Furda, I. 1980. Nonabsorbable liquid binder. *U.S. Patent.* 4, 223, 023.

Green, J.H. and Kramer, A. 1979. *Food processing waste management.*

Connecticut: AVI Publisher Westport. 692 pp.

Hamlyn, P.E. and Schmidt, R.J. 1994. Potential therapeutic application of

fungal filaments in wound management. *Mycologist.* 8(4): 147-152.

Harmening, D.M. and Lemery, L.D. 1997. Introduction to hemostasis. In

D.M. Harmening (eds.), *Clinical Hematology and Fundamentals of Hemostasis* (3rd ed.), pp. 481-508. Philadelphia : F.A. Davis.

Hayes, E.R. and Davies, D.H. 1978. Characterization of chitosan. II. The

determination of the degree of deacetylation of chitosan and chitin.

Proceedings of the First International Conference on Chitin/Chitosan. R.A.A. Muzzarelli and E.R. Pariser (eds.), Cambridge, May 1978, pp. 406-420.

Hirano, S. and Noishiki, Y. 1985. The blood compatibility of chitosan and

N-acylchitosans. *J. Biomed. Mater. Res.* 19: 413-417.

Johnson, E.L. and Peniston, Q.P. 1982. Utilization of shellfish waste for

chitin and chitosan production. In R.E. Martin (ed.), *Chemistry and Biochemistry of Marine Food Products.* pp. 415-422. Connecticut: AVI Publish Weatport.

Kandaswamy, C.K. 1978. Chemical differences in the α - and β - chitins and their significance in the quality of the by-products of chitin.

Proceedings of the First International Conference on Chitin/Chitosan, In R.A.A. Muzzarelli and E.R. Pariser (eds.), Cambridge, May 1978, pp. 517-524.

- Kind, G.M., Brine, S.D., Staren, E.D., Temperton, A.J. and Economou, S.G. 1990. Chitosan : evaluation of a new hemostatic agent. *Current surgery*. Jan-Fab: 47(1): 37-39.
- Klokkevold, P.R., Lew, D.S., Ellis, D.G. and Bertolami, C. 1991. Effect of chitosan on lingual hemostasis in rabbits. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 49: 858-863.
- Klokkevold, P.R., Fukayama, H. and Bertolami, C. 1992. Effect of chitosan on lingual hemostasis in rabbits with platelet dysfunction induced by epoprostenol. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 50: 41-45.
- Knorr, D. 1982. Functional properties of chitin and chitosan. *J. Food. Sci.* 47: 593-595.
- Knorr, D. 1983. Dye binding properties of chitin and chitosan. *J. Food. Sci.* 48: 36-41.
- Knorr, D. 1984. Use of chitinous polymers in food. *Food Technol.* 38: 85-97.
- Kong, N. 1975. *A feasibility study of new routes to the marine polymers chitin and chitosan*. M.S. Thesis in Chemical Engineering, University of Washington.
- Kratz, G., Arnander, C., Swedenborg, J., Back, M., Falk, C., Gouda, I. and Larm, O. 1997. Heparin-Chitosan complexes stimulate wound healing in human skin. *Scand. J. Plast. Reconstr. Hand. Surg.* 31: 119-123.
- Kurita, K., 1986. Chemical modifications of chitin and chitosan. In R. Muzzarelli, C. Jeuniaux and G.W. Goody (eds.), *Chitin in Nature and Technology*. pp. 287-293. New York: Plenum Press.
- Kurita, K., Tomita, K., Tada, T., Ishii, S., Nishimura, S. and Shimoda, K. 1993. Squid chitin as a potential alternative chitin source : deacetylation behavior and characteristic properties. *J. Polym. Sci.* 31: 485-491.
- Lehoux, J.G. and Grondin, F. 1993. Some effects of chitosan on liver function in the rat. *Endocrinology*. 132(3): 1078-1084.

- Malette, W.G., Quigley, H.J., Gaines, R.D., Johnson, N.D. and Rainer, W.G.
1983. Chitosan : a new hemostatic. *Ann. Thoracic. Surg.* 36(1): 55-58.
- Muzzarelli, R.A.A. and Jeuniaux, C. 1976. *Chitin*. In R.A.A Muzzarelli (ed.),
New York: Pergamon Press.
- Muzzarelli, R.A.A. 1977. *Chitin*. 309 pp. New York: Pergamon Press Ltd.
- Muzzarelli, R.A.A. 1983. *Polymer in Medicine*. In G.C. Chiellini and E.G.
Giusti (eds.), pp. 359-374. New York: Plenum Press.
- Muzzarelli, R.A.A. 1985. Chitin. In G.O. Aspinall (ed.), *The polysaccharides*.
vol. 3, pp. 417-450, New York: Academic Press.
- Muzzarelli, R.A.A. and Rocchetti, R. 1985. *Carbohydrate Polymer*, pp.
459-472. England: Elsevier Applied Science Publishers Ltd.
- Muzzarelli, R.A.A. 1997. Human enzymatic activities related to the
therapeutic administration of chitin derivatives. *CMLS. Cell. mol.*
life sci. 53: 131-140.
- Nanjo, F., Katsumi, R. and Sakai, K. 1991. Enzymatic method for
determination of the degree of deacetylation of chitosan. *Anal.*
Biochem. 19: 164-167.
- Neugebauer, W.A. and Brzezinski, R. 1989. Determination of the degree of
N-acetylation of chitin-chitosan with picric acid. *Carbo. Res.* 189:
363-367.
- Nicol, S. 1991. Life after death for empty shells. *New Scientist.* 129: 36-38.
- No, H.K., Meyers, S.P. and Lee, K.S. 1989. Isolation and characterization of
chitin from crawfish shell waste. *J. Agro. Food Chem.* 37: 575-579.
- Oungbho, K. and Muller, B.W. 1997. Chitosan sponges as sustained release
drug carriers. *Int. J. Pharm.* 156: 229-237.
- Peluso, G., Petillo, O., Renieri, M., Santin, M., Ambrosio, L., Calabro, D.,
Avallone, B. and Balsamo, G. 1994. Chitosan-mediated stimulation of
macrophage function. *Biomaterials* 15(15): 1215-1220.

- Prieur, D.J., Young, D.M., Davis, R.D., Cooney, D.A., Homan, E.R., Dixon, R.L. and Guarino, A.M. 1973. Procedures for preclinical toxicologic evaluation of cancer chemotherapeutic agents: Protocols of the laboratory of toxicology. *Cancer Chemother. Rep.* Part 34: 1-30.
- Rao, S.B. and Sharma, C.P. 1997. Used of chitosan as a biomaterial : Studies on its safety and hemostatic potential. *J. Biomed. Mater. Res.* 34: 21-28.
- Razdan, A., Pettersson, D. and Pettersson, J. 1997. Broiler chicken body weights, feed intakes, plasma lipid and small-intestinal bile acid concentrations in response to feeding of chitosan and pectin. *British J. Nutr.* 78: 283-291.
- Sannan, T., Kurita, K., Ogura, K. and Iwakura, Y. 1978. Studies on chitin : 7. IR Spectroscopic determination of degree of deacetylation. *Polym.* 19: 458-459.
- Shintani, S., Yamasaki, M., Nakamura, M. and Nakayama, I. 1967. A new method to determine the irritation of drugs after intramuscular injection in rabbits. *Toxicol. Appli. Pharmacol.* 11: 293-301.
- Sornprasit, P. 1997. *Characterization of Chitin and Chitosan from Squid pens.* Master of Science Thesis. Prince of Songkla University.
- Sugano, M., Fujikawa, T., Hiratsuji, Y., Nakashima, K., Fukuda, N. and Hasegawa, Y. 1980. A novel use of chitosan as a hypocholesterolemic agent in rats. *Am. J. Clin. Nutr.* 33: 787-793.
- Tanaka, Y., Taniok, S., Tanaka, M., Tanigawa, T., Kitamura, Y., Minami, S., Okamoto, T., Miyashita, M. and Nanno, M. 1997. Effect of chitin and chitosan particles on BALB/C mice by oral and parenteral administration. *Biomaterials.* 18(8): 591-595.
- Tokura, S., Nishi, N., Tsutsumi, A. and Samorin, O. 1983. Studies on chitin VIII. Some property of water soluble chitin derivatives. *Polym. J.* 15(6): 485-489.

- ven der Lei, B. and Wildevuur, R.H. 1989. Improved healing of microvascular PTFE prostheses by induction of a clot layer : an experimental study in rats. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 84(6): 960-967.
- Waynforth, H.B. and Flecknell, P.A. 1992. *Experimental and Surgical Technique in the Rat* (2nd ed.), London : Academic Press.
- Wu, A.C.M., Bough, W.A., Conrad, E.C. and Alden, Jr. 1976. Determination of molecular-weight distribution of chitosan by high-performance liquid chromatography. *J. chromat.* 128: 87.
- Wu, A.C.M. and Bough, W.A. 1978. A study of variables in the chitosan manufacturing process in relation to molecular-weight distribution, chemical characteristics and waste-treatment effectiveness. *Proceedings of the First International conference on Chitin/Chitosan*. In R.A.A. Muzzarelli and E.R. Pariser (eds.), MIT Sea Grant Program: Cambridge, MA, pp 88-102.

ภาคผนวก

1. การเตรียม Citrat Phosphat Dextrose (CPD) (โครงการตำรา-ศิริราช, 2524)

ส่วนประกอบใน 100 มล.

ตัวยา	(กรัม)
Citric acid (hydrous)	0.327
Sodium Citrate (hydrous)	2.630
Sodium biphosphate	0.222
Dextrose (anhydrous)	2.320

ละลายตัวยาในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 100 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ 15 นาที ที่ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว ก่อนนำไปใช้ ขนาดของน้ำยาที่ใช้ผสม: น้ำยา CPD 49 มล. ใช้สำหรับผสมเลือดจำนวน 350 มล. มี pH เริ่มต้น 5.6

2. การเตรียม 2% เม็ดเลือดแดง (Red blood cell) (พรวิชัย ลำเจียกเทศ, 2540)

สารเคมีที่ใช้ในการเตรียม

1. Citrat Phosphat Dextrose (CPD)
2. 50 mM Tris-HCl pH 7.5 + 0.9% NaCl

เจาะเลือดจากหัวใจของหนูแรทแล้วเติมสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด (CPD) ในอัตราส่วน CPD : เลือด เท่ากับ 49 : 350 จะได้ whole blood ที่เติม CPD จากนั้นนำไปปั่นด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 800xg 1 นาที จะได้ตะกอนของเม็ดเลือดแดง จากนั้นนำไปปั่นล้างอีก 2 รอบด้วย 50mM Tris-HCl pH 7.5 ที่มี 0.9% NaCl หลังจากปั่นแล้วจะได้เป็นเม็ดเลือดแดงที่สะอาด จากนั้นนำมาเจือจางให้เป็น 2% เม็ดเลือดแดงด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ชนิดเดียวกัน

3. การเตรียมตัวอย่างเม็ดเลือดขาว (white blood cell) (พรวิชัย ลำเจียกเทศ, 2540)

นำ whole blood ที่เติม CPD แล้วมาปั่นแยกที่ 7,500xg 20 นาที จากนั้นดูดส่วนใสออกและดูดส่วนที่เป็นชั้น Buffy coat เก็บในหลอด microcentrifuge tube แล้วล้างด้วย 50mM Tris-HCl pH 7.5 ที่มี 0.9% NaCl 2 ครั้ง จะได้ตัวอย่างเม็ดเลือดขาว แล้วเจือจางด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ชนิดเดียวกันอัตราส่วน 1:1

4. การเตรียมตัวอย่างเกล็ดเลือด (พรวิชัย ลำเจียกเทศ, 2540)

นำ whole blood ที่เติม CPD แล้วมาปั่นแยกที่ 100xg 10 นาที ที่ 20 °C จะได้ ส่วนของ platelet rich plasma (PRP) ตูดส่วนพลาสมาใส่หลอด ต่อจากนั้นนำไปปั่น แยกที่ความเร็ว 1,250xg 15 นาที จะได้ตัวอย่างเกล็ดเลือดออกมา ต่อจากนั้นนำไปวางให้ เกล็ดเลือดกระจายตัวบนเครื่องเขย่าความเร็วต่ำ ประมาณ 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นางสาวมณฑา จำเริญรักษ์	
วัน เดือน ปีเกิด	11 มิถุนายน 2516	
วุฒิการศึกษา		
วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2537