



ฤทธิ์ส่งเสริมการหายของแผลของตำรับยาสมานแผลใหนุเบาหวาน  
ประเภทที่ 2 (Goto-Kakizaki rats)  
**Wound Healing Effects of Ya-Samarn-Phlae in Type 2 Diabetic Rats**  
**(Goto-Kakizaki rats)**

สินีนาฏ สันพินิจ  
**Sineenart Sanpinit**

วิทยานิพนธ์นี้สำหรับการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา  
การแพทย์แผนไทยดุขฎิบัณฑิต  
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

**A Thesis Submitted in Fulfillment of the Requirements for the Degree of  
Doctor of Thai Traditional Medicine**

**Prince of Songkla University**

**2562**

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์



ฤทธิ์ส่งเสริมการหายของแผลของตำรับยาสมานแผลในหนูเบาหวาน  
ประเภทที่ 2 (Goto-Kakizaki rats)

**Wound Healing Effects of Ya-Samarn-Phlae in Type 2 Diabetic Rats  
(Goto-Kakizaki rats)**

สินีนาฏ สันพินิจ  
**Sineenart Sanpinit**

วิทยานิพนธ์นี้สำหรับการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา  
การแพทย์แผนไทยดุขฎิบั้ณทิต  
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

**A Thesis Submitted in Fulfillment of the Requirements for the Degree of  
Doctor of Thai Traditional Medicine**

**Prince of Songkla University**

**2562**

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์                     ฤทธิ์ส่งเสริมการหายของแผลของตำรับยาสมานแผลในหนูเบาหวาน  
 ประเภทที่ 2 (Goto-Kakizaki rats)  
 ผู้เขียน                                     นางสาวสินีนานฎ สันพิณิจ  
 สาขาวิชา                                 การแพทย์แผนไทย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

คณะกรรมการสอบ

.....  
 (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศศิธร ชูศรี)

.....ประธานกรรมการ  
 (รองศาสตราจารย์ ดร.กรกนก อิงคินันท์)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

.....กรรมการ  
 (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศศิธร ชูศรี)

.....  
 (ดร.กฤติยา ทิสยากร)

.....กรรมการ  
 (ดร.กฤติยา ทิสยากร)

.....กรรมการ  
 (ดร.นงลักษณ์ กุลวรรตต์)

.....กรรมการ  
 (ดร.จุฬาลักษณ์ โชคไพศาล)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยนี้เป็น  
 ส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาการแพทย์แผนไทยดุษฎีบัณฑิต

.....  
 (ศาสตราจารย์ ดร. ดำรงค์ศักดิ์ ฟ้ารุ่งแสง)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(3)

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้มาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และได้แสดงความขอบคุณบุคคล  
ที่มีส่วนช่วยเหลือแล้ว

ลงชื่อ .....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศศิธร ชูศรี)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลงชื่อ .....

(ดร.กฤติยา ทิสยากร)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

ลงชื่อ .....

(นางสาวสินีนาง สันพินิจ)

นักศึกษา

(4)

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน  
และไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ .....

(นางสาวสินีนภา สันพิณีจ)

นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์	ฤทธิ์ส่งเสริมการหายของแผลของตำรับยาสมานแผลในหนูเบาหวาน ประเภทที่ 2 (Goto-Kakizaki rats)
ผู้เขียน	นางสาวสินีนานฎ สันพิณีจ
สาขาวิชา	การแพทย์แผนไทย
ปีการศึกษา	2562

### บทคัดย่อ

แผลบริเวณเท้าในผู้ป่วยเบาหวาน (Diabetic foot ulcers; DFUs) เป็นสาเหตุที่พบบ่อยในผู้ป่วยเบาหวานอย่างน้อย 1 ใน 10 คน ที่ได้รับการตัดเท้า แม้ว่าจะมีวิธีการรักษาแผลที่เป็นมาตรฐาน แต่การศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับพืชสมุนไพรและตำรับยาพื้นบ้านที่มาจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติซึ่งมีผลต่อการหายของแผลเพื่อรักษาแผลเบาหวานเป็นสิ่งที่น่าสนใจ การศึกษานี้มุ่งเน้นไปที่กลไกการรักษาแผลของตำรับยาแผนไทยที่มีชื่อว่า ยาสมานแผล (Ya-Samam-Phlae) ซึ่งเป็นตำรับยาของ หมอสมพร ชาญวณิชย์สกุล แพทย์แผนไทยในพื้นที่ภาคใต้ของประเทศไทย โดยมีวัตถุประสงค์ของการศึกษาคือ 1) เพื่อประเมินลักษณะทางเภสัชเวชและองค์ประกอบทางเคมีของสมุนไพรในตำรับยาสมานแผล ซึ่งได้แก่ เหง้าขมิ้นชัน เมล็ดหมาก เมล็ดข้าวสาร และเปลือกมังคุด 2) เพื่อตรวจหาปริมาณของสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพและศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพที่เกี่ยวข้องกับการหายของแผลในหลอดทดลองของสารสกัดด้วยเอทานอลจากยาสมานแผล (E-YaSP) ยาสมานแผลในรูปแบบยาน้ำมัน (T-YaSP) และยาสมานแผลในรูปแบบยาเตรียมแผ่นปิดแผล (YaSP) 3) เพื่อทดสอบกลไกการออกฤทธิ์ต้านการอักเสบในสัตว์ทดลองของ T-YaSP และ YaSP และกลไกการออกฤทธิ์ต่อกระบวนการหายของแผลของ T-YaSP และ YaSP ในการศึกษาแบบ excision wound model ในหนูปกติ (Wistar rats) และหนูเบาหวานชนิดที่ 2 (Goto-Kakizaki (GK) rats)

การศึกษาลักษณะทางเภสัชเวชของขมิ้นชัน หมาก ข้าวสาร และมังคุด โดยอ้างอิงวิธีการทดสอบตาม Thai herbal pharmacopeia และ/หรือ Ayurvedic herbal pharmacopoeia พบว่า ปริมาณของสิ่งเจือปน เช่น ปริมาณสิ่งปนเปื้อน ปริมาณเถ้ารวม ปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรด และร้อยละของความชื้น เป็นไปตามข้อกำหนดของเภสัชตำรับที่ดี เช่นเดียวกับปริมาณของสารสกัดด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ ที่ใช้ในการประเมินปริมาณของสารสำคัญซึ่งเป็นไปตามข้อกำหนดมาตรฐาน จากการประเมินองค์ประกอบทางเคมีเชิงคุณภาพโดยใช้เครื่อง liquid chromatography mass spectrometry ของ E-YaSP, T-YaSP และ YaSP พบว่ามีจำนวนของสารองค์ประกอบ เท่ากับ 37, 30 และ 19 ชนิด ตามลำดับ ในจำนวนของ

สารเหล่านี้ มีสารสำคัญ 2 ชนิด ที่พบในยาสมานแผลทั้งสามรูปแบบ คือ alpha-mangostin และ curcumin ซึ่งจัดเป็น biological markers การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีเชิงปริมาณโดยใช้เครื่อง high performance liquid chromatography พบว่า YaSP มีปริมาณของ alpha-mangostin และ curcumin น้อยกว่าประมาณ 6 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับ T-YaSP นอกจากนี้ยังพบว่า ปริมาณของ alpha-mangostin และ curcumin ใน YaSP ลดลงมากกว่า T-YaSP เมื่อผ่านการเก็บรักษาไว้เป็นเวลา 6 เดือน ในการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพในระดับหลอดทดลอง พบว่า E-YaSP, T-YaSP และ YaSP มีคุณสมบัติยับยั้งอนุมูลอิสระในไตรกลีเซอไรด์ และปฏิกิริยา lipid peroxidation ได้ นอกจากนี้ E-YaSP ยังมีความสามารถกระตุ้นการเคลื่อนที่ของ human dermal fibroblast ได้โดยการทดสอบด้วยวิธี scratch wound closure assay และสามารถยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์จาก RAW 264.7 macrophage cells ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย lipopolysaccharide ได้ จากการทดสอบความระคายต่อผิวหนังในกระต่าย พบว่า ทั้ง T-YaSP และ YaSP จัดอยู่ใน category IV ของ Globally Harmonized System of Classification Toxicity ซึ่งแสดงให้เห็นว่าตำรับยาทั้ง 2 รูปแบบ ไม่ก่อให้เกิดความระคายเคืองต่อผิวหนัง

การศึกษากลไกต้านการอักเสบของยาสมานแผลโดยใช้วิธี carrageenan-induced paw edema model ในหนูทดลอง Wistar rats จากการทา T-YaSP และ YaSP บริเวณอุ้งเท้าหนูทดลอง พบว่า สามารถยับยั้งการบวมของอุ้งเท้าได้อย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) ตั้งแต่เวลา 1 ชั่วโมง หลังการฉีด carrageenan ซึ่งใกล้เคียงกับฤทธิ์ยับยั้งการบวมของอุ้งเท้าในหนูทดลองที่ได้รับการรักษาด้วย phenylbutazone ระดับของตัวชี้วัดของการอักเสบและภาวะเครียดออกซิเดชันในเนื้อเยื่ออักเสบ ได้แก่ malondialdehyde (MDA), nitric oxide (NO) และ myeloperoxidase (MPO) ได้รับการตรวจสอบโดยใช้ enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) พบว่า กลุ่มที่ได้รับการรักษาด้วย T-YaSP และ YaSP มีระดับของตัวชี้วัดเหล่านี้ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งเทียบเท่าได้กับกลุ่มที่ได้รับการรักษาด้วย phenylbutazone นอกจากนี้ ผลของการศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบในครั้งนี้ ยังพบว่า การรักษาด้วย T-YaSP และ YaSP มีระดับของ pro-inflammatory cytokines ได้แก่ tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha), Interleukin 1 beta (IL-1beta) และ prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) และระดับของ inflammatory enzymes ได้แก่ inducible nitric oxide synthase (iNOS) และ cyclooxygenase-2 (COX-2) ลดลงอย่างมีนัยสำคัญในเนื้อเยื่ออุ้งเท้าอักเสบ จากการศึกษาสามารถสรุปได้ว่า T-YaSP และ YaSP อาจส่งเสริมกระบวนการหายของแผลได้ ซึ่งลดระยะเวลาการอักเสบในกระบวนการหายของแผลโดยยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์จากเซลล์ macrophages หรือเป็นผลมาจากการลดลงของระดับ inflammatory cytokines และ inflammatory enzymes

การประเมินคุณสมบัติต่อการหายของแผลและกลไกการออกฤทธิ์ของตำรับยา

สมานแผล ซึ่งแบ่งหนูเป็น 6 กลุ่ม กลุ่มละ 9-10 ตัว ซึ่งได้รับการทาสารทดสอบบริเวณแผลตามกลุ่มการทดลองแบบวันเว้นวัน โดย 2 กลุ่มแรก ได้รับการรักษาด้วย vehicle ของ T-YaSP และ YaSP ในขณะที่อีก 2 กลุ่ม ได้รับการรักษาด้วยยาน้ำมันทองนพคุณ ซึ่งใช้เป็นยาควบคุมบวกของ T-YaSP และยาขี้ผึ้ง Solcoseryl ซึ่งใช้เป็นยาควบคุมบวกของ YaSP และ 2 กลุ่มสุดท้าย ได้รับการรักษาด้วย T-YaSP และ YaSP ร้อยละการหดตัวของแผลประเมินผลในวันที่ 3, 5, 7, 9 และ 11 ระดับของ transforming growth factor beta-1 (TGF-beta1), vascular growth factor (VEGF), collagen type I, collagen type III และลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อแผลประเมินผลในวันที่ 7 และ 11 หลังรักษาในแผลปกติ และประเมินผลในวันที่ 11 หลังการรักษาในแผลเบาหวาน พบว่า ร้อยละการหดตัวของแผลและการลดลงของพื้นที่แผลแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) ระหว่างหนูเบาหวานและหนูปกติ ในขณะที่กลุ่มที่ได้รับการรักษาด้วย T-YaSP และ YaSP มีการลดลงของพื้นที่แผลมากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับ vehicle นอกจากนี้ การเปลี่ยนแปลงของระดับปัจจัยการเจริญเติบโต ได้แก่ TGF-beta1 และ VEGF และระดับของ collagen I และ III ในกลุ่มที่ได้รับการรักษาด้วย T-YaSP และ YaSP สามารถเทียบเคียงได้กับกลุ่มควบคุมบวก จากผลการศึกษาในครั้งนี้ แสดงให้เห็นว่า T-YaSP และ YaSP เป็นผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติซึ่งมีความสามารถในการรักษาได้ทั้งแผลปกติและแผลเบาหวาน ยาสมานแผลมีคุณสมบัติในการส่งเสริมการหายของแผลที่ผิวหนังได้ อาจจะเป็นผลมาจากการยับยั้งระยะการอักเสบที่มากและนานเกินไป อีกทั้งยังสามารถส่งเสริมระยะการแบ่งเซลล์และระยะการปรับรูปร่างในแผลเฉียบพลันได้



<b>Thesis Title</b>	Wound healing effects of Ya-Samarn-Phlae in type 2 diabetic rats (Goto-Kakizaki rats)
<b>Author</b>	Miss Sineenart Sanpinit
<b>Major Programme</b>	Thai Traditional Medicine
<b>Academic Year</b>	2019

## ABSTRACT

Diabetic foot ulcers (DFUs) has been noted as the most common cause of amputations occurring at least one in 10 people with diabetes. Despite the existence of standard wound care protocols, there is a rising interest in testing and exploring the possibility of medicinal plants and traditional medicines that can serve as effective natural wound healing products for the treatment of DFUs. This study focuses mainly on the wound healing mechanisms of Thai traditional medicine named Ya-Samarn-Phlae which has been prescribed by Mr. Somporn Chanwanisakul, a folk healer in the Southern Thailand. This present work aimed to (I) evaluate the pharmacognostic properties and phytochemical constituents of Ya-Samarn-Phlae's herbal ingredients which are *Curcuma longa* L. (Rhizome), *Areca catechu* L. (Seed), *Oryza sativa* L. (Seed), and *Garcinia mangostana* L. (Pericarp), (II) determine the contents of biological markers and wound-related *in vitro* biological activities of the ethanol extract (E-YaSP), infused oil which is the traditional form (T-YaSP), and ointment containing Ya-Samarn-Phlae (YaSP), (III) examine *in vivo* anti-inflammatory mechanisms of YaSP and T-YaSP, and (IV) describe wound healing mechanisms of YaSP and T-YaSP toward excision wound model in Wistar and non-obese type 2 diabetic Goto-Kakizaki (GK) rats.

The pharmacognostic parameters of *Curcuma longa*, *Areca catechu*, *Oryza sativa*, and *Garcinia mangostana* were evaluated in accordance with either Thai herbal pharmacopeia or the Ayurvedic herbal pharmacopoeia. The amount of their impurities such as foreign matters, total ash content, acid insoluble ash, and percentage of loss on drying were found to be within the limit as per the specification in the pharmacopeias. Similarly, their solvent-soluble extractive values that use for estimating the amount of their active constituents were found to meet the required criteria. Liquid

chromatography mass spectrometry profiling highlights that E-YaSP, T-YaSP, and YaSP contains at least 37, 30, and 19 the known constituents, respectively. Among these, alpha-mangostin and curcumin were selected as representative biological markers since these compounds has been found in all Ya-Samarn-Phlae preparations. The quantitative analysis using high performance liquid chromatography revealed that the contents of alpha-mangostin and curcumin in YaSP was found to be approximately 6 times lower than that of T-YaSP. Moreover, it should be noted that the contents of alpha-mangostin and curcumin in YaSP were more dramatically decreased than that of T-YaSP during the storage period of 6 months. *In vitro* biological assessments have demonstrated that E-YaSP, T-YaSP, and YaSP possessed nitric oxide free radical scavenging ability and lipid peroxidation inhibition, moreover, E-YaSP enhanced human dermal fibroblast migration a scratch wound closure assay and inhibited the nitric oxide production in RAW 264.7 cells stimulated by lipopolysaccharide. Both T-YaSP and YaSP were determined for skin irritation using albino rabbits and categorized based on Globally Harmonized System of Classification Toxicity as a category IV (non-to slightly irritating).

*In vivo* anti-inflammatory mechanisms were described using a carrageenan-induced paw edema model in Wistar rats. Topical administration with YaSP and T-YaSP have shown significant ( $p < 0.05$ ) inhibition of paw oedema on 1<sup>st</sup> hour after injected with carrageenan. These results were found in a similar pattern with paw edema inhibition was seen in phenylbutazone treatment. The levels of inflammatory and oxidative stress markers which are malondialdehyde (MDA), nitric oxide (NO), and myeloperoxidase (MPO) measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) were significantly decreased in T-YaSP and YaSP treated groups and these levels were found to be comparable with phenylbutazone treated group. Furthermore, the results of this study have shown that both treatment with both T-YaSP and YaSP dramatically reduced the pro-inflammatory cytokines including tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha), Interleukin 1 beta (IL-1beta), and prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) and inflammatory enzymes including inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase-2 (COX-2) in inflamed paw tissue. In conclusion, T-YaSP and YaSP may enhance the wound healing process via attenuating its inflammatory phase either by inhibition of nitric oxide production in the inflammatory mode of the macrophages or by causing reductions in the levels of inflammatory cytokines and enzymes.

To further evaluate the wound healing property and describe the mechanisms of action of Ya-Samarn-Phlae preparations, excision wounds were created in six groups consisting of 9-10 rats each. The first two groups received vehicles for YaSP and T-YaSP, while there were two groups that received a commercially available traditional product, Thongnoppakhun® (as a positive control for T-YaSP) or Solcoseryl ointment® (as a positive control for YaSP), and the last two groups received YaSP and T-YaSP topically every other day. The percentage of wound contraction on days 3, 5, 7, 9 and 11 as well as the levels of transforming growth factor beta-1 (TGF-beta1), vascular growth factor (VEGF), collagen type I, and collagen type III and histopathology parameters of healed wounds on 7<sup>th</sup> and 11<sup>th</sup> (for non-diabetic wounds) and on 11<sup>th</sup> (for diabetic wounds) were evaluated. The percentage of wound contraction and the reduction of wound area in the excision wounds were significantly different ( $p < 0.05$ ) between diabetic and non-diabetic rats, whereas notable wound healing effects of both YaSP and T-YaSP elucidated by the reduction of wound area were found to be higher than that of the vehicle controls. In addition, the changes in growth factors including TGF-beta1 and VEGF and the levels of collagen type I and III in YaSP and T-YaSP treated groups were comparable with the positive controls. According to our data, YaSP and T-YaSP could be noted as an effective natural wound healing preparation for both diabetic and non-diabetic wounds. This traditional medicine promotes skin wound healing, possibly by inhibiting the excessive and prolonged inflammatory phase and enhancing both proliferation and remodeling phases of acute wounds.

## กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศศิธร ชูศรี อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ที่ได้ให้คำปรึกษา คำแนะนำ และให้กำลังใจในการศึกษาค้นคว้าวิจัย รวมถึงการเขียนวิทยานิพนธ์ได้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ขอขอบพระคุณ ดร. กฤติยา ทิสยากร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม และศูนย์เชี่ยวชาญนวัตกรรมผลิตภัณท์สมุนไพร สถาบันวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำและอนุเคราะห์สถานที่ในการทำวิจัยในครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. กรกนก อิงคินันท์ วรรุฒิกุลชัย ประธานกรรมการ ดร. นงลักษณ์ กุลวรรรัตน์ และ ดร. จุฬาลักษณ์ โชคไพศาล คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษา คำแนะนำ และตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ Associate Professor Dr. Yuan Wei และ Dr. Jian Tang ที่ให้คำปรึกษา แนะนำ ช่วยเหลือในการทำวิจัย ณ School of Pharmacy, Jiangsu university ประเทศจีน พร้อมทั้งถ่ายทอดความรู้และประสบการณ์ในการทำวิจัยให้เป็นอย่างดี ทำให้การทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้สำเร็จไปได้ด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณ หมอสมพร ชาญวณิชย์สกุล แพทย์แผนไทยประจำโรงพยาบาลการแพทย์แผนไทย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์มอบสูตรตำรับยาสมานแผลเพื่อใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ขอกราบขอบพระคุณ คุณกาญจนา สีแย้ม คุณ และคุณวิเชียร ที่ได้ให้คำปรึกษา แนะนำ ช่วยเหลือในการทำวิจัย พร้อมทั้งถ่ายทอดความรู้และประสบการณ์ในการทำวิจัยให้เป็นอย่างดี ทำให้การทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้สำเร็จไปได้ด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อคุณแม่ และครอบครัวสำหรับการสนับสนุนและเป็นกำลังใจที่ดีมาโดยตลอด

สินีนาง สันพิณิจ

## สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(12)
รายการตาราง	(13)
รายการภาพประกอบ	(16)
สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ	(24)
บทที่	
1. บทนำ	
บทนำต้นเรื่อง	1
การตรวจเอกสาร	4
วัตถุประสงค์	77
2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ	
วัสดุ	78
อุปกรณ์	79
วิธีการ	80
3. ผลการทดลอง	121
4. วิจารณ์	188
5. สรุป	210
เอกสารอ้างอิง	211
ภาคผนวก	228
ประวัติผู้เขียน	250

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1	The inflammatory cells involved the wound healing process.	12
2	The factors affecting wound healing <i>in vivo</i> .	28
3	Medicinal plants that are capable of wound healing activity <i>in vitro</i> .	45
4	Medicinal plants that are capable of wound healing activity <i>in vivo</i> .	47
5	The biological activities involved wound healing of herbal components in Ya-Samarn-Phlae.	62
6	The characteristics found in GK rat and diabetic patients.	71
7	Physicochemical parameters and phytochemical screening of herbal components of Ya-Samarn-Phlae (YaSP).	126
8	The phytochemical constituents of E-YaSP, T-YaSP and YaSP analyzed by liquid chromatograph-mass spectrometer (LC-MS).	128
9	Contents of alpha-mangostin, curcumin and arecoline in Ya-Samarn-Phlae by high performance liquid chromatography (HPLC) method.	131
10	Effects of ethanol extracts from Ya-Samarn-Phlae (E-YaSP) formula and its herbal components on cell viability of human dermal fibroblasts (HDF).	137
11	Dermal irritation study of traditionally prepared-Ya-Samarn-Phlae (T-YaSP) at different time interval in rabbit.	139
12	Dermal irritation study of ointment base for Ya-Samarn-Phlae tulle-gras dressings (YaSP) at different time interval in rabbit.	139
13	Chemical profiles of traditionally prepared-Ya-Samarn-Phlae (T-YaSP) measured by Liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) method in long-trem stability study.	143
14	Chemical profiles of ointment base for Ya-Samarn-Phlae tulle-gras dressings (YaSP) measured by Liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) method in long-trem stability study.	145

รายการตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
15	The content reduction of active constituents in traditionally prepared-Ya-Samarn-Phlae (T-YaSP) and Ya-Samarn-Phlae tulle-gras dressings (YaSP) by high performance liquid chromatography (HPLC) method after extended storage.	146
16	Nitric oxide scavenging and lipid peroxidation inhibition capabilities of traditionally prepared-Ya-Samarn-Phlae (T-YaSP) and Ya-Samarn-Phlae tulle-gras dressings (YaSP).	147
17	Effect of traditionally prepared-Ya-Samarn-Phlae (T-YaSP) on the production of malondialdehyde (MDA), nitric oxide (NO), and myeloperoxidase (MPO) in carrageenan-induced paw edema in rats.	153
18	Effect of ointment base for Ya-Samarn-Phlae tulle-gras dressings (YaSP) on the production of malondialdehyde (MDA), nitric oxide (NO), and myeloperoxidase (MPO) in carrageenan-induced paw edema in rats.	153
19	The comparison of anti-inflammatory activity between T-YaSP and YaSP in carrageenan induced rat paw edema model.	158
20	The levels of transforming growth factor beta-1 (TGF-beta1), vascular endothelial growth factor (VEGF), collagen type I, and collagen type III in skin wounds of non-diabetic rats treated with traditionally prepared-Ya-Samarn-Phlae (T-YaSP).	167
21	The levels of transforming growth factor beta-1 (TGF-beta1), vascular endothelial growth factor (VEGF), collagen type I, and collagen type III in skin wounds of non-diabetic rats treated with ointment base for Ya-Samarn-Phlae tulle-gras dressings (YaSP).	168
22	The levels of transforming growth factor beta-1 (TGF-beta1), vascular endothelial growth factor (VEGF), collagen type I, and collagen type III in type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats treated with traditionally prepared-Ya-Samarn-Phlae (T-YaSP).	179

## รายการตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
23	The levels of transforming growth factor beta-1 (TGF-beta1), vascular endothelial growth factor (VEGF), collagen type I, and collagen type III in type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats treated with ointment base for Ya-Samarn-Phlae tulle-gras dressings (YaSP).	180
24	Chemical profiles of Ya-Samarn-Phlae and its four components using liquid chromatography–mass spectrometry (LC-MS).	228



## รายการภาพประกอบ

รูปที่		หน้า
1	The pattern of white blood cells infiltration into the wound area.	13
2	The role of Wnt/beta catenin signaling pathway in wound healing process.	17
3	The role of Notch signaling pathway in wound healing process.	20
4	The role of Transforming growth factor-beta (TGF-beta)/Smad signaling pathway in wound healing process.	24
5	กลไกการเกิดโรคเบาหวานตามหลักสมดุลของธาตุทั้ง 4	40
6	Macroscopic characters and powders of <i>Curcuma longa</i> (A and B), <i>Garcinia mangostana</i> (C and D), <i>Oryza sativa</i> (E and F) and <i>Areca catechu</i> (G and H).	51
7	Powder microscopy of <i>Curcuma longa</i> (CL), <i>Garcinia mangostana</i> (GM), <i>Oryza sativa</i> (OS) and <i>Areca catechu</i> (AC). NF; Not found.	124
8	The pie chart showing a number of phytochemical constituents of E-YaSP (A), T-YaSP (B) and YaSP (C) analyzed by liquid chromatograph-mass spectrometer (LC-MS).	127
9	Anti-inflammatory activity of Ya-Samarn-Phlae (E-YaSP; 0.1 mg/ml, T-YaSP 0.1 %v/v, YaSP 0.1 %w/v) on nitric oxide scavenging activity (A) and nitrite production in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages (B).	135
10	The effect of ethanol extracts from <i>Curcuma longa</i> (A), <i>Garcinia mangostana</i> (B), <i>Oryza sativa</i> (C) and <i>Areca catechu</i> (D) on cell viability and nitric oxide production in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. *, $p < 0.05$ is indicated significant difference between LPS stimulation (control) and treatment. #, $p < 0.05$ is indicated significant difference between normal conditions (without LPS) and treatment.	136

### รายการภาพประกอบ (ต่อ)

รูปที่		หน้า
11	Digital image showing the effect of ethanol extracts from Ya-Samarn-Phlae (E-YaSP) formula and its herbal components on human dermal fibroblast migration in a wound scratch test assay. I: control (10% dimethyl sulfoxide); II: control (dulbecco's modified eagle medium; DMEM); III: E-YaSP; IV: 1 mg/ml <i>C. longa</i> ; V: 0.1 mg/ml <i>A. catechu</i> ; VI: 1 mg/ml <i>O. zativa</i> ; VII: 1 mg/ml <i>G. mangostana</i> ; VII: 0.1 mg/ml vitamin C.	138
12	Inhibition of nitric oxide radicals (A) and malondialdehyde (B) by prepared-Ya-Samarn-Phlae (T-YaSP; 1% v/v; black bars) in comparison with ointment base for Ya-Samarn-Phlae tulle-gras dressings (YaSP; 1% w/v; white bars). *, $p < 0.05$ is indicated significant difference between T-YaSP and YaSP.	148
13	Paw thickness in rats treated with traditionally prepared-Ya-Samarn-Phlae (T-YaSP; black bars) (A) or ointment base for Ya-Samarn-Phlae tulle-gras dressings (YaSP; black bars) (B), 5% (w/v) of phenylbutazone (grey bars) in comparison with vehicle-treated group (white bars) on carrageenan-induced paw edema model. Paw thickness degree was presented as the mean $\pm$ SEM of 15 rats per group, * $p < 0.001$ vs. vehicle.	152
14	Effect of traditionally prepared-Ya-Samarn-Phlae (T-YaSP) on the production of inflammatory cytokines, TNF-alpha (A), IL-1beta (B) and PGE <sub>2</sub> (C) and inducible enzymes, iNOS (D) and COX-2 (E) in the rat paws treated with carrageenan. Data are presented as mean $\pm$ SEM of five rats. <sup>(a-d)</sup> Values in the same factor followed by a different letter are significantly different ( $p < 0.001$ ). Phenylbutazone (PBZ, 5%; w/v) was used as a positive control.	154

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

รูปที่		หน้า
15	Effect of ointment base for Ya-Samarn-Phlae tulle-gras dressings (YaSP) on the production of inflammatory cytokines, TNF-alpha (A), IL-1beta (B) and PGE <sub>2</sub> (C) and inducible enzymes, iNOS (D) and COX-2 (E) in the rat paws treated with carrageenan. Data are presented as mean±SEM of five rats. <sup>(a-d)</sup> Values in the same factor followed by a different letter are significantly different ( $p < 0.001$ ). Phenylbutazone (PBZ, 5%; w/w) was used as a positive control.	155
16	Histological evaluation of carrageenan induced paw edema in rat. Representative photomicrographs of paw tissue showing the protective effect of traditionally prepared-Ya-Samarn-Phlae (T-YaSP; A) compared with the intact group (D), vehicle (B) and phenylbutazone-treatment as a positive control (C). White arrows: neutrophils. Magnification, 10X and 40X; scale bars, 100 µm.	156
17	Representative photomicrographs of the histopathological analysis from paw tissue of rats showing the protective effect of ointment base for Ya-Samarn-Phlae tulle-gras dressings (YaSP; A) compared with the intact group (D), vehicle (B) and phenylbutazone-treatment as a positive control (C). White arrows: neutrophils. Magnification, 10X and 40X; scale bars, 100 µm.	157
18	The graphical conclusion on anti-inflammatory partial mechanism of Ya-Samarn-Phlae.	161

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

รูปที่		หน้า
19	Representative macrophotographs of wounds (A), wound areas (B), and percentage of wound closure (C) in non-diabetic Wistar rats, measured at the operation day (day 0) and on days 3, 5, 7, 9 and 11 after daily treatment with vehicle, a traditional herbal oil Thongnoppakhun <sup>®</sup> (a positive control), or T-YaSP. The results represent the mean±SEM of 9-10 animals per group. * $p < 0.05$ vs the control. <sup>(a-c)</sup> Values in the same days followed by a different letter are significantly different at $p < 0.05$ .	165
20	Representative macrophotographs of wounds (A), wound areas (B) and percentage of wound closure (C) in non-diabetic Wistar rats, measured at the operation day (day 0) and on days 3, 5, 7, 9 and 11 after daily treatment with vehicle, Solcoseryl ointment <sup>®</sup> (a positive control), or YaSP. The results represent the mean±SEM of 9-10 animals per group. * $p < 0.05$ vs the control. <sup>(a-c)</sup> Values in the same days followed by a different letter are significantly different at $p < 0.05$ .	166
21	H&E stained tissue sections from non-diabetic wound tissues treated with vehicle (A), a commercial available traditional herbal oil Thongnoppakhun <sup>®</sup> ; (a positive control; B), traditionally prepared-Ya-Samarn-Phlae (T-YaSP; C) and normal tissue (D) for 7 (I) and 11 (II) days. The T-YaSP treated rats showing large amount of collagen (white arrow), fibroblast (black arrow), and small number of inflammatory cell (white arrowhead). Magnification, 40X; scale bars, 100 $\mu\text{m}$ .	169

### รายการภาพประกอบ (ต่อ)

รูปที่		หน้า
22	H&E stained tissue sections from non-diabetic wound tissues treated with vehicle (A), Solcoseryl ointment <sup>®</sup> (reference drug; B), ointment base for Ya-Samarn-Phlae tulle-gras dressings (YaSP; C) and normal tissue (D) for 7 (I) and 11 (II) days. The YaSP treated rats showing amount of collagen (white arrow) and fibroblast (black arrow) and small number of inflammatory cell (white arrowhead). Magnification, 40X; scale bars, 100 $\mu$ m.	170
23	Masson's trichrome stained tissue sections from non-diabetic wound tissues treated with vehicle (A), a commercial available traditional herbal oil Thongnoppakhun <sup>®</sup> ; (a positive control; B), traditionally prepared-Ya-Samarn-Phlae (T-YaSP; C) and normal tissue (D) for 7 (I) and 11 (II) days. The T-YaSP treated rats showing amount of collagen (dark blue). Magnification, 40X; scale bars, 100 $\mu$ m.	171
24	Masson's trichrome stained tissue sections from non-diabetic wound tissues treated with vehicle (A), Solcoseryl ointment <sup>®</sup> (reference drug; B), ointment base for Ya-Samarn-Phlae tulle-gras dressings (YaSP; C) and normal tissue (D) for 7 (I) and 11 (II) days. The YaSP treated rats showing amount of collagen (dark blue). Magnification, 40X; scale bars, 100 $\mu$ m.	172
25	The comparison of wound healing activity, including wound area (A), growth factors (B and C) and collagen content (D and E) of non-diabetic wounds treated with T-YaSP (black bars) and YaSP (white bars) in excision wound model. *Significantly difference between rats treated with T-YaSP and YaSP ( $p < 0.05$ ) (Independent samples T-Test).	173
26	The fasting blood glucose level of rats treated with T-YaSP (A) and YaSP (B). The data represent the mean $\pm$ SEM of 5-6 animals per group.	176

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

รูปที่		หน้า
27	<p>Representative macrophotographs of wounds (A), wound areas (B) and percentage wound closure (C) in type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats, measured at the operation day (day 0) and on days 3, 5, 7, 9 and 11 after daily treatment with vehicle, a commercial available traditional herbal oil Thongnoppakhun<sup>®</sup> (a positive control), or T-YaSP. The results represent the mean±SEM of 9-10 animals per group. * <math>p &lt; 0.05</math> vs the control. <sup>(a-c)</sup> Values in the same days followed by a different letter are significantly different (<math>p &lt; 0.05</math>).</p>	177
28	<p>Representative macrophotographs of wounds (A), wound areas (B) and percentage wound closure (C) in type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats, measured at the operation day (day 0) and on days 3, 5, 7, 9 and 11 after daily treatment with vehicle, Solcoseryl ointment<sup>®</sup> (a positive control), or ointment base for Ya-Samarn-Phlae tulle-gras dressings (YaSP). The results represent the mean±SEM of 9-10 animals per group. * <math>p &lt; 0.05</math> vs the control. <sup>(a-c)</sup> Values in the same days followed by a different letter are significantly different (<math>p &lt; 0.05</math>).</p>	178
29	<p>H&amp;E stained tissue sections from diabetic wound tissues treated with vehicle of T-YaSP (A), a commercial available traditional herbal oil Thongnoppakhun<sup>®</sup>; (a positive control; B), traditionally prepared-Ya-Samarn-Phlae (T-YaSP; C), vehicle of YaSP (E), Solcoseryl ointment<sup>®</sup> (reference drug; F), ointment base for Ya-Samarn-Phlae tulle-gras dressings (YaSP; G) and normal tissue (D and H) for 11 day. The T-YaSP and YaSP were treated diabetic rats showing amount of collagen (white arrow) and fibroblast (black arrow) and small number of inflammatory cell (white arrowhead). Magnification, 40X; scale bars, 100 <math>\mu\text{m}</math>.</p>	181

### รายการภาพประกอบ (ต่อ)

รูปที่		หน้า
30	Masson's trichrome stained tissue sections from diabetic wound tissues treated with vehicle of T-YaSP (A), a commercial available traditional herbal oil Thongnoppakhun®; (a positive control; B), traditionally prepared-Ya-Samarn-Phlae (T-YaSP; C), vehicle of YaSP (E), Solcoseryl ointment® (reference drug; F), ointment base for Ya-Samarn-Phlae tulle-gras dressings (YaSP; G) and normal tissue (D and H) for 11 day. The T-YaSP and YaSP were treated rats showing amount of collagen (dark blue). Magnification, 40X; scale bars, 100 µm.	182
31	The comparison of wound healing activity, including wound area (A), growth factors (B and C) and collagen content (D and E) of diabetic wounds treated with T-YaSP (black bars) and YaSP (white bars) in excision wound model. *Significantly difference between rats treated with T-YaSP and YaSP ( $p < 0.05$ ).	183
32	Mechanism of Ya-Samarn-Phlae on wound healing process (proliferation phase (A) and remodeling phase (B)) in non-diabetic wound.	186
33	Mechanism of Ya-Samarn-Phlae on wound healing process (proliferation and remodeling phase) in diabetic wound.	187
34	The structures of the identified 5 compounds in ethanol extract from <i>Curcuma longa</i> L., including curcumenol (A), aurrumillone (B), demethoxycurcumin (C), bisdemethoxycurcumin (C) and benzoylagmatine (E).	245
35	The structures of the identified 5 compounds in ethanol extract from <i>Garcinia mangostana</i> L., including 1-isomangostin (1), beta-dihydrorotenone (2), alpha-mangostin (3), archangelicin (4) และ 9-hydroxycalabaxanthone (5).	245

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

รูปที่		หน้า
36	The structures of the identified 5 compounds in ethanol extract from <i>Oryza sativa</i> L., including 8-methoxy-13-hydroxy-9,11-octadecadienoic acid (A), nigerose (sakebiose) (B), 9Z,12Z,15E-octadecatrienoic acid (C), C-2 ceramide (D) and 6E,9E-octadecadienoic acid (E).	246
37	The structures of the identified 5 compounds in ethanol extract from <i>Areca catechu</i> L., including arecoline (1), N-cyclohexanecarbonylpentadecylamine (2), procyanidin B1 (3), 11,12-dihydroxy arachidic acid (4) and 2-Methyl-3-thiophenethiol (5).	246
38	The structures of the identified 5 compounds in ethanol extract from Ya-Samarn-Phlae, including alpha-mangostin (1), arecoline (2), 1-isomangostin (3), curcumenol (4) and beta-dihydrorotenone (5).	247
39	The structures of the identified 5 compounds in T-YaSP including alpha-mangostin (1), curcumin (2), beta-dihydrorotenone (3), dihydroisoalantolactone (4) and ponganone VIII (5).	247
40	The structures of the identified 5 compounds in YaSP, including alpha-mangostin (1), curcumin (2), C16 sphinganine (3), stigmatellin Y and demethoxycurcumin (5).	248
41	HPLC calibration curve of curcumin (A), alpha-mangostin (B) and arecoline (C).	249



### สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ

E-YaSP	=	Ethanol extracted of Ya-Samarn-Phlae
T-YaSP	=	Traditionally prepared-Ya-Samarn-Phlae
YaSP	=	Ointment base for Ya-Samarn-Phlae tulle-gras dressings
TNF-alpha	=	Tumor necrotic factor-alpha
IL-1beta	=	Interleukin-1beta
MDA	=	Malondialdehyde
MPO	=	Myeloperoxidase
NO	=	Nitric oxide
TGF-beta1	=	Tranforming growth factor-beta1
VEGF	=	Vascular endothelial growth factor
OD	=	Optical density
rpm	=	Revolutions per minute

## บทที่ 1

### บทนำ

#### บทนำต้นเรื่อง

กระบวนการหายของแผล (wound healing process) คือ กระบวนการทางชีววิทยาที่มีความซับซ้อนซึ่งเกี่ยวข้องกับการซ่อมแซมเนื้อเยื่อหลังจากการได้รับบาดเจ็บ (Velnar *et al.*, 2009) โดยสามารถแบ่งออกได้เป็น 4 ระยะ คือ ระยะการห้ามเลือด (haemostasis phase) ระยะการอักเสบ (inflammation phase) ระยะการเพิ่มจำนวนของเซลล์ (proliferation phase) และระยะการปรับรูปร่าง (remodeling phase) (Shah *et al.*, 2012) กระบวนการหายของแผลปกติจะเกิดขึ้นทันทีเมื่อร่างกายได้รับบาดเจ็บ โดยเริ่มจากระยะการห้ามเลือด เพื่อป้องกันการสูญเสียเลือดออกนอกร่างกาย โดยการทำงานของเกล็ดเลือด พร้อมทั้งมีการหลั่งปัจจัยการเจริญเติบโต (growth factor) ได้แก่ transforming growth factor (TGF)-beta ทำหน้าที่เป็นตัวชักนำเซลล์เม็ดเลือดขาว (mast cell, neutrophil, macrophage และ T-cell ตามลำดับ) ไปยังบริเวณแผล และเข้าสู่ระยะการอักเสบ ซึ่งเป็นระยะที่มีความสำคัญของกระบวนการหายของแผล โดยเซลล์เม็ดเลือดขาวจะทำหน้าที่กำจัดและทำลายสิ่งแปลกปลอมหรือเนื้อตายบริเวณแผล ในขณะที่เกิดปฏิกิริยาการอักเสบเซลล์ macrophage ในระยะ M1 จะมีการหลั่งสารสื่อกลางในการอักเสบชนิดต่าง ๆ ได้แก่ nitric oxide (NO), prostaglandins E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) และ pro-inflammatory cytokines (Jung *et al.*, 2009) เพื่อส่งเสริมกระบวนการอักเสบ เมื่อบริเวณแผลปราศจากสิ่งแปลกปลอม เซลล์ macrophage จะเกิดการเปลี่ยนแปลงจากระยะ M1 ไปเป็นระยะ M2 โดยจะมีการหลั่ง interleukin-10 (IL-10) ซึ่งทำหน้าที่เป็น anti-inflammatory cytokines เพื่อหยุดกระบวนการอักเสบ และมีการหลั่ง TGF-beta ออกมาจำนวนมากซึ่งเป็น growth factor ที่สำคัญในการเปลี่ยนผ่านจากระยะการอักเสบเข้าสู่ระยะการเพิ่มจำนวนของเซลล์ ซึ่ง TGF-beta ที่หลั่งออกมาจาก macrophage M2 ในช่วงท้ายของระยะการอักเสบ จะมีผลกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์ keratinocyte, fibroblast และกระตุ้นการสร้าง collagen ทำให้เกิดการหดตัวของแผล และเข้าสู่ระยะการปรับรูปร่าง โดยจะเกี่ยวข้องกับการสร้างและสลาย extracellular matrix (ECM) บริเวณแผล จนกระทั่งแผลหายเป็นปกติ แต่หากเกิดความผิดปกติในระยะใดระยะหนึ่ง จะทำให้เกิดความบกพร่องและล่าช้าในกระบวนการหายของแผล จะเกิดเป็นแผลเรื้อรัง (chronic wound) ขึ้น

โรคเบาหวาน (diabetic mellitus) คือ โรคเรื้อรังที่เป็นปัญหาสำคัญทางด้านสาธารณสุขทั่วโลก ในปี ค.ศ. 2015 มีผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคเบาหวานประมาณ 415 ล้านคน

ทั่วโลก และคาดว่าผู้ป่วยโรคเบาหวานจะเพิ่มขึ้นเป็น 642 ล้านคนในปี ค.ศ. 2040 (Zimmet *et al.*, 2016) ในประเทศไทย จากรายงานการสำรวจสุขภาพประชากรไทยโดยการตรวจร่างกาย ครั้งที่ 5 พ.ศ. 2557 พบว่าคนไทยอายุ 15 ปีขึ้นไป มีความชุกของโรคเบาหวานเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 6.9 ในปี พ.ศ. 2552 เป็นร้อยละ 8.9 ในปี พ.ศ. 2557 การมีระดับน้ำตาลในเลือดสูงเป็นเวลานาน จะก่อให้เกิดผลเสียต่อหลอดเลือดแดงที่ไปเลี้ยงอวัยวะต่าง ๆ ทำให้เกิดการมองเห็นลดลง การกรองที่ไตลดลง และการนำกระแสประสาทเสื่อม หรือที่เรียกว่า diabetic neuropathy โดยเฉพาะบริเวณปลายเท้า ทำให้เกิดอาการชาจากปลายประสาทที่เท้าเสื่อม และก่อให้เกิดแผลเรื้อรังได้ง่าย โดยแผลที่เท้าของผู้ป่วยเบาหวาน (diabetic foot ulcers; DFUs) สามารถพบได้ประมาณ 25% ของผู้ป่วยเบาหวานทั้งหมด (Boulton, 2013) นอกจากนี้ภาวะน้ำตาลในเลือดสูง (hyperglycemia) ที่พบในผู้ป่วยเบาหวาน จะมีผลต่อการทำงานของเซลล์ macrophage ทำให้คุณสมบัติของ macrophage ในการกำจัดเซลล์ neutrophil ที่เกิดการ apoptotic ลดลง (Hesketh *et al.*, 2017) ซึ่งภาวะแผลเรื้อรังเนื่องจากโรคเบาหวานจะเกี่ยวข้องกับระยะการอักเสบที่ใช้เวลานาน ซึ่งขาดความสมดุลระหว่าง pro- และ anti-inflammatory cytokines โดย macrophage ในแผลเบาหวาน จะมีการสร้าง pro-inflammatory cytokines สูงกว่าเมื่อเทียบกับแผลปกติ (Weisberg *et al.*, 2003; Goren *et al.*, 2007)

การทำแผลโดยใช้ยาใส่แผล เป็นวิธีการรักษาพยาบาลที่ปฏิบัติกันโดยทั่วไป ทั้งในรูปแบบยา น้ำ เจล ครีม ขี้ผึ้ง หรือแผ่นปิดแผล ซึ่งมีคุณสมบัติต้านเชื้อแบคทีเรีย ต้านการอักเสบ และกระตุ้นการสร้างเนื้อเยื่อใหม่บริเวณแผล เช่น povidone iodine ซึ่งมีคุณสมบัติที่ดีต่อการต้านเชื้อแบคทีเรีย รวมทั้งมีคุณสมบัติต้านการอักเสบโดยมีผลต่อการยับยั้งการทำงานของเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบและยับยั้งสารสื่อกลางต่าง ๆ เช่น tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) และ NO และยังมีผลยับยั้งการสร้างเอนไซม์ metalloproteinase (MMP) (Beukelman *et al.*, 2008; Bigliardi *et al.*, 2017) และมีการใช้ solcoseryl jelly ในการรักษาแผล จากงานวิจัยของ Imran และคณะ (2015) ได้ศึกษาผลของการใช้ 10% solcoseryl jelly ต่อการรักษาแผลในหนูทดลอง พบว่าหนูกลุ่มที่ได้รับ 10% solcoseryl jelly มีระยะเวลาในการหายของแผล (22 วัน) เร็วกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (32 วัน) และการใช้ในรูปแบบ solcoseryl ointment พบว่าสามารถเพิ่มการแสดงออกของ TGF-beta1 และ vascular endothelial growth factor A (VEGF-A) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการส่งเสริม TGF-beta1 และ VEGF-a signalling pathway ในเนื้อเยื่อแผล และยังมีผลต่อการสังเคราะห์ collagen และสร้างหลอดเลือดใหม่บริเวณเนื้อเยื่อแผลมากขึ้น (Nafiu and Rahman, 2015) นอกจากนี้มีการนำ growth factor เช่น epidermal growth factor (EGF) มาประยุกต์ใช้ในรูปแบบเจลทาแผล ออกฤทธิ์โดยการไปจับกับ epidermal growth factor receptor (EGFR) กระตุ้นให้เกิด cell proliferation และ เร่งการสร้าง granulation tissue ซึ่งสามารถรักษาแผลเรื้อรังให้หายเป็นปกติ

ได้ (Hardwicke *et al.*, 2008)

ในปัจจุบันมีการนำสมุนไพรมาใช้ในการรักษาโรคต่างๆ รวมทั้งการรักษาแผลเรื้อรังอย่างแพร่หลาย ซึ่งเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการรักษาแผล ในทางการแพทย์แผนไทยมีการใช้ยาสมุนไพรมาเป็นระยะเวลาช้านานเพื่อรักษาแผล โดยส่วนใหญ่จะนิยมใช้ยาตำรับซึ่งประกอบด้วยสมุนไพรมากกว่าหนึ่งชนิดในการรักษาโรคมกกว่าสมุนไพรเดี่ยว เพราะสมุนไพรองค์ประกอบในยาตำรับจะมีคุณสมบัติในการเสริมฤทธิ์กัน ช่วยให้การรักษาโรคต่าง ๆ มีประสิทธิภาพมากขึ้น แต่รายงานวิจัยส่วนใหญ่มีการทดสอบผลต่อการหายของแผลของสมุนไพรเดี่ยวเท่านั้น ดังนั้นการศึกษาทางวิทยาศาสตร์ของตำรับยาจึงมีความจำเป็นเพื่อใช้เป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ในการนำมาสนับสนุนการใช้งาน จากการศึกษาก่อนหน้านี้ ได้ศึกษาตำรับยารักษาแผลในภาคใต้ พบว่าประสิทธิภาพของการใช้ตำรับยาในการทดสอบฤทธิ์ต่าง ๆ จะดีกว่าพืชสมุนไพรเดี่ยว ตำรับยาสมานแผล (Ya-Samarn-Phlae; YaSP) สกัดด้วย 95% เอทานอล ของหมอสมพร ชาญวณิชย์สกุล ซึ่งเป็นแพทย์แผนไทย ประจำโรงพยาบาลการแพทย์แผนไทย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ ประกอบด้วยพืชสมุนไพร 4 ชนิด คือ เหง้าขมิ้นชัน (*Curcuma longa* L.) เปลือกมังคุด (*Garcinia mangostana* L.) เมล็ดหมาก (*Areca catechu* L.) และข้าวสาร (*Oryza sativa* L.) มีประสิทธิภาพดีในการต้านเชื้อ *Staphylococcus aureus* สายพันธุ์ MRSA, MSSA และ ATCC25923 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่พบบ่อยว่าเป็นสาเหตุของการติดเชื้อทางผิวหนังส่งผลให้แผลหายช้า โดยมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งเชื้อ (minimal inhibitory concentration; MIC) อยู่ในช่วง 2-4 µg/ml นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านการอักเสบอีกด้วย (Chusri *et al.*, 2013)

ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะนำตำรับยาสมานแผลในรูปแบบของยาน้ำมันและยาเตรียมแคลือบแผ่นปิดแผลมาศึกษาต่อในระดับสัตว์ทดลองถึงฤทธิ์ต้านการอักเสบ ฤทธิ์ต่อการหายของแผลในหนูปกติ หนูเบาหวาน และศึกษากลไกการออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการหายของแผล ซึ่งผลที่คาดว่าจะได้รับจากการศึกษาในครั้งนี้ คือ หลักฐานทางวิทยาศาสตร์ที่จะช่วยอธิบายการนำตำรับยามาใช้รักษาแผลนำไปสู่การยอมรับของการใช้ยาสมุนไพรและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติเป็นทางเลือกในการดูแลสุขภาพ และใช้เป็นข้อมูลทางวิทยาศาสตร์เพิ่มเติมในการพัฒนาผลิตภัณฑ์รักษาแผลจากตำรับยาสมุนไพรไทยในอนาคต

## การตรวจเอกซเรย์

### 1. กลไกของกระบวนการอักเสบ (inflammation) และบทบาทของกระบวนการอักเสบที่เกี่ยวข้องกับการหายของแผล

กลไกของกระบวนการอักเสบ (inflammation)

การอักเสบ (inflammation) เป็นส่วนหนึ่งของกระบวนการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันในร่างกายต่อสิ่งที่ทำให้เกิดการบาดเจ็บของเนื้อเยื่อ เช่น การได้รับหรือสัมผัสกับสารเคมี การติดเชื้อไวรัสหรือแบคทีเรีย และการเกิดแผล เป็นต้น (Wu and Chen, 2014) หลังจากการเกิดแผล จะทำให้หลอดเลือดตีงหด ส่งผลต่อการหดตัวของหลอดเลือด (vasoconstriction) ที่เป็นผลมาจากการทำงานของ nerve reflex ซึ่งอยู่บริเวณเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือด (endothelial cell) เพื่อชะลอการไหลของเลือด จากนั้นเกล็ดเลือด (platelet) ซึ่งอยู่ในหลอดเลือดจะตอบสนองโดยการยึดเกาะกับชั้น subendothelial layer ของตำแหน่งหลอดเลือดที่ตีงหด โดยอาศัยตัวรับ (receptor) ที่อยู่บนผิวของเกล็ดเลือด (platelet membrane) ได้แก่ glycoprotein (GP) receptor ซึ่งมีหลายชนิด แต่ชนิดที่มีความสำคัญในการยึดเกาะ คือ GP Ia/IIa และ GP Ib/IX โดย GP Ia/IIa จะเข้าจับกับ subendothelial collagen และ GP Ib/IX จะเข้าจับกับโปรตีน von Willebrand factor (vWF) ซึ่งอยู่ใน plasma ทำหน้าที่เป็น cell adhesion molecule โดย vWF จะเป็นตัวเชื่อมต่อระหว่าง subendothelial collagen กับ GP Ib/IX ของ platelet membrane ทำให้ platelet เกิดการยึดกับ subendothelial layer ได้ดีขึ้น เรียกกระบวนการนี้ว่า platelet adhesion (Thomas and Storey, 2015) หลังจากนั้น platelet จะหลั่ง chemical mediators เช่น adenosine diphosphate (ADP), thromboxane A2 (TxA2) หรือ serotonin จาก granules เพื่อกระตุ้นให้ platelet ตัวอื่นๆ เข้ามารวมตัวและเกาะกลุ่มกันมากขึ้นจนเกิดเป็น platelet plug หรือเรียกกระบวนการนี้ว่า platelet aggregation (Golebiewska and Poole, 2015) หลังจากนั้นจะเกิดกระบวนการสร้างลิ่มเลือด ซึ่งอาศัยปัจจัยการแข็งตัวของเลือด (clotting factor) เช่น F1 (fibrinogen), FII (prothrombin) หรือ FIII (thromboplastin) เป็นต้น โดยจะเกิดการเปลี่ยนแปลงจาก prothrombin ไปเป็น thrombin ซึ่งมีคุณสมบัติในการเปลี่ยน fibrinogen ไปเป็น fibrin และเข้ารวมตัวกับกลุ่ม platelet ทำหน้าที่เป็นโครงข่าย (mesh-like matrix) ให้ platelet หลังจากนั้นจะเกิดการเชื่อมต่อ หรือ cross-linking ระหว่าง fibrin ทำให้ลิ่มเลือดแข็งแรงมากขึ้น เรียกว่า fibrin clot (Palta *et al.*, 2014) เพื่อหยุดการไหลของเลือด นอกจากนี้ platelet ยังทำหน้าที่สร้างและหลั่ง cytokines หรือ growth factors ได้แก่ thrombin, transforming growth factor (TGF)-beta, platelet derived growth factor (PDGF) และ vascular endothelial growth factor (VEGF) ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวชักนำให้เซลล์เม็ดเลือดขาวเคลื่อนที่ออกจากหลอดเลือดเข้าสู่บริเวณแผลอีกด้วย ในขณะที่เดียวกันเมื่อเกิดแผล

เนื้อเยื่อบริเวณผิวหนังที่ได้รับบาดเจ็บ และ mast cells จะมีการสร้างและหลั่งสาร histamine ส่งผลให้เกิดการขยายตัวของหลอดเลือด (vasodilation) เพิ่มการซึมผ่านของหลอดเลือด (vascular permeability) และชักนำเซลล์ neutrophil ให้เคลื่อนที่ออกนอกหลอดเลือดเข้าสู่บริเวณแผล จากการศึกษาของ Egozi และคณะ (2003) พบว่าหนูที่มีความบกพร่องของ mast cells (mast cells-deficient WBB6F1/J-KitW/KitW-v mice) จะทำให้มีจำนวนของ neutrophils บริเวณแผลลดลง แต่การแทรกซึมของ macrophage และ T-cell เป็นปกติ นอกจากนี้ พบว่าหนูที่มีความบกพร่องของ mast cells ไม่มีผลต่อการสร้างเนื้อเยื่อใหม่ การสังเคราะห์ collagen หรือการสร้างหลอดเลือดใหม่ ซึ่งผลการทดลองนี้สามารถชี้ให้เห็นว่า mast cells มีผลต่อการชักนำ neutrophils ไปยังบริเวณแผลลดลง จากการศึกษาของ Tellechea และคณะ (2016) ได้ศึกษาผลต่อการหายของแผลในหนูเบาหวานและหนูที่ไม่เป็นเบาหวานที่มีความบกพร่องของ MC (MC-deficient WBB6F1/J-KitW/KitW-v mice) เปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุม (wild type; WT) พบว่าทั้งหนูที่เป็นและไม่เป็นโรคเบาหวานที่มีความบกพร่องของ MC มีการหายของแผลช้ากว่าหนูกลุ่ม WT อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ได้ตรวจหาการแสดงออกของ VEGF mRNA และ MMP-9 mRNA จากเนื้อเยื่อแผลในวันที่ 10 หลังการเกิดแผล พบว่า หนูในกลุ่ม KitW/KitW-v mice มีการแสดงออก VEGF mRNA ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุม แต่มีการแสดงออกของ MMP-9 mRNA เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ mast cells ยังมีผลกระตุ้นการสร้าง selectins ซึ่งเป็น adhesion molecule ของ endothelial cell อีกด้วย (Eming *et al.*, 2007) เมื่อหลอดเลือดขยายตัว และมีการสร้าง selectins บริเวณ endothelial cell จะเกิดการจับกันระหว่าง selectins ligand และ chemokines receptor บนผนังเซลล์ของ neutrophil ซึ่งเป็นเม็ดเลือดขาวชนิดแรกที่เข้าสู่บริเวณแผล หลังเกิดการบาดเจ็บ ในช่วง 6-24 ชม. แรก กับ selectins และ chemokines บริเวณ endothelial cell ทำให้เกิดการหมุน (rolling) เคลื่อนตัวไปช้าๆ บนผนังหลอดเลือด จากนั้น neutrophil จะยึดเกาะ (adhesion) กับ endothelial cell และเกิดการคืบคลาน เคลื่อนตัวผ่านผนังหลอดเลือด โดยอาศัย integrins ซึ่งได้แก่ CD11a/CD18 (LFA-1), CD11b/CD18 (MAC-1), CD11c/CD18 (gp150, 95) และ CD11d/CD18 (Tan *et al.*, 2000; Sumagin *et al.*, 2010) ที่อยู่บนผนังเซลล์ของ neutrophil จับกับ integrins ligand บน endothelial cell ทำให้ neutrophil แทรกซึมออกนอกหลอดเลือด และเคลื่อนที่ไปยังบริเวณแผล เพื่อจับกินสิ่งแปลกปลอมต่าง ๆ (Soehnlein *et al.*, 2017)

Neutrophil ใช้วิธี phagocytosis เพื่อจับกินสิ่งแปลกปลอมบริเวณแผล โดยผ่านการทำงาน 3 รูปแบบ คือ 1) การสังเคราะห์ reactive oxygen species (ROS) ออกมาเป็นจำนวนมาก หรือที่เรียกว่า oxidative bursts 2) การปลดปล่อยเอนไซม์ต่าง ๆ (lytic enzymes) ออกจากแกรนูล และ 3) การสร้าง neutrophil extracellular traps (NETs) สิ่งเหล่านี้ที่เกิดขึ้นโดยการทำงานของ neutrophil จะมีผลต่อกระบวนการอักเสบ การชักนำเซลล์ macrophage เข้าสู่

บริเวณแผล เป็นต้น (Bjornsdottir *et al.*, 2015; Perobelli *et al.*, 2015; Selders *et al.*, 2017) มีรายงานก่อนนี้ระบุว่าการทำงานของ neutrophils มีทั้งผลดีและผลเสียต่อกระบวนการหายของแผล ในสภาวะการหายของแผลที่เป็นปกติ การชักนำของ neutrophils เข้าสู่บริเวณที่เกิดการอักเสบจะถูกควบคุมโดยการทำงานของเซลล์ macrophages เนื่องจาก neutrophils มีอายุสั้น และจะเกิดการ apoptosis จากนั้น macrophages จะจับกินซากของ neutrophils ที่ตายแล้ว ซึ่งเป็นการเริ่มต้นของกระบวนการควบคุมการอักเสบ แต่ในแผลที่ไม่หาย เซลล์อักเสบจะถูกชักนำและกระตุ้นให้เกิดการทำงานอย่างต่อเนื่อง นำไปสู่การอักเสบที่ยาวนาน (Wilgus *et al.*, 2013) โดยส่งผลให้มีการสร้าง ROS ออกมาเป็นจำนวนมาก ทำให้เกิดความไม่สมดุลระหว่างสารอนุมูลอิสระกับสารต้านอนุมูลอิสระ หรือที่เรียกกันว่าภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) ซึ่งจะก่อให้เกิดการกระตุ้นปฏิกิริยา lipid peroxidation ทำลายชั้นไขมันของเซลล์เมมเบรนต่างๆ เกิดเป็นผลิตภัณฑ์ชนิดหนึ่งที่มีชื่อว่า malondialdehyde หรือ MDA ซึ่งจัดเป็น marker ของภาวะเครียดออกซิเดชัน สิ่งเหล่านี้ก่อให้เกิดความเสียหายต่อเนื้อเยื่อ นอกจาก ROS แล้ว การหลั่งเอนไซม์ proteases จากแกรนูลของ neutrophils ที่มากเกินไปก็ส่งผลเสียต่อการทำลาย ECM บริเวณแผลซึ่งเพิ่มความเสียหายให้กับเนื้อเยื่อส่งผลให้เกิดการอักเสบต่อเนื่อง ทำให้กระบวนการหายของแผลเกิดช้าลง azurophilic granule เป็น primary granule ของ neutrophils ที่มีเอนไซม์ต่าง ๆ บรรจุอยู่ เช่น azurocidin, myeloperoxidase, defensins และ elastase เป็นต้น ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้ ทำหน้าที่ทำลายเซลล์แบคทีเรียในบริเวณแผล โดย myeloperoxidase หรือ MPO จัดเป็น marker ที่ใช้ในการตรวจวัดปริมาณของเซลล์ neutrophils ในบริเวณที่เกิดการอักเสบ (Wang, 2018; Aratani, 2018) ในส่วนของ azurocidin นอกจากจะหลั่งออกมาทำลายเซลล์แบคทีเรียแล้ว ยังมีผลในการชักนำให้เซลล์ monocyte เคลื่อนที่มายังบริเวณแผล โดย granule protein จะสะสมอยู่บริเวณ endothelial glycocalyx และกระตุ้นให้เกิดการแสดงออกของ cell adhesion molecules หรือ CAMs (vascular cell adhesion molecule 1; VCAM-1 กับ intercellular adhesion molecule 1; ICAM-1) ทำให้เกิดการจับกันกับ beta2-integrin ที่อยู่บนผิวของ monocyte และเกิดการยึดเกาะบน endothelial cell (Soehnlein and Lindbom, 2010) ซึ่ง monocyte จะเคลื่อนที่ออกนอกหลอดเลือดเข้าสู่บริเวณแผลหลังจากเวลาผ่านไป 24 ชม. และเกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ macrophage

Macrophage ทำหน้าที่ในการจับกินเชื้อโรคต่าง ๆ เนื่องจาก neutrophil มีอายุสั้น และจะเกิดการ apoptosis ซึ่งเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่สามารชักนำให้เซลล์ monocyte เคลื่อนที่เข้าสู่แผลมากขึ้น เซลล์ macrophage มีส่วนในการควบคุมปริมาณของ neutrophil บริเวณแผล โดยมีผลยับยั้งการแทรกซึมของ neutrophil จากหลอดเลือด และหลั่ง cytokine เพื่อกระตุ้นให้ neutrophil เกิดการ apoptosis ในระยะสุดท้ายเซลล์ macrophage จะกำจัดเศษซากของ neutrophil ที่เกิดจากการ apoptosis ซึ่งบริเวณผิวเซลล์ของ macrophage มี receptor หลาย

ชนิดที่สามารถรับรู้และตอบสนองต่อสภาพแวดล้อมจุลภาคที่เซลล์อาศัยอยู่ เช่น Toll-like receptors (TLRs) และ complement receptors (Eming *et al.*, 2007) โดย TLRs เป็นโปรตีนตัวรับจดจำรูปแบบ (pattern recognition receptors; PRRs) ที่สำคัญของระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิด (innate immune system) ในกระบวนการอักเสบ TLRs ที่สำคัญของเซลล์ macrophages คือ TLR2 และ TLR4 (Huang *et al.*, 2007) ซึ่งมีบทบาทสำคัญต่อการป้องกันการติดเชื้อ โดย TLR2 จะจดจำรูปแบบของ peptidoglycan และ lipopeptide บนผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวก ส่วน TLR4 จะจดจำรูปแบบของ lipopolysaccharide ซึ่งเป็นส่วนประกอบของ outer membranes ในแบคทีเรียแกรมลบ (Suga *et al.*, 2014) มีรายงานการศึกษาความสัมพันธ์ของ TLRs กับการอักเสบทั้งในกระบวนการหายของแผลปกติและแผลเบาหวาน ได้แก่ Dasu และ Jialal (2013) ศึกษาผลต่อการหายของแผลในหนูปกติเปรียบเทียบกับหนูเบาหวาน โดยการตรวจหาการแสดงออกของ mRNA และ protein ของ TLR4 โดยใช้วิธี real-time PCR และ Western blotting technique จากเนื้อเยื่อของแผลในวันที่ 10 พบว่าหนูเบาหวาน มีการแสดงออกของ TLR4 mRNA และ TLR4 protein เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับหนูปกติ และได้ศึกษาผลต่อการหายของแผลใน TLR4 knockout (KO) mice (TLR4<sup>-/-</sup>) ร่วมกับการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคเบาหวาน เปรียบเทียบกับหนูเบาหวานปกติ พบว่าหนูเบาหวานในกลุ่ม TLR4<sup>-/-</sup> มีการหายของแผลดีกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับหนูเบาหวานในกลุ่ม WT และพบว่าหนูที่ไม่เป็นโรคเบาหวาน การหายของแผลไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับหนูเบาหวานในกลุ่ม TLR4<sup>-/-</sup> นอกจากนี้ได้ตรวจหาปริมาณของ interleukin-6 (IL-6) และ TNF-alpha ซึ่งถือว่าเป็น biomediators ของ TLR4 signaling โดยใช้วิธี ELISA พบว่าในวันที่ 10 หลังการเกิดแผลหนูเบาหวานในกลุ่ม TLR4<sup>-/-</sup> มีความเข้มข้นของ IL-6 และ TNF-alpha ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับหนูเบาหวานกลุ่ม WT นอกจากนี้เซลล์ macrophage มีบทบาทต่อระบบภูมิคุ้มกัน และกำจัดสิ่งแปลกปลอมระหว่างกระบวนการหายของแผลแล้ว macrophage ยังมีบทบาทสำคัญต่อการสร้าง growth factor เช่น TGF-beta, TGF-alpha, FGF, PDGF และ VEGF ซึ่งมีส่วนในการส่งเสริมให้เกิดการแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนและการสังเคราะห์สารที่เป็นองค์ประกอบของ extracellular matrix (ECM) ในเซลล์ผิวหนัง (Eming *et al.*, 2007) โดยกระบวนการอักเสบจะหยุดลง ก็ต่อเมื่อบริเวณแผลปราศจากสิ่งแปลกปลอมใดๆ ซึ่งการหลั่ง growth factor หรือ cytokine จะทำหน้าที่เป็น anti-inflammation เพื่อหยุดกระบวนการอักเสบ และมีผลกระตุ้นกระบวนการซ่อมแซมเนื้อเยื่อต่อไป (Soehnlein *et al.*, 2014)



บทบาทของกระบวนการอักเสบที่เกี่ยวข้องกับการหายของแผล

กระบวนการหายของแผล เป็นกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับการซ่อมแซมเนื้อเยื่อหลังจากการได้รับบาดเจ็บหรือเกิดแผล (Velnar *et al.*, 2009) ซึ่งแบ่งออกเป็น 4 ระยะ ดังนี้

- ระยะที่ 1 เมื่อร่างกายได้รับบาดเจ็บ และเกิดการฉีกขาดของหลอดเลือด การห้ามเลือดจะเกิดขึ้นทันทีโดยการทำงานของ platelet ซึ่งเกิดการรวมตัวกับ fibrin กลายเป็นลิ่มเลือด (fibrin clot) (Reinke and Sorg, 2012) และ platelet จะหลั่งโปรตีนต่าง ๆ โดยเฉพาะ thrombin ซึ่งทำหน้าที่เป็นสารสื่อกลางตัวแรกที่หลั่งออกมา โดยมีความสำคัญต่อการชักนำเม็ดเลือดขาวเข้ามายังบริเวณแผล (Patel *et al.*, 2016)

- ระยะที่ 2 คือ ระยะการอักเสบ ซึ่งได้กล่าวถึงกลไกไว้ข้างต้นนั้น โดยมีการแทรกซึมของ neutrophil ซึ่งเป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดแรกที่แทรกซึมเข้าสู่บริเวณแผล ทำหน้าที่จับกินเชื้อโรคต่าง ๆ จากนั้นจะเกิด apoptosis ส่งผลต่อการชักนำให้เซลล์ monocyte เข้าสู่บริเวณแผลเป็นลำดับถัดไป นอกจากนี้ neutrophil ยังสามารถสร้างและหลั่ง pro-inflammatory cytokines ที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ monocyte ไปเป็นเซลล์ macrophage ในระยะ M1 ได้แก่ interleukin-1alpha (IL-1 alpha), IL-1beta, IL-6 และ tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) monocyte เมื่อออกนอกหลอดเลือดเข้าสู่เนื้อเยื่อบริเวณแผลและเปลี่ยนเป็นเซลล์ macrophage ในระยะ M1 แล้วจะทำหน้าที่จับกินเชื้อโรค หรือเนื้อตายต่าง ๆ บริเวณแผล รวมทั้งจับกินเซลล์ neutrophil ที่เกิดการ apoptosis และสร้าง TNF-alpha และ IL-1beta ได้อีกด้วย (Sindrilaru and Scharffetter-Kochanek, 2013)

การสร้าง TNF-alpha และ IL-1beta จากเซลล์ macrophage ถูกควบคุมโดยกลไกของ nuclear factor-kB (NF-kB) signaling pathway โดย NF-kB เป็น transcription factors ที่ประกอบ 5 monomers ได้แก่ RelA/p65, RelB, cRel, NF-kB1 p50 และ NF-kB2 p52 ซึ่งสามารถพบได้ทั่วไปในไซโตพลาสซึมของเซลล์ที่อยู่ในระยะพัก หรือ inactive โดยการจับอยู่กับ Inhibitor of kB (IkB) อยู่ในรูป p65/p50-IkB complex แต่เมื่อได้รับการกระตุ้นผ่านทาง pattern recognition receptors (PRRs receptor) และ cytokine receptors จะส่งผลให้เกิดกระบวนการ phosphorylation ทำให้เกิดการสลายของ IkB จากนั้นเมื่อ NF-kB อยู่อย่างอิสระ จะเคลื่อนที่เข้าสู่นิวเคลียสและกระตุ้นการแสดงออกของยีน TNF-alpha และ IL-1beta รวมทั้งกระตุ้นยีน inducible nitric oxide synthase (iNOS) และ cyclooxygenase-2 (COX-2) ให้มีการสร้าง nitric oxide (NO) และ prostaglandin E2 (PGE<sub>2</sub>) กระตุ้นให้เกิดการอักเสบ (Gasparini and Feldmann, 2012; Dorrington and Fraser, 2019) เมื่อบริเวณแผล ปราศจากสิ่งแปลกปลอม เซลล์ macrophage จะเปลี่ยนไปเป็นระยะ M2 โดยจะมีการหลั่ง TGF-beta และ IL-10 ซึ่งทำหน้าที่เป็น anti-inflammatory เพื่อหยุดกระบวนการอักเสบ การเปลี่ยนแปลงของ macrophage จากระยะ M1 ไปเป็นระยะ M2 เป็นตัวบ่งชี้ที่สำคัญของการสิ้นสุดระยะการอักเสบ ซึ่งปัจจัยที่มี

ผลต่อการเปลี่ยนแปลงจากเซลล์ macrophage M1 ไปเป็นเซลล์ macrophage M2 ได้แก่ การกระตุ้นของ IL-4 และ IL-13 ที่หลั่งมาจาก Helper T-cell2 (Th2) และการเกิด apoptosis ของ neutrophil (Hesketh *et al.*, 2017) นอกจากนี้พบว่าในสภาวะที่มีน้ำตาลในเลือดสูง (hyperglycemia) จะมีผลต่อการทำงานของเซลล์ macrophage กล่าวคือ ทำให้คุณสมบัติของ macrophage ในการกำจัดเซลล์ neutrophil ที่เกิดการ apoptotic ลดลง (Hesketh *et al.*, 2017) ซึ่งภาวะแผลเรื้อรังเนื่องจากโรคเบาหวานจะเกี่ยวข้องกับระยะเวลาการอักเสบที่ใช้เวลานาน ซึ่งขาดความสมดุลระหว่าง pro- และ anti-inflammatory cytokines โดย macrophage ในแผลเบาหวาน จะมีการสร้าง pro-inflammatory cytokines สูงกว่าเมื่อเทียบกับแผลปกติ (Weisberg *et al.*, 2003; Goren *et al.*, 2007) Khanna และคณะ (2010) ได้ศึกษาการทำงานของเซลล์ macrophage ในระยะการอักเสบของหนูเบาหวานที่เกิดแผล พบว่าแผลในหนูเบาหวานมีเซลล์ neutrophil ที่เกิดการ apoptotic เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับแผลในหนูปกติ และพบว่ามีระดับของ pro-inflammatory cytokines ได้แก่ TNF-alpha และ IL-6 เพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในวันที่ 1 และ 3 หลังการเกิดแผลเมื่อเปรียบเทียบกับหนูปกติ แต่ IL-10 ซึ่งเป็น anti-inflammatory cytokines ลดลงอย่างมีนัยสำคัญในวันที่ 7 หลังการเกิดแผลเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มหนูปกติ การตอบสนองต่อการอักเสบ ถือได้ว่าเป็นกระบวนการแรกที่เกี่ยวข้องกับการหายของแผล โดยการแทรกซึมของเซลล์เม็ดเลือดขาวเข้าสู่บริเวณที่ได้รับบาดเจ็บหรือเกิดบาดแผลเป็นตัวบ่งชี้ที่สำคัญของเซลล์ต่อการตอบสนองของการอักเสบเพื่อให้เกิดการซ่อมแซมเนื้อเยื่อบริเวณผิวหนังต่อไป โดยเซลล์เม็ดเลือดขาวไม่เพียงแต่ทำหน้าที่ในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อโรคต่างๆ บริเวณแผล แต่ยังมีผลต่อการสร้างและการสลายเนื้อเยื่ออีกด้วย (Patel *et al.*, 2016) ซึ่งการเพิ่มหรือลดการแทรกซึมของเซลล์เม็ดเลือดขาวไปยังบริเวณที่เนื้อเยื่อเกิดความเสียหายนั้น จะมีผลต่อการ migration, proliferation และ differentiation ของเซลล์ที่เกี่ยวข้องทำให้กระบวนการหายของแผลเกิดช้าลง จากการศึกษาของ Mori และคณะ (2004) ได้ศึกษาเปรียบเทียบระหว่างหนู mice ที่มีความบกพร่องของ beta-1,4-galactosyltransferase-I (beta4GalT-I) กับหนู mice สายพันธุ์ปกติต่อการหายของแผล พบว่าหนูที่มีความบกพร่องของ beta4GalT-I มีการหายของแผลช้าลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับหนูปกติ โดยมีผลต่อการลดลงของการสร้างเนื้อเยื่อใหม่ การสังเคราะห์ collagen และลดการสร้างหลอดเลือดใหม่อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับหนูปกติ นอกจากนี้ยังพบว่า มีการแทรกซึมของเซลล์เม็ดเลือดขาวไปยังบริเวณแผลลดลง ส่งผลต่อการยับยั้งระดับของ macrophage-derived chemokines, TGF-beta1 และ VEGF จากรายงานจะเห็นได้ว่า หากมีการแทรกซึมของเซลล์เม็ดเลือดขาวไปยังบริเวณบาดแผลลดลง จะมีผลต่อการสร้างเนื้อเยื่อและหลอดเลือดใหม่ลดลง ทำให้แผลหายช้ากว่าปกติ และจากการศึกษาของ Kitano และคณะ (2017) ได้ศึกษาเปรียบเทียบระหว่างหนูที่มีความบกพร่อง iNOS กับหนูสาย

พันธุ์ปกติต่อการหายของแผล พบว่าหนูที่มีความบกพร่องของ iNOS มีผลทำให้เกิดการแบ่งเซลล์และการสร้างเนื้อเยื่อใหม่ช้าลงใน excision wound model และพบว่ามี การยับยั้งการแทรกซึมของเซลล์ macrophage และลดการแสดงออกของ TGF-beta1 mRNA ซึ่งจากการศึกษาแสดงให้เห็นว่าหากมีการยับยั้งการแทรกซึมของเซลล์ macrophage จะมีผลทำให้การแบ่งเซลล์และการสร้างเนื้อเยื่อใหม่ที่ช้าลง เมื่อกระบวนการอักเสบสิ้นสุดลง จะเข้าสู่ระยะที่ 3

- ระยะที่ 3 คือ ระยะการแบ่งเซลล์ หรือ proliferation phase โดย TGF-beta ที่หลั่งออกมาจาก macrophage M2 ในช่วงหลังของระยะการอักเสบนั้น มีความสำคัญเป็นอย่างมากในกระบวนการหายของแผล โดยมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ fibroblast ไปเป็น myofibroblast ซึ่งกระตุ้นการสร้าง collagen ทำให้เกิดการหดตัวของแผล (Bielefeld *et al.*, 2013) กระตุ้นการแบ่งเซลล์และการเคลื่อนที่ของเซลล์ keratinocytes จากขอบแผลเข้าสู่ตรงกลางแผล นอกจากนี้ยังส่งเสริมการสังเคราะห์หลอดเลือดใหม่อีกด้วย (Sinno and Prakash, 2013) เมื่อการเคลื่อนที่เข้าหากันของเซลล์ keratinocytes จากขอบแผลบรรจบกัน ก็จะหยุดกระบวนการแบ่งเซลล์ และเข้าสู่ระยะที่ 4

-ระยะที่ 4 คือ ระยะการปรับรูปร่าง หรือ remodelling phase ซึ่งในระยะนี้เป็นระยะสุดท้ายของกระบวนการหายของแผล โดยใช้เวลานานที่สุด อาจจะเป็นสัปดาห์หรือเป็นเดือน ขึ้นอยู่กับขนาดของแผล ในระยะนี้จะต้องมีความสมดุลของการสร้างและสลาย ECM บริเวณแผล โดยอาศัยการทำงานของ T-cell ซึ่งจะถูกชักนำให้ออกจากหลอดเลือดเข้าสู่เนื้อเยื่อแผลโดย cytokine ที่สร้างจาก macrophage ซึ่งจะเข้ามาในช่วงท้ายของระยะการอักเสบ และมีผลต่อระยะ remodelling phase โดย T-cell ที่เข้าสู่บริเวณแผลจะเป็นชนิด Helper T-cell1 และ 2 (Th1 และ Th2) โดยผ่านการเหนี่ยวนำจากเซลล์ macrophage M2 และ M1 ตามลำดับ สารต่างๆ ที่หลั่งออกมาจาก macrophage M1 และ M2 นั้นมีความสำคัญต่อการควบคุมสมดุลของ ECM (Tredget *et al.*, 2006) โดย M1 จะหลั่ง metalloproteinases หรือ MMPs ทำหน้าที่ในการสลาย matrix protein ส่วน M2 ทำหน้าที่ในการสร้าง matrix protein และเพื่อการควบคุมไม่ให้เกิดการสลาย matrix protein มากเกินไป mesenchymal cell จะสร้าง tissue inhibitors of metalloproteinase หรือ TIMPs มายับยั้งการทำงานของ MMPs และในระยะหลังของ remodelling phase จะพบว่ามีจำนวนของเซลล์ macrophage ลดลง ส่งผลให้การสร้าง ECM ลดลง ซึ่งการเปลี่ยนแปลงเหล่านี้ เป็นตัวบ่งชี้ถึงการลดขนาดแผล และการหายของแผลที่สมบูรณ์ (Delavary *et al.*, 2011)

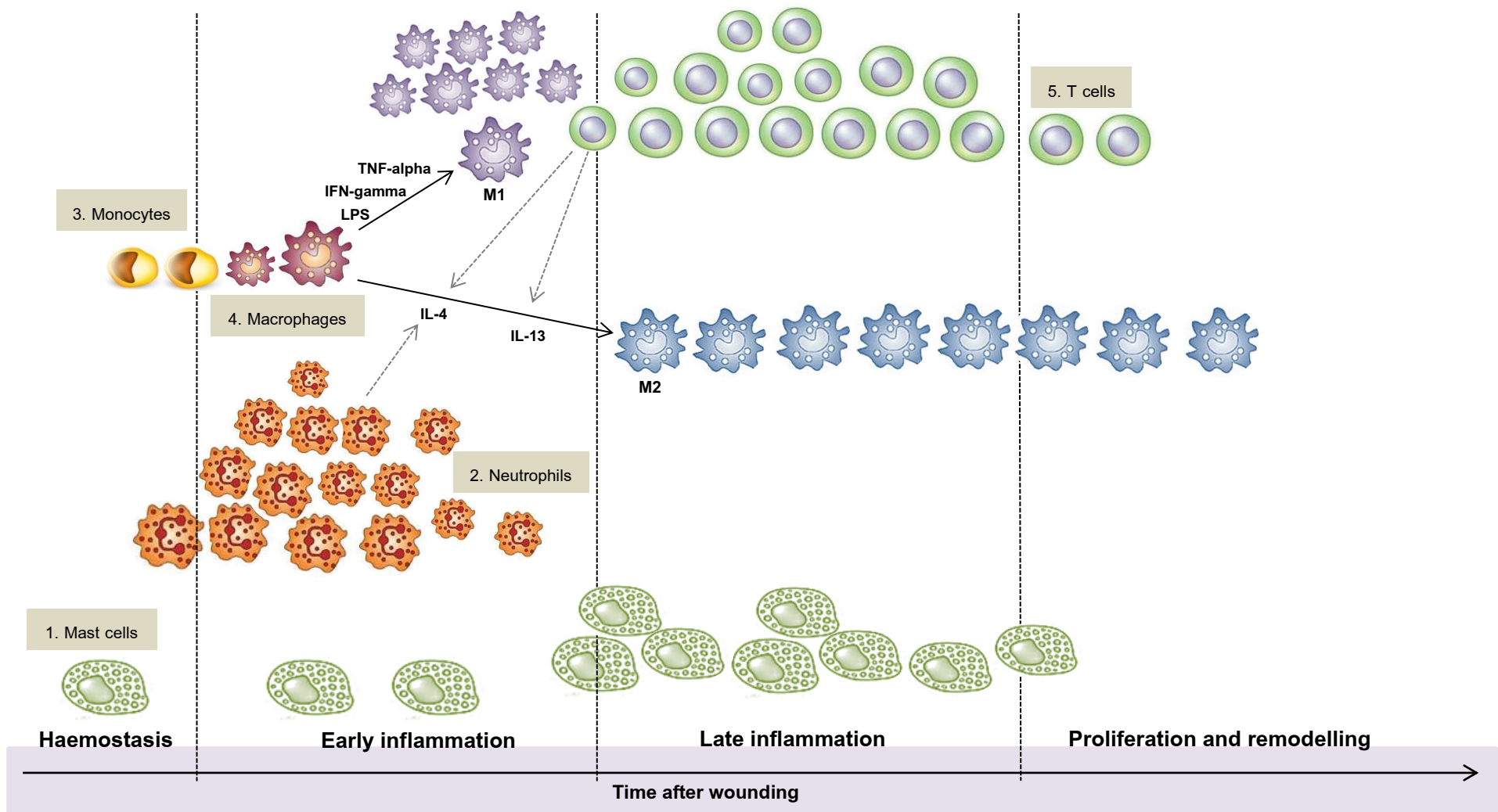
เซลล์อักเสบชนิดต่าง ๆ ที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับกระบวนการหายของแผล แสดงดังตารางที่ 1 โดยมีลำดับการเคลื่อนที่เข้าสู่บริเวณแผลดังรูปที่ 1 ซึ่งเซลล์ที่มีบทบาทสำคัญมากที่สุด คือ macrophage โดยจะเริ่มเข้ามามีบทบาทตั้งแต่ระยะการอักเสบ การดำเนินไปของกระบวนการอักเสบตามปกติ macrophage สามารถจับกินสิ่งแปลกปลอมบริเวณแผลได้หมด จะ

ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ macrophage จาก M1 เป็น M2 ซึ่งส่งผ่าน growth factor ได้แก่ TGF-beta ที่มีความสำคัญต่อระยะ proliferation กระบวนการหายของแผลจะเกิดขึ้นต่อเนื่องไปจนถึงระยะ remodeling จนกระทั่งแผลหายอย่างสมบูรณ์ แต่หากเกิดความผิดปกติในระยะการอักเสบ neutrophil และ macrophage หลั่ง cytokine มากขึ้น และ macrophage ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็น M2 จะส่งผลให้เกิดความบกพร่องในการสร้าง ECM และมีการสลาย ECM มากขึ้นจากการทำงานของเอนไซม์ MMPs จำนวนมาก ซึ่งหลังจาก M1 ลดการแบ่งเซลล์และการเคลื่อนที่ของ fibroblast และ keratinocyte กระบวนการหายของแผลไม่สามารถดำเนินการต่อเนื่องไปถึงระยะ proliferation และ remodeling ได้ จึงเกิดเป็นแผลเรื้อรัง

ตารางที่ 1 The inflammatory cells involved the wound healing process. (Koh and DiPietro, 2013)

Cell type	Mediators	Functions
Mast cell	Histamine, Chymase, tryptase	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Control vascular permeability</li> <li>- Control influx of PMN</li> <li>- Regulate tissue remodeling</li> </ul>
PMN	ROS, cationic peptides, eicosanoids, proteases  TNF-alpha, IL-1b, IL-6 VEGF, IL-8	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Phagocytosis of infectious agents</li> <li>- Macrophages activation through phagocytosis</li> <li>- Amplify inflammatory response</li> <li>- Stimulate repair response</li> </ul>
Macrophages	TNF-alpha, IL-1b, and IL-6 IL-10, TGF-beta1 PDGF, VEGF, bFGF, TGF-alpha, and TGF-beta	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Phagocytosis of PMN and fragments of tissue degradation</li> <li>- Amplify inflammatory response</li> <li>- Anti-inflammatory function</li> <li>- Stimulate repair response: angiogenesis</li> </ul>
T cell;	CD40 ligand; IL-2, TNF-alpha/ IL-4, -5,-10 Th1/Th2	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Regulate tissue remodeling</li> </ul>

bFGF, basic fibroblast growth factor; FGF, fibroblast growth factor; MC, mast cell; PDGF, platelet derived growth factor; PMN, polymorphonuclear leukocyte; ROS, reactive oxygen species; TGF, transforming growth factor; TNF, tumor necrosis factor; VEGF, vascular endothelial growth factor



รูปที่ 1 The pattern of white blood cells infiltration into the wound area.

## 2. กลไกที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการหายของแผล บทบาทของยีนและสารชีวโมเลกุลแต่ละชนิดที่เกี่ยวข้องกับการหายของแผล

หลังจากการได้รับบาดเจ็บหรือเกิดแผล จะเกิดการส่งสัญญาณต่าง ๆ จากสิ่งแวดล้อมรอบ ๆ เซลล์ (signaling molecules) เพื่อตอบสนองต่อการบาดเจ็บ ซึ่งจะถูกรับรู้โดยจับกับตัวรับ (receptor) ของเซลล์ และเกิดการส่งสัญญาณต่อไปภายในเซลล์ (intracellular reactions) ทำให้เกิดการตอบสนองของเซลล์ (cell behavior) เช่น การเกิด differentiation, migration, proliferation และ apoptosis ของเซลล์ชนิดต่าง ๆ เพื่อการสร้างเนื้อเยื่อใหม่ของผิวหนัง โดยในระหว่างกระบวนการหายของแผล จะมียีนและสารชีวโมเลกุลต่าง ๆ ที่สำคัญเข้ามาเกี่ยวข้องในระบบการส่งและรับรู้สัญญาณ (signaling pathway) ได้แก่ Wnt/beta-catenin signaling pathway, Notch pathway, Hedgehog pathway, Toll-like receptors (TLRs) signaling pathway และ growth factor/cytokine pathways (TGF-beta/Smads, VEGF, PDGF, TNF-alpha/NF-kB หรือ Interleukin)

กลไกที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการหายของแผล มีดังนี้

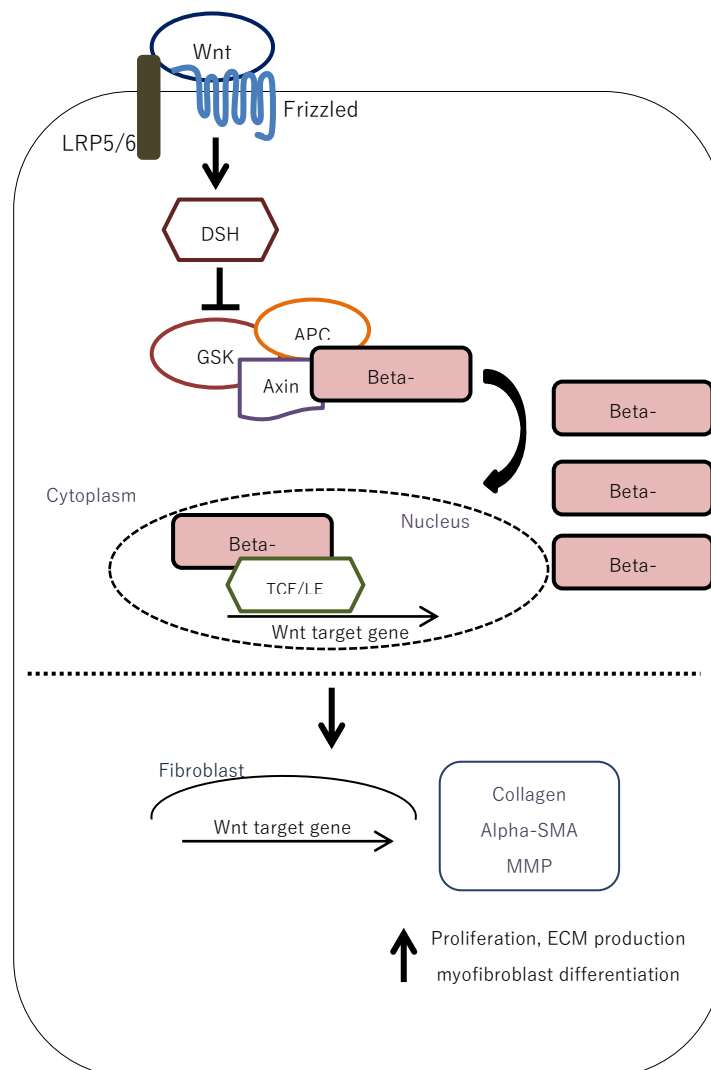
### 1. Wnt signaling pathway

Wnt คือ glycoproteins ที่มีความสำคัญต่อกระบวนการพื้นฐานของเซลล์ในระหว่างการพัฒนาและการรักษาสภาวะความสมดุลของเซลล์ให้คงที่ โดยเฉพาะเซลล์ผิวหนังซึ่งมีส่วนช่วยในการสร้างผิวหนังชั้นหนังแท้ (dermis) และการสร้างของเส้นขนต่างๆ Wnt signaling pathway แบ่งออกเป็น 3 แบบ คือ 1. beta-catenin pathway (canonical Wnt pathway) ซึ่งทำหน้าที่กระตุ้นยีนเป้าหมายภายในนิวเคลียส 2. planar cell polarity (PCP) pathway เกี่ยวข้องกับการจัดเรียงโครงสร้างใหม่ของเซลล์ และ 3. Wnt/calcium (Ca<sup>2+</sup>) pathway ซึ่งมีบทบาทสำคัญต่อการสร้างตัวอ่อน (embryogenesis) และการเกิดเนื้อเยื่อต่างๆ (De, 2011) จากการศึกษพบว่าในร่างกายมนุษย์มี Wnt protein ที่แตกต่างกัน 19 ชนิด และมีตัวรับ Frizzled (Fz) receptor 10 ชนิด โดย pathway ที่มีความเกี่ยวข้องกับการซ่อมแซมเนื้อเยื่อของผิวหนังคือ Wnt/beta-catenin signaling pathway (Archbold *et al.*, 2012; Houschyar *et al.*, 2015) beta-catenin คือ transcriptional co-activator ที่เกี่ยวข้องกับ transcription cofactors อื่นๆ เช่น T cell factors/lymphoid enhancer factors (TCF/LEF) ซึ่งทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของยีนในเซลล์แต่ละชนิด ในกรณีที่ไม่มี Wnt signaling beta-catenin จะถูกทำลายโดย Axin, adenomatosis polyposis coli (APC), glycogen synthase kinase 3 (GSK3), protein phosphatase 2A (PP2A) และ casein kinase 1alpha (CK1 alpha) ซึ่งไม่ก่อให้เกิดการถอดรหัสทางพันธุกรรมในนิวเคลียส ในทางตรงกันข้ามหากมี Wnt signaling จะเข้าจับกับ Fz receptor และ low-density lipoprotein receptor protein 5/6 (LRP 5/6) ส่งผลให้เกิดการกระตุ้น

Dishevelled (DSH) ซึ่งเป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ GSK3 ไม่ก่อให้เกิด APC/Axin/GSK3 complex ป้องกันไม่ให้ beta-catenin ถูกทำลาย ทำให้ beta-catenin มีความเสถียรภาพและเกิดการสะสมใน cytoplasm มากขึ้น หลังจากนั้น beta-catenin จะเคลื่อนที่เข้าไปในนิวเคลียส และมีผลต่อการถอดรหัสของยีน โดยการเข้าจับกับ TCF/LEF ซึ่งเป็น transcriptional co-activator กระตุ้นการแสดงออกของยีนเป้าหมายต่างๆ ได้แก่ Cyclin D1, MT1-MMP (membrane-type 1-matrix metalloproteinase), MMP-7 และ Dkk-1 (dickkopf) (รูปที่ 2) (Houschyar *et al.*, 2015) ซึ่งในกระบวนการหายของแผลจะมีเอนไซม์ที่สำคัญในกลุ่ม matrix metalloproteinase (MMPs) ซึ่งสร้างและหลั่งมาจากเซลล์ macrophage และ fibroblast โดยมีบทบาทสำคัญในการสังเคราะห์หลอดเลือดใหม่และในกระบวนการสลาย extracellular matrix protein beta-catenin จะมีปริมาณเพิ่มขึ้นใน mesenchymal cells ในระยะ proliferative phase ของกระบวนการหายของแผลซึ่งมีส่วนเกี่ยวข้องในการสร้างโครงสร้างของเยื่อบุผิวและการซ่อมแซมผิวหนังที่เกิดความเสียหาย (Bielefeld *et al.*, 2013) โดยมีบทบาทสำคัญต่อการควบคุมอัตราการแบ่งเซลล์ เพิ่มจำนวน การเคลื่อนที่ และการแพร่กระจายของเซลล์ fibroblast (Zhang *et al.*, 2009) นอกจากนี้แล้วยังพบการทำงานของ Wnt/beta-catenin signaling pathway ในระยะอื่นๆ ของกระบวนการหายของแผล ได้แก่ ระยะการห้ามเลือดและระยะการอักเสบ โดย Wnt signaling เป็นปัจจัยสำคัญต่อการพัฒนาของ megakaryocytes และกระตุ้นการทำหน้าที่ของ proplatelet (Macaulay *et al.*, 2013) นอกจากนี้พบว่า canonical Wnt ยังทำหน้าที่ในการยับยั้งการเกาะกลุ่มกันของเกล็ดเลือดอีกด้วย (Steele *et al.*, 2009) หลังจากผ่านระยะการห้ามเลือด เข้าสู่ระยะการอักเสบ ซึ่งจะพบอาการ ปวด บวม แดง และร้อน มีการขยายตัวและเพิ่มการซึมผ่านของหลอดเลือด และเกิดการชักนำเซลล์เม็ดเลือดขาว (neutrophil และ macrophage) เข้าสู่บริเวณที่ได้รับบาดเจ็บ ทำหน้าที่ในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมหรือเนื้อตายต่างๆ บริเวณแผล Wnt signaling จะเกี่ยวข้องกับการควบคุมกระบวนการอักเสบ โดยมี Wnt5a เป็นตัวเหนี่ยวนำเซลล์ macrophage ในการตอบสนองต่อเชื้อแบคทีเรีย และ Fz receptor มีผลต่อการควบคุม pro-inflammatory cytokines จะทำให้เกิดการตอบสนองต่อการอักเสบที่เพิ่มขึ้น (Staal *et al.*, 2008) หลังจากกระบวนการอักเสบ จะเข้าสู่ระยะ proliferation phase ในระยะนี้ fibroblasts, smooth muscle cells และ endothelial cells จะแทรกซึมเข้าสู่บริเวณแผล ซึ่ง beta-catenin มีความสำคัญต่อการควบคุมการทำงานของเซลล์ fibroblasts โดยระดับของ beta-catenin protein และการถอดรหัสของยีนจะเพิ่มสูงขึ้นในช่วงของระยะ proliferation phase และจะกลับเข้าสู่ระดับปกติในระยะ remodeling phase ของกระบวนการหายของแผล จากการศึกษาพบว่าแผลในคนจะพบการแสดงออกของ beta-catenin เพิ่มขึ้น และพบว่ามี การแสดงออกของ fibronectin และ MMP-7 ซึ่งเป็นยีนเป้าหมายของ beta-catenin เพิ่มขึ้นในระยะ proliferation phase (Cheon *et al.*, 2005) โดยการเพิ่มขึ้นของ beta-catenin



จะบ่งชี้ถึงกระบวนการหายของแผลที่ดี แต่หากมีการเพิ่มขึ้นในปริมาณที่มากหรือนานเกินไปจะก่อให้เกิด fibrosis และเกิดแผลเป็นที่มากเกินไปได้ จากการศึกษาพบว่า รอยแผลเป็น (hypertrophic scars) ในคนจะพบระดับของ beta-catenin สูง (Carothers *et al.*, 2012) นอกจากนี้ยังพบว่า beta-catenin ยังสามารถกระตุ้นการหลั่ง TGF-beta1 ในระยะเริ่มต้นของกระบวนการหายของแผลได้อีกด้วย สุดท้ายในระยะ remodeling phase หน้าที่ของ Wnt จะเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ fibroblasts ไปเป็น myofibroblasts ซึ่งมีความสำคัญต่อการหดตัวของแผล และการลดลงของการเกิดแผลเป็น (Sarrazy *et al.*, 2011) นอกจากนี้พบว่า Wnt มีความสำคัญในกระบวนการสร้างหลอดเลือดใหม่ และสามารถรักษาความบกพร่องของหลอดเลือดได้ (Birdsey *et al.*, 2015)



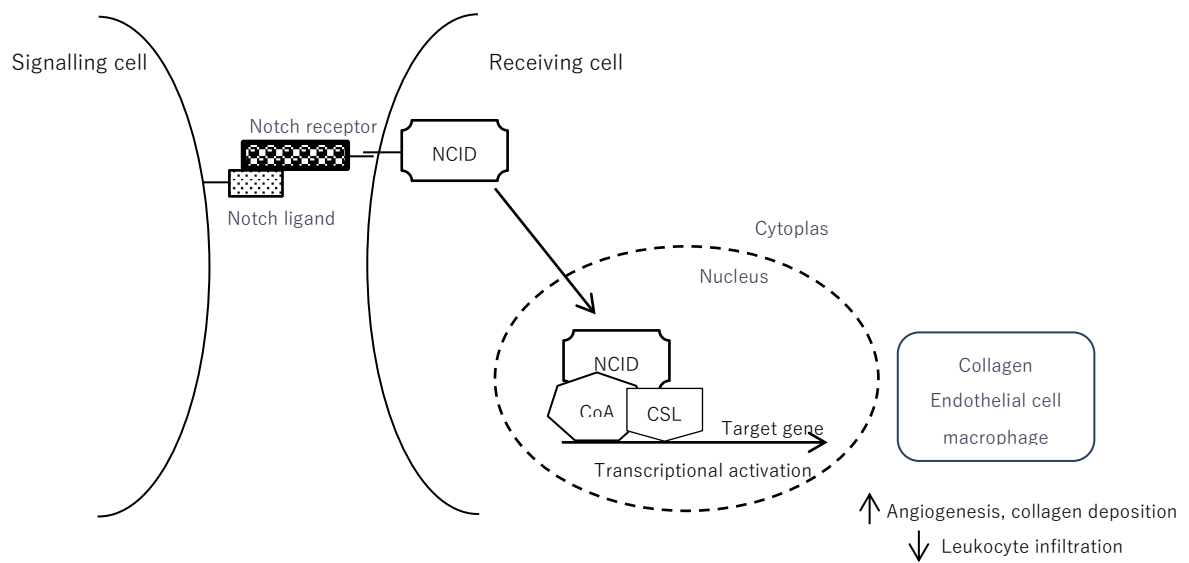
រូបភាព ២ The role of Wnt/beta catenin signaling pathway in wound healing process. (APC, adenomatous polyposis coli; DSH, dishevelled; GSK3, glycogen synthase kinase 3; LRP5/6, low-density lipoprotein receptor related protein 5/6; Tcf/Lef, Tcell-specific transcription factor/lymphoid enhancer-binding factor).

## 2. Notch signaling pathway

Notch signaling pathway คือ ระบบการรับส่งสัญญาณที่ควบคุมการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ผิวหนัง (epidermal differentiation) ทำหน้าที่ในการคงสภาพ รักษาความสมดุลของผิวหนัง (Okuyama *et al.*, 2008; Watt *et al.*, 2008) รวมทั้งมีผลควบคุมการสร้างหลอดเลือดใหม่และการรักษาสภาพของหลอดเลือด (Gridley, 2010) การทำงาน ของ Notch signaling จะเกิดปฏิกิริยากันระหว่าง transmembrane ligand และ transmembrane Notch receptor บนเซลล์ข้างเคียงซึ่งทำหน้าที่เป็นเซลล์ส่งสัญญาณและเซลล์รับสัญญาณ ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมจะประกอบด้วย Notch proteins 4 ชนิด (Notch1-4) และ Notch ligand 5 ชนิด คือ Delta-like 1, 3 และ 4 และ Jagged1-2 เมื่อเกิดการกระตุ้น Notch ligand จะเข้าจับกับ Notch receptor บริเวณผนังเซลล์มีผลทำให้เกิดปฏิกิริยา proteolytic กับ Notch receptor ซึ่งทำให้แยกออกจากผนังเซลล์ และมีผลทำให้ cell membrane หลัง Notch intracellular domain (NICD) จากนั้น NICD จะเคลื่อนที่เข้าสู่นิวเคลียส และรวมตัวกับ CSL และ co-activators เพื่อกระตุ้นการถอดรหัสทางพันธุกรรมและควบคุมการแสดงออกของยีนเป้าหมาย (รูปที่ 3) (Bielefeld *et al.*, 2013) มีหลายงานวิจัยได้การศึกษา Notch signaling pathway กับกระบวนการหายของแผล ได้แก่ Thelu และคณะ (2002) ได้ศึกษาการแสดงออกของยีน *Notch 1-3, Delta 1* และ *Jagged 1* โดยใช้วิธี RT-PCR ในโมเดลการหายของแผลในหนู mice พบว่า การแสดงออกของยีนเหล่านี้เพิ่มขึ้นในหนูกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นให้เกิด cell proliferation เมื่อเปรียบเทียบกับหนูปกติที่ไม่ได้รับการกระตุ้น Chigurupati และคณะ (2007) ได้ศึกษาการหายของแผลใน Notch antisense transgenic mice (Notch protein ลดลง 50% เมื่อเทียบกับหนูปกติ) เปรียบเทียบกับหนูปกติ (nontransgenic control mice; wild-type (WT)) พบว่าหนูในกลุ่ม WT มีขนาดของแผลลดลง 50% ในวันที่ 5 และแผลหายเป็นปกติในวันที่ 13 หลังทำให้เกิดแผล โดยการหายของแผลเร็วกว่าหนูในกลุ่ม Notch antisense transgenic mice ซึ่งมีขนาดของแผลลดลง 15% ในวันที่ 5 และแผลไม่สามารถหายเป็นปกติในวันที่ 13 และได้ศึกษาการหายของแผลในหนู WT ที่ได้รับการรักษาด้วยสารดังนี้ 1. กลุ่มที่ได้รับ g-secretase inhibitor (GSI) ซึ่งเป็นสารที่ยับยั้งการเกิด NICD และยับยั้งการทำงานของ Notch protein 2. กลุ่มที่ได้รับ Jagged-1 peptide ซึ่งเป็นสารที่กระตุ้นการทำงานของ Notch protein โดยทั้ง 2 กลุ่มเปรียบเทียบผลการทดลองกับหนูในกลุ่มควบคุม (vehicle-treated control animals) พบว่า หนูในกลุ่มที่ได้รับการรักษาด้วย GSI มีการหายของแผลช้ากว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่หนูกลุ่มที่ได้รับ Jagged-1 peptide มีการหายของแผลเร็วกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ผู้วิจัยได้ตรวจหาระดับของ NICD ใน endothelial cells, keratinocytes และ fibroblasts จากเนื้อเยื่อบริเวณแผล โดยใช้ mouse embryonic stem cells ซึ่งมีระดับการแสดงออกของ Notch activity สูงเป็นกลุ่ม positive control พบว่าหนูปกติที่ได้รับการรักษาด้วย Jagged-1 peptide มีการ

เพิ่มขึ้นของระดับ NCID ในเซลล์ทั้ง 3 ชนิด อย่างมีนัยสำคัญ และพบว่า ระดับของ NCID ในกลุ่ม Notch antisense transgenic mice ในวันที่ 13 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่ม nontransgenic controls และระดับของ NCID ในกลุ่มที่ได้รับการรักษาด้วย GSI ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม vehicle-treated control animals ภายใน 24 ชม. และมีระดับลดลงจนถึงวันที่ 13 จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าระดับของ NCID ใน Notch signaling pathway มีผลโดยตรงต่อกระบวนการหายของแผล Outtz และคณะ (2010) ได้ศึกษาบทบาทที่สำคัญของ Notch signaling pathway ในการควบคุมการตอบสนองของเซลล์ macrophage ต่อการอักเสบในกระบวนการหายแผล โดยใช้หนูที่มีความบกพร่องของ Notch1 (*Notch1<sup>+/-</sup>* mice) เปรียบเทียบกับหนูกลุ่ม WT พบว่าหนูในกลุ่ม *Notch1<sup>+/-</sup>* มีการแทรกซึมของเซลล์ macrophage ไปยังบริเวณแผลลดลง มากกว่า 30% เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม WT เนื่องจากเซลล์ macrophage เป็นแหล่งสำคัญของ TNF-alpha ซึ่งเป็น pro-inflammatory cytokine ในระยะการอักเสบของกระบวนการหายของแผล การศึกษาในครั้งนี้จึงได้ตรวจสอบการแสดงออกของ TNF-alpha ในบริเวณแผลของหนูกลุ่มในกลุ่ม *Notch1<sup>+/-</sup>* เปรียบเทียบกับกลุ่ม WT พบว่า ในวันที่ 5 หลังการเกิดแผล หนูกลุ่ม *Notch1<sup>+/-</sup>* มีปริมาณของ TNF-alpha ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม WT หลังจากนั้นในวันที่ 7 หลังการเกิดแผล มีการศึกษาการสะสมของ collagen โดยใช้วิธี trichrome staining พบว่าในกลุ่ม *Notch1<sup>+/-</sup>* มีการสะสมของ collagen หนาแน่นกว่ากลุ่ม WT นอกจากนี้ได้ศึกษาการแสดงออกของ VEGF receptor-1 (VEGFR-1), IL-6 และ IL-12 ที่สร้างจาก macrophage ของหนูกลุ่ม *Notch1<sup>+/-</sup>* เปรียบเทียบกับกลุ่ม wild-type พบว่า กลุ่ม *Notch1<sup>+/-</sup>* มี VEGFR-1, IL-6 และ IL-12 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม WT จากผลการทดลองเหล่านี้จะเห็นได้ว่า Notch1 มีผลในการควบคุมการแสดงออกของ VEGFR-1 และ cytokines (IL-6, IL-12 และ TNF-alpha) ที่สร้างจากเซลล์ macrophage ซึ่งมีความสำคัญต่อระยะการอักเสบในกระบวนการหายของแผล Caiado และคณะ (2008) ได้ศึกษาความสัมพันธ์ของ Notch signaling pathway กับ Bone marrow derived vascular precursor cells (BM-PC, endothelial progenitors) ซึ่งเป็นเซลล์ต้นกำเนิดของหลอดเลือดในกระบวนการหายของแผล การศึกษาใช้หนูสายพันธุ์ Balb-SCID mice โดยแบ่งเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มแรกได้รับการฉีดด้วย phosphate buffered saline (PBS) ใช้เป็นกลุ่มควบคุม กลุ่มที่สองได้รับการฉีด BM-PC และกลุ่มที่สามได้รับการฉีด BM-PC ร่วมกับ GSI พบว่าในกลุ่มที่ได้รับการฉีด BM-PC มีการหายของแผลเร็วกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ แต่ในกลุ่มที่ได้รับการฉีด BM-PC ร่วมกับ GSI มีการหายของแผลไม่แตกต่างกับกลุ่มควบคุม (PBS) ซึ่งคุณสมบัติของ BM-PC ในการรักษาแผล จะเกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อการสร้างหลอดเลือดใหม่บริเวณแผล ผู้วิจัยได้ตรวจสอบการสร้างหลอดเลือดใหม่บริเวณแผล พบว่าในกลุ่มที่ได้รับการฉีด BM-PC มีความหนาแน่นของหลอดเลือดฝอย

ในวันที่ 7 และ 14 หลังการเกิดแผล สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม แต่กลุ่มที่ได้รับการฉีด BM-PC ร่วมกับ GSI มีความหนาแน่นของหลอดเลือดไม่แตกต่างกับกลุ่มควบคุม จากผลการศึกษาจะเห็นได้ว่า การยับยั้ง Notch signaling pathway ด้วย GSI จะส่งผลต่อความบกพร่องในการทำงานของ BM-PC ที่มีผลในการส่งเสริมกระบวนการหายของแผล และการสร้างหลอดเลือดใหม่ในสัตว์ทดลอง



รูปที่ 3 The role of Notch signaling pathway in wound healing process. NICD, Notch intracellular domain; CoA, coactivators; CSL (CBF1, Suppressor of Hairless, Lag-1)

### 3. Hedgehog signaling pathway

Hedgehog signaling pathway คือ ระบบการรับส่งสัญญาณที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของผิวหนังและการสร้างหลอดเลือดใหม่ (Athar *et al.*, 2006) Hedgehog proteins ที่พบในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมมี 3 ชนิดหลักๆ คือ Sonic Hedgehog (Shh), Desert Hedgehog (Dhh) และ Indian Hedgehog (Ihh) แต่ชนิดที่มีความสำคัญต่อกระบวนการหายของแผล คือ Shh โดย Shh signaling จะเข้าจับกับ Patched (transmembrane protein) และมีผลยับยั้งการทำงานของ Smoothed ส่งผลต่อการกระตุ้น Gli protein ให้เคลื่อนที่เข้าสู่นิวเคลียส ซึ่งทำหน้าที่เป็น transcription และควบคุมการแสดงออกของยีนเป้าหมาย (Le *et al.*, 2008; Bielefeld *et al.*, 2013) มีรายงานการศึกษาก่อนหน้านี้ได้ศึกษาความสัมพันธ์ของ Shh signaling ที่มีผลต่อกระบวนการหายของแผล พบว่า Shh signaling มีส่วนช่วยในการซ่อมแซมบาดแผล และการสร้างหลอดเลือดใหม่บริเวณแผล (Asai *et al.*, 2006; Le *et al.*, 2008) นอกจากนี้ยังพบว่ามี Shh มีผลต่อการสร้าง hair follicle หลังการเกิดกระบวนการหายของแผล (Ito *et al.*, 2007) Asai และคณะ (2006) ได้ศึกษา Shh signaling ต่อการหายของแผลในหนูเบาหวาน (db/db mice) โดยการเปรียบเทียบกันสามกลุ่ม ได้แก่ กลุ่มควบคุมได้รับ LacZ ซึ่งเป็นตัวยับยั้งการทำงานของ Shh signaling กลุ่มที่ได้รับการรักษาแผลด้วย phShh (human Shh plasmid) และกลุ่มที่ได้รับการรักษาแผลด้วย phShh ร่วมกับการยับยั้งการทำงานของ VEGF พบว่า กลุ่มที่ได้รับ phShh มีการสร้างเนื้อเยื่อใหม่มากกว่าครึ่งหนึ่งของพื้นที่แผล ซึ่งขนาดของแผลในวันที่ 5 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และในวันที่ 14 กลุ่มที่ได้รับ phShh มีเปอร์เซ็นต์การปิดของขอบแผล ( $65.3 \pm 7.6\%$ ) สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ( $25.0 \pm 2.0\%$ ) ในส่วนของกลุ่มที่ได้รับ phShh ร่วมกับการยับยั้งการทำงานของ VEGF พบว่ามีผลยับยั้งกระบวนการหายของแผล โดยมีเปอร์เซ็นต์การปิดของขอบแผล ( $43.7 \pm 4.1\%$ ) ซึ่งต่ำกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ phShh อย่างเดียว ( $65.3 \pm 7.6\%$ ) นอกจากนี้ได้ตรวจหาการสร้างหลอดเลือดใหม่บริเวณแผลโดยใช้ fluorescent BS1 lectin ในวันที่ 14 หลังการเกิดแผล พบว่ากลุ่มที่ได้รับ phShh มีการสร้างหลอดเลือดใหม่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยพบว่าการแตกแขนงของหลอดเลือดไปยังบริเวณกึ่งกลางของแผลมากที่สุด จากนั้นมีการนำเนื้อเยื่อบริเวณแผลในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับ phShh มาวิเคราะห์หา Ptc1 (Patched1), Smoothed (Smo) และ VEGF โดยใช้วิธี Immunofluorescence staining พบว่า กลุ่มที่ได้รับ phShh มีจำนวน Ptc1-positive cells สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกลุ่มควบคุม แต่จำนวนของ Smo-positive cells ไม่แตกต่างกันในทั้งสองกลุ่ม โดยพบว่าทั้ง Ptc1- และ Smo-positive cells มีผลต่อการสร้าง VEGF หลังจากที่ถูกกระตุ้นด้วย Shh signaling จากรายงานของ Le และคณะ (2008) ได้ศึกษาการหายของแผลในหนูทดลอง โดยการให้สาร cyclopamine (Cy) กับหนู

ทดลองทุกวันเป็นระยะเวลา 30 วัน หลังการเกิดแผล ซึ่งเป็นสารที่ทำหน้าที่ยับยั้งการทำงานของ Shh signaling pathway เปรียบเทียบกับหนูในกลุ่มควบคุม พบว่ากลุ่มที่ได้รับ Cy มีระยะเวลาในการปิดของแผลนานกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยพบว่าในวันที่ 11 หลังการเกิดแผล กลุ่มที่ได้รับ Cy มีเปอร์เซ็นต์การหายของแผล 67% ซึ่งต่ำกว่ากลุ่มควบคุม (มากกว่า 95%) โดยมีค่าเฉลี่ยของระยะเวลาต่อการปิดของแผลในกลุ่มที่ได้รับ Cy เท่ากับ  $18 \pm 0.72$  วัน ซึ่งนานกว่ากลุ่มควบคุม ( $14 \pm 0.81$  วัน) จากนั้นได้ศึกษาการสร้างเยื่อบุผิวใหม่และการสะสมของเนื้อเยื่อ granulation บริเวณแผล พบว่ากลุ่มที่ได้รับ Cy มีการสร้างเยื่อบุผิวใหม่และการสะสมของเนื้อเยื่อ granulation ช้ากว่ากลุ่มควบคุมในทุกช่วงเวลา และการสร้างหลอดเลือดใหม่ตรวจสอบโดยใช้วิธี CD31 immunohistochemistry พบว่าในกลุ่มที่ได้รับ Cy มีการสร้างหลอดเลือดใหม่น้อยกว่ากลุ่มควบคุม ประมาณ 50% รวมทั้งมีการเกิด cell proliferation ลดลงด้วย จากผลการศึกษาดังกล่าวข้างต้น จะเห็นได้ว่า Shh signaling pathway มีความสำคัญต่อกระบวนการหายของแผล ซึ่งทำให้เพิ่มการสร้างเนื้อเยื่อใหม่ และเพิ่มการสร้างหลอดเลือดใหม่โดยมีผลกระตุ้นการหลั่ง VEGF เพิ่มมากขึ้น และหากมีการยับยั้ง Shh signaling pathway ก็ส่งผลให้แผลหายช้า รวมทั้งลดการสร้างเนื้อเยื่อใหม่และลดการสร้างหลอดเลือดใหม่อีกด้วย

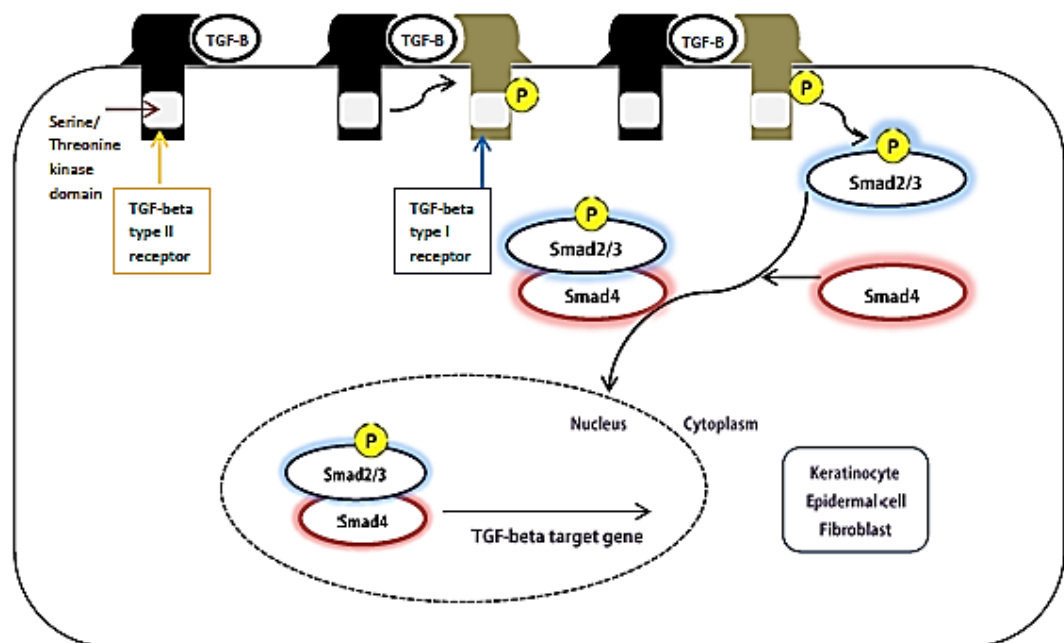
#### 4. Transforming growth factor-beta (TGF-beta)/Smad signaling pathway

TGF-beta เป็น growth factor ที่มีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการหายของแผล ในการควบคุมการตอบสนองของเซลล์หลายชนิด ทั้งในระยะการอักเสบ ระยะการแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวน และระยะการปรับรูปร่าง โดยในระยะการอักเสบ TGF-beta จะทำหน้าที่เป็น chemoattractant หรือตัวดึงดูดเซลล์เม็ดเลือดขาว เช่น neutrophils หรือ macrophage เข้าสู่บริเวณที่เกิดแผลเพื่อกำจัดเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอมต่างๆ ควบคุมการทำหน้าที่ของเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน และมีผลต่อการรักษาการอักเสบ ในระยะการแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวน TGF-beta ทำหน้าที่ส่งเสริมการสร้างเนื้อเยื่อบุผิว การสร้างหลอดเลือดใหม่ การแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนของ fibroblast มีผลทำให้เซลล์ fibroblast เปลี่ยนแปลงไปเป็น myofibroblasts และการสะสมของ ECM นำไปสู่การสร้าง granulation tissue และเกิดการหดตัวของขอบแผล ในระยะสุดท้ายของกระบวนการหายของแผล ระยะการปรับรูปร่าง TGF-beta มีผลต่อการควบคุมกระบวนการสร้างและสลาย collagen บริเวณแผล (Finsson *et al.*, 2013) TGF-beta ที่พบในกระบวนการหายของแผล ประกอบด้วย 3 isoforms คือ TGF-beta1, TGF-beta2 และ TGF-beta3 ซึ่งหลังจากผิวหนังเกิดการบาดเจ็บ platelet จะสร้างและหลั่ง TGF-beta1 ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวดึงดูดเซลล์เม็ดเลือดขาว เช่น neutrophils และ monocyte เข้าสู่บริเวณที่เกิดแผล หลังจาก TGF-beta1 ถูกปล่อยออกมาซึ่งไปมีผลกับเซลล์เป้าหมาย โดยผ่านการจับกับตัวรับที่มีความจำเพาะซึ่งอยู่บน

ผิวเซลล์ (serine/threonine kinase receptors) โดยแบ่งออกเป็น 3 ประเภท คือ TGF-beta type I receptor (TGF-betaRI) หรือเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า activin-like kinase (ALK), type II receptor (TGF-betaRII) และ type III receptor (TGF-betaRIII) โดยเริ่มต้นเมื่อเกิดการกระตุ้นการส่งสัญญาณของ TGF-beta ligand จะเข้าจับกับ dimer ของ TGF-betaRI และ TGF-betaRII นำไปสู่การกระตุ้นสารสื่อกลางชนิด cytoplasmic proteins ที่มีชื่อว่า Smads (small mothers against decapentaplegic) (รูปที่ 4) ซึ่งในสัตว์มีกระดูกสันหลังจะพบ Smads ทั้งหมด 8 ชนิด (Smads1-8) โดยแบ่งออกเป็น 3 ประเภทตามโครงสร้างและหน้าที่ คือ ประเภทที่ 1 เรียกว่า receptor-regulated Smads หรือ R-Smads (Smads 1-3,5,8) มีผลกระตุ้นการทำงานของ TGF-betaRI ซึ่งโดยส่วนใหญ่การกระตุ้นเป็นผลมาจาก Smad2 และ Smad3 ประเภทที่ 2 เรียกว่า common Smad หรือ Co-Smad ได้แก่ Smad4 และประเภทที่ 3 เรียกว่า inhibitory Smads หรือ I-Smads ได้แก่ Smad6 และ Smad7 (Singh *et al.*, 2011) โดยเมื่อ TGF-beta ligand จะเข้าจับกับ TGF-betaRI และ TGF-betaRII แล้ว จะกระตุ้นให้เกิด Smad2/3 complex โดยมี Smad4 เป็นตัวส่งเสริมการเคลื่อนที่ของ Smad2/3 ไปยังภายในนิวเคลียสซึ่งทำหน้าที่กระตุ้นการถอดรหัสทางพันธุกรรมเพื่อควบคุมการแสดงออกของยีนต่างๆ ส่วน Smad7 จะทำหน้าที่ควบคุมปฏิกิริยาแบบย้อนกลับ โดยยับยั้งการจับกันระหว่าง TGF-beta ligand กับ TGF-betaRI และยับยั้งการทำงานของ Smad2/3 จากการศึกษาของ Brown และคณะ (1995) ได้ศึกษาการหายของแผลในหนู TGF-beta1 deficient mouse พบว่าในวันที่ 10 หลังการเกิดแผล หนูในกลุ่ม TGF-beta1 deficient mouse มีเปอร์เซ็นต์การปิดของแผลเท่ากับ  $54.4 \pm 10.1\%$  ซึ่งน้อยกว่ากลุ่มควบคุม ( $70.7 \pm 5.4\%$ ) จากนั้นมีการตรวจวิเคราะห์ทางเนื้อเยื่อวิทยา พบว่าในกลุ่ม TGF-beta1 deficient mouse มี granulation tissue บางและมีปริมาณหลอดเลือดน้อย และยังพบเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบทั่วบริเวณเนื้อเยื่อ แต่ในกลุ่มควบคุมซึ่งเป็นหนูปกติ มี granulation tissue ที่สมบูรณ์ มีหลอดเลือดหนาแน่นและพบเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบเพียงเล็กน้อย จากนั้นตรวจวิเคราะห์การสะสมของ collagen โดยใช้วิธี Trichrome-stained histologic sections พบว่าในกลุ่ม TGF-beta1 deficient mouse มีการสะสมของ collagen ในวันที่ 10 หลังการเกิดแผล ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม Martinez-Ferrer และคณะ (2010) ได้รายงานการศึกษาบทบาทของ TGF-beta signaling ในเซลล์ fibroblasts โดยใช้ fibroblastic TGF-beta type II receptor knockout ( $Tgfb2^{\text{dermalKO}}$ ) mouse model ต่อการหายของแผลเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มปกติ พบว่ากลุ่ม  $Tgfb2^{\text{dermalKO}}$  มีการหดตัวของแผลและการสร้าง granulation tissue น้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และพบว่าเปอร์เซ็นต์ re-epithelization ในกลุ่ม  $Tgfb2^{\text{dermalKO}}$  ( $58.0 \pm 2.9\%$ ) สูงกว่ากลุ่มควบคุม ( $22.5 \pm 2.5\%$ ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และจากการวิเคราะห์การแทรกซึมของเซลล์เม็ดเลือดขาวไปยังบริเวณแผล พบว่าในกลุ่ม  $Tgfb2^{\text{dermalKO}}$  มีจำนวนของเซลล์ macrophages ( $7.3 \pm 0.6$ )



ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ( $21.5 \pm 0.5$ ) จากผลการศึกษานี้จะเห็นได้ว่ากลไกการทำงานของ TGF-beta signaling มีผลต่อ macrophage recruitment, re-epithelization และ wound contraction จากการศึกษาของ Ashcroft และคณะ (1999) พบว่าการทดสอบผลต่อการหายของแผลในหนู *Smad3* knockout mice มีจำนวนเซลล์ fibroblasts น้อย มีการสะสมของ ECM ลดลง และลดการแทรกซึมของเซลล์เม็ดเลือดขาวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม Owens และคณะ (2010) ได้ศึกษาบทบาทของ *Smad4* ต่อกระบวนการหายของแผลโดยใช้โมเดล *Smad4*-knockout mice เปรียบเทียบกับหนูปกติ พบว่าหนูกลุ่ม *Smad4*-knockout mice มีการหายของแผลแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับกลุ่มควบคุม โดยในวันที่ 3 หลังการเกิดแผล หนูในกลุ่มควบคุมมีการหายของ 53% แต่กลุ่ม *Smad4*-knockout mice มีการหายของแผลเพียง 29% จากผลการศึกษาข้างต้นจะเห็นได้ว่าผลจากการยับยั้งการทำงานของ *Smad* จะส่งผลให้กระบวนการหายของแผลช้ากว่าปกติ



รูปที่ 4 The role of Transforming growth factor-beta (TGF-beta)/Smad signaling pathway in wound healing process.

นอกจากนี้แล้ว ยังพบว่ายังมี growth factors อื่นๆ ที่มีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการหายของแผล เช่น

#### 1. Platelet-derived growth factors family (PDGFs)

PDGFs ประกอบด้วย 5 ชนิด คือ PDGF-AA, PDGF-BB, PDGF-CC และ PDGF-DD (homodimers) และ PDGF-AB (heterodimer) ซึ่งจะเข้าจับกับ transmembrane tyrosine kinase receptors (alpha- และ beta-chain) ในคนจะพบเฉพาะ PDGF-AB ซึ่งอยู่ในเกล็ดเลือด และจะถูกปล่อยออกมาหลังจากร่างกายได้รับบาดเจ็บ โดยพบที่บริเวณแผลในระยะแยกของกระบวนการหายของแผลเท่านั้น และเป็น growth factor ตัวแรกทำหน้าที่ดึงดูดเซลล์ (neutrophils, monocytes และ fibroblasts) ให้เคลื่อนที่เข้าสู่บริเวณแผล นอกจากนี้ยังสามารถเพิ่มการแบ่งเซลล์ของ fibroblasts และเพิ่มการแสดงออกของ myofibroblast การลดการแสดงออกของยีน PDGF และ receptor ที่มีความจำเพาะกับ PDGF จะส่งผลให้เกิดความบกพร่องในกระบวนการหาย (Werner and Grose, 2003; Muller *et al.*, 2012)

#### 2. Fibroblast growth factors family (FGFs)

FGFs พบในคนทั้งหมด 22 ชนิด โดยมี 3 ชนิดหลัก ที่มีความสำคัญต่อกระบวนการหายของแผล ได้แก่ FGF-2, FGF-7 (keratinocyte growth factor; KGF) และ FGF-10 โดยทั้งหมดสร้างมาจากเซลล์ keratinocytes, fibroblasts, endothelial cells, smooth muscle cells และ mast cells ซึ่ง FGFs จะเข้าจับกับ transmembrane tyrosine kinase receptors ซึ่งมี 4 ชนิด ได้แก่ FGF receptors 1-4 (FGFR 1-4) เมื่อจับกับ receptor จะทำหน้าที่ในการควบคุมการแบ่งเซลล์ การเปลี่ยนแปลงของเซลล์ การเคลื่อนที่ของเซลล์ และการมีชีวิตรอดของเซลล์ หลายชนิด (Werner and Grose, 2003; Grose and Werner, 2004) จากการศึกษาของ Werner และคณะ (1992) พบว่าระดับของ FGF-7 mRNA หลังจากเกิดแผล 24 ชม. เพิ่มขึ้นในเนื้อเยื่อที่มีแผลประมาณ 160 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อปกติ และมีรายงานก่อนหน้านี้ ได้ศึกษาระดับ ของ FGF-7 mRNA ในหนูเบาหวาน (db/db mice) ที่ทำให้เกิดแผลโดยใช้วิธี RNase protection assay พบว่าระดับของ FGF-7 mRNA ในหนูเบาหวานที่ไม่มีแผลใกล้เคียงกับในหนูปกติ แต่ในหนูเบาหวานที่เกิดแผลมีระดับของ FGF-7 mRNA ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับหนูปกติ และพบว่าระดับของ FGF-7 mRNA สูงสุดในวันที่ 3 และ 5 หลังการเกิดแผล โดยที่ในหนูปกติมีระดับของ FGF-7 mRNA สูงสุดในเวลา 24 ชม. หลังการเกิดแผล ซึ่งการลดลงของ FGF-7 จะส่งผลให้เกิดการแบ่งเซลล์ keratinocyte ช้าลงและทำให้แผลหายช้า (Werner *et al.*, 1994) Meyer และคณะ (2012) ได้ศึกษาผลต่อการหายของแผลในหนู FGFR-1/2 knockout mice ซึ่งมีความบกพร่องของ FGFR-1 และ FGFR-2 พบว่าเปอร์เซ็นต์การปิดของแผลในวันที่ 3 และ 5 ของหนูกลุ่ม FGFR-1/2 knockout mice มีเปอร์เซ็นต์การปิดของแผล

น้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับหนูปกติ นอกจากนี้ในวันที่ 5 หลังการเกิดแผล ได้เก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อบริเวณแผล เพื่อศึกษาการแบ่งเซลล์และการเคลื่อนที่ของเซลล์ keratinocyte พบว่าหนูกลุ่ม FGFR-1/2 knockout mice มีการแบ่งเซลล์และการเคลื่อนที่ของเซลล์ keratinocyte ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งจากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า ความบกพร่องของ FGFR-1 และ FGFR-2 ส่งผลให้เกิดการหายของแผลช้าลง เนื่องจากมีความบกพร่องของการแบ่งเซลล์และการเคลื่อนที่ของเซลล์ keratinocyte ที่มีความสำคัญต่อการเกิด re-epithelialization

### 3. Vascular endothelial growth factor family (VEGFs)

VEGFs พบในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมทั้งหมด 5 ชนิด ได้แก่ VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D และ placenta growth factor (PLGF) โดยจะเข้าจับกับ transmembrane tyrosine kinase receptors ซึ่งมี 3 ชนิด ได้แก่ VEGFR 1-3 (Saharinen *et al.*, 2011) VEGF-A มีความสำคัญต่อกระบวนการหายของแผล ซึ่งทำหน้าที่ในการส่งเสริมกระบวนการสร้างหลอดเลือดใหม่ การเคลื่อนที่และการแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนของ endothelial cell โดย VEGF-A สร้างมาจาก keratinocytes, fibroblast smooth muscle cells, platelet, neutrophil และ macrophage โดย VEGF-A จะเข้าจับกับ VEGFR-1 และ VEGFR-2 ที่อยู่บน endothelial cell ของผนังหลอดเลือด (Barrientos *et al.*, 2008) Okizaki และคณะ (2014) ได้ศึกษาผลต่อการหายของแผลและการสร้างหลอดเลือดใหม่ในหนูเบาหวานที่มีความบกพร่องของ VEGFR-1 (VEGFR1-tyrosine kinase knockout mice) เปรียบเทียบกับหนูปกติ พบว่าหนูกลุ่ม VEGFR1-tyrosine kinase knockout mice มีการหายของแผลและการสร้างหลอดเลือดใหม่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และจากการศึกษาก่อนหน้านี้ ได้ศึกษาผลต่อการหายของแผลในหนูเบาหวาน (db/db mice) โดยการรักษาแบบเฉพาะที่ด้วยการทา VEGF protein เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งได้รับการรักษาด้วย phosphate-buffered saline (PBS) ปริมาณ 20 µg ต่อแผล พบว่าแผลที่ได้รับการรักษาด้วยการทา VEGF protein มีการหายของแผลเร็วกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา พบว่าแผลที่ได้รับการรักษาด้วยการทา VEGF protein มีการสร้างและสะสมของ granulation tissue มากกว่าอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมในทุกช่วงเวลา และพบว่าในวันที่ 3 และ 7 หลังการเกิดแผล หนูกลุ่มที่ได้รับการรักษาด้วย VEGF protein มีการสังเคราะห์หลอดเลือดใหม่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (Galiano *et al.*, 2004)

นอกจากนี้การยับยั้งการทำงานของโมเลกุลที่เกี่ยวข้องในกระบวนการหายใจของผลบางชนิด จะส่งผลให้การหายใจของผลเกิดเร็วขึ้นหรือช้าลง ขึ้นอยู่กับการทำงานของโมเลกุลนั้น ๆ ดังตัวอย่างที่แสดงใน ตารางที่ 2

ตารางที่ 2 The factors affecting wound healing *in vivo*.

<i>in vivo</i> model	Effects on wound healing	References
IL-6R alpha knockout mice	<ul style="list-style-type: none"> <li>- IL-6R alpha เป็น receptor ที่จับแบบจำเพาะกับ IL-6 ทำหน้าที่ในการตอบสนองต่อการอักเสบแบบเฉียบพลันและการเปลี่ยนแปลงของ lymphocyte</li> <li>- การหายของแผลใกล้เคียงกับหนูสายพันธุ์ปกติ</li> <li>- พบการสร้างเยื่อผิวหนัง (re-epithelialization) ช้ากว่าหนูสายพันธุ์ปกติ แต่เร็วกว่าหนู IL-6 knockout mice</li> </ul>	McFarland-Mancini <i>et al.</i> , 2010
IL-6 knockout mice	<ul style="list-style-type: none"> <li>- IL-6 เป็น proinflammatory cytokine สร้างจาก neutrophils และ macrophage มีหน้าที่สำคัญในกระบวนการอักเสบ มีผลต่อการกระบวนการสร้างหลอดเลือดใหม่ (angiogenesis) กระบวนการสร้างเยื่อผิวหนัง (re-epithelialization) และการสะสมของ collagen</li> <li>- การหายของแผลช้ากว่าหนูสายพันธุ์ปกติ</li> <li>- พบการลดลงของ leukocyte infiltration, re-epithelialization และลดการสะสมของ collagen</li> </ul>	Lin <i>et al.</i> , 2003

ตารางที่ 2 (Continued)

<i>in vivo</i> model	Effects on wound healing	References
IL-17A knockout mice	<ul style="list-style-type: none"> <li>- IL-17A เป็น proinflammatory cytokine สร้างจาก helper T-cell มีหน้าที่ในการเพิ่มจำนวนและการเคลื่อนที่มาบริเวณแผลของ neutrophil มีความสำคัญต่อการป้องกันและทำลายเชื้อโรค</li> <li>- การหายของแผลเร็วกว่าหนูสายพันธุ์ปกติ</li> <li>- เพิ่มการสะสมของ collagen ลดการสะสมของ neutrophil บริเวณแผล</li> </ul>	Takagi <i>et al.</i> , 2016
IL-10 knockout mice	<ul style="list-style-type: none"> <li>- IL-10 เป็น cytokine สร้างจาก macrophage มีผลต่อการต้านอักเสบ และสามารถยับยั้ง cytokine อื่นๆ เช่น IL-12 และ TNF-alpha</li> <li>- การหายของแผลเร็วกว่าหนูสายพันธุ์ปกติ</li> <li>- พบการสร้างเยื่อぶผิวและการหดตัวของแผลเพิ่มขึ้น</li> <li>- พบการแสดงออกของ alpha-smooth muscle actin และการแทรกซึมของ macrophage เพิ่มขึ้น</li> </ul>	Eming <i>et al.</i> , 2007

ตารางที่ 2 (Continued)

<i>in vivo</i> model	Effects on wound healing	References
IL-1ra knockout mice	<ul style="list-style-type: none"> <li>- IL-1ra อยู่ในกลุ่มของ IL-1 family มีโครงสร้างคล้ายกับ IL-1s ซึ่งทำหน้าที่แย่งจับกับ IL-1R และขัดขวางการทำงานของ IL-1</li> <li>- การหายของแผลช้ากว่าหนูสายพันธุ์ปกติ</li> <li>- พบการลดลงในการแสดงออกของยีน VEGF</li> <li>- พบการลดลงของการสะสม collagen และกระบวนการสร้างหลอดเลือดใหม่</li> </ul>	Ishida <i>et al.</i> , 2006
Kinin receptors knockout mice	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Kinin เป็นสารสื่อกลางในกระบวนการอักเสบ มีผลทำให้หลอดเลือดขยายตัว และเพิ่มการซึมผ่านของหลอดเลือด</li> <li>- การหายของแผลช้ากว่าหนูสายพันธุ์ปกติ</li> <li>- มีผลลดการแทรกซึมของ polymorphonuclear cells</li> <li>- มี collagen ในเนื้อเยื่อลดลง ลดกระบวนการสร้างเยื่อผิวหนัง (re-epithelialization) และลดจำนวนของ myofibroblasts</li> </ul>	Soley <i>et al.</i> , 2016

ตารางที่ 2 (Continued)

<i>in vivo</i> model	Effects on wound healing	References
iNOS knockout mice	<ul style="list-style-type: none"> <li>- iNOS เป็นเอนไซม์ทำหน้าที่สังเคราะห์ nitric oxide ซึ่งมีผลต่อกระบวนการหายของแผล ทำให้หลอดเลือดขยาย ส่งเสริมการตอบสนองต่อการอักเสบและกระบวนการสร้างหลอดเลือดใหม่ (angiogenesis)</li> <li>- การหายของแผลช้ากว่าหนูสายพันธุ์ปกติ</li> <li>- พบการลดลงของกระบวนการสร้างเยื่อบุผิว (re-epithelialization) และลดการแทรกซึมของ macrophage</li> </ul>	Kitano <i>et al.</i> , 2017
ICAM-1 knockout mice	<ul style="list-style-type: none"> <li>- ICAM-1 อยู่ในกลุ่มของ immunoglobulin super family พบบนเยื่อหุ้มเซลล์ของเยื่อผนังหลอดเลือด ซึ่งเป็นสิ่งจำเป็นต่อการยึดเกาะและการเคลื่อนที่ของเซลล์เม็ดเลือดขาวในระหว่างกระบวนการอักเสบ</li> <li>- การหายของแผลช้ากว่าหนูสายพันธุ์ปกติ</li> <li>- พบความยืดหยุ่น (elasticity) ของเนื้อเยื่อลดลง</li> </ul>	Gay <i>et al.</i> , 2011



ตารางที่ 2 (Continued)

<i>in vivo</i> model	Effects on wound healing	References
Lumican knockout mice	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Lumican เป็นโปรตีนที่สำคัญใน ECM ทำหน้าที่ควบคุมการสร้างเส้นใย collagen ควบคุมการเคลื่อนที่และการแทรกซึมของเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ</li> <li>- การหายของแผลเกิดขึ้นช้ากว่าหนูสายพันธุ์ปกติ</li> <li>- เกิดความผิดปกติของโครงสร้างและการเรียงตัวของเส้นใย collagen</li> <li>- พบจำนวนของ macrophages เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องในบริเวณแผลเมื่อเปรียบเทียบกับหนูสายพันธุ์ปกติ</li> </ul>	<p>Yeh <i>et al.</i>, 2010 Liu <i>et al.</i>, 2013</p>
PPAR <sub>γ</sub> - knockout mice	<ul style="list-style-type: none"> <li>- PPAR<sub>γ</sub> เป็น receptor ที่อยู่ในกลุ่มของ nuclear receptor superfamily มีหน้าที่ควบคุมการทำงานของ macrophage</li> <li>- การหายของแผลช้ากว่าหนูสายพันธุ์ปกติ</li> <li>- พบการลดลงของการสร้าง granulation tissue ลดกระบวนการสร้างหลอดเลือดใหม่ (angiogenesis) และลดการสะสม collagen</li> <li>- macrophage</li> </ul>	<p>Chen <i>et al.</i>, 2015</p>

ตารางที่ 2 (Continued)

<i>in vivo</i> model	Effects on wound healing	References
TLR4 knockout (TLR4 <sup>-/-</sup> ) mice	<ul style="list-style-type: none"> <li>- TLR4 เป็นโปรตีนตัวรับจดจำรูปแบบ (pattern recognition receptors, PRRs) พบบนผนังเซลล์ของ macrophage ทำหน้าที่จับกับ lipopolysaccharide ที่สร้างจากแบคทีเรีย เพื่อตอบสนองต่อการกำจัดเชื้อโรค การอักเสบ และมีความสำคัญต่อการเกิดภาวะแทรกซ้อนของโรคเบาหวาน</li> <li>- การหายของแผลในหนูเบาหวาน (TLR4<sup>-/-</sup>) เร็วกว่าแผลในหนูเบาหวาน (WT)</li> <li>- การหายของแผลในหนูเบาหวาน (TLR4<sup>-/-</sup>) ไม่แตกต่างกับหนูสายพันธุ์ปกติ</li> <li>- ระดับของ IL-6 และ TNF-alpha ลดลงในเนื้อเยื่อแผลของหนูเบาหวาน (TLR4<sup>-/-</sup>)</li> </ul>	Dasu <i>et al.</i> , 2013
MMP-9 knockout mice	<ul style="list-style-type: none"> <li>- MMP-9 เป็นเอนไซม์ที่อยู่ในกลุ่มของ MMPs ทำหน้าที่ในการย่อยสลาย ECM และมีบทบาทสำคัญในการปรับเปลี่ยนสภาพของหลอดเลือด</li> <li>- การหายของแผลช้ากว่าหนูสายพันธุ์ปกติ</li> <li>- พบการลดลงของกระบวนการสร้างเยื่อบุผิว (re-epithelialization) และลดการสลาย fibrin clots</li> <li>- พบการลดลงของ endothelial progenitor cells, ลดกระบวนการสร้างหลอดเลือดใหม่ และลดการสะสมของ collagen บริเวณแผล</li> </ul>	Kyriakides <i>et al.</i> , 2009 Cho <i>et al.</i> , 2016

ตารางที่ 2 (Continued)

<i>in vivo</i> model	Effects on wound healing	References
NOX4 knockout mice	<ul style="list-style-type: none"> <li>- NOX4 คือเอนไซม์ที่เร่งการเกิดปฏิกิริยา redox ก่อให้เกิดการสร้าง superoxide หรือ hydrogen peroxide ซึ่งมีผลต่อการทำลายเนื้อเยื่อที่เรียกว่าในระยะเวลาการอักเสบของกระบวนการหายของแผล</li> <li>- การหายของแผลช้ากว่าหนูสายพันธุ์ปกติ</li> <li>- พบการสะสมของ collagen ลดลง</li> </ul>	Levigne <i>et al.</i> , 2016
Smad3 knockout mice	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Smad3 เป็นโมเลกุลส่งสัญญาณภายในเซลล์ มีความสำคัญต่อการทำหน้าที่ของ TGF-beta</li> <li>- การหายของแผลช้ากว่าหนูสายพันธุ์ปกติ</li> <li>- พบการลดลงของการแทรกซึมของ neutrophil และ macrophage ไปยังบริเวณแผล และการเกิด fibrosis ลดลง</li> </ul>	Flanders <i>et al.</i> , 2002 Liu <i>et al.</i> , 2014

### 3. โรคเบาหวานและภาวะแทรกซ้อนตามหลักสมดุขของธาตุทั้ง 4 ของแพทย์แผนไทย

การวิเคราะห์โรคตามทฤษฎีการแพทย์แผนไทยจะใช้หลักการของสมดุขธาตุ เพราะการเจ็บป่วยเกิดจากการขาดสมดุขของธาตุ ซึ่งธาตุ หมายถึง ธาตุดิน ธาตุน้ำ ธาตุลม และธาตุไฟ ที่เรียกว่า ธาตุสมดุขฐาน (อาจ อาสภมาเถร, 2554) หากธาตุทั้ง 4 อยู่ในสภาวะสมดุขร่างกายจะมีการทำงานเป็นปกติ แต่หากมีธาตุใดธาตุหนึ่งเกิดความผิดปกติก็จะส่งผลต่อธาตุอื่น ๆ ก่อให้เกิดอาการของโรคต่าง ๆ ได้ โดยความหนักเบาของอาการเจ็บป่วยมีระยะของการขาดสมดุขธาตุที่เรียกว่า กำเริบ (การแสดงออกขององค์ประกอบธาตุที่มากเกินไป) หย่อน (การแสดงออกขององค์ประกอบธาตุที่น้อยเกินไป) และพิการ (การสูญเสียหน้าที่ของธาตุนั้น ๆ) (ตำราการแพทย์ไทยเดิม: แพทย์ศาสตร์สงเคราะห์ฉบับอนุรักษ, 2550)

สาเหตุการเจ็บป่วยตามทฤษฎีการแพทย์แผนไทย มีดังนี้

1. มูลเหตุแห่งธาตุทั้ง 4
2. อิทธิพลของฤดูกาล
3. อายุที่เปลี่ยนไปตามวัย
4. อิทธิพลของกาลเวลาและสุริยะจักรวาล
5. ถิ่นที่อยู่อาศัย
6. พฤติกรรมที่เป็นมูลเหตุก่อโรค

ในรายงานครั้งนี้จะกล่าวถึงสาเหตุการเจ็บป่วยตามทฤษฎีการแพทย์แผนไทยในหัวข้อ มูลเหตุแห่งธาตุทั้ง 4 และพฤติกรรมที่เป็นมูลเหตุก่อโรค (ไกรสิทธิ์ ลิ้มประเสริฐ, 2554)

ธาตุทั้ง 4 ประกอบด้วย

#### 1. ธาตุดิน

ธาตุดิน คือ องค์ประกอบของสิ่งมีชีวิตที่มีลักษณะเป็นของแข็ง มีความคงรูป เช่น อวัยวะต่าง ๆ ธาตุดินมี 20 ประการ ได้แก่ ผม ขน เล็บ ฟัน หนัง เนื้อ เส้นเอ็น กระดูก เยื่อในกระดูก ม้าม หัวใจ ตับ พังผืด ไต ปอด ไล่ใหญ่ ไล่เล็ก อาหารใหม่ อาหารเก่า และมันสมอง

#### 2. ธาตุน้ำ

ธาตุน้ำ คือ องค์ประกอบของสิ่งมีชีวิตที่มีลักษณะเป็นของเหลว มีคุณสมบัติไหลไปมา ซึมซับไปในร่างกาย โดยอาศัยธาตุดินเพื่อการคงอยู่ อาศัยธาตุลมเพื่อการเคลื่อนไหว ธาตุน้ำ มี 12 ประการ ได้แก่ น้ำดี เสมหะ น้ำหนอง น้ำเลือด น้ำเหลือง มันข้น น้ำตา มันเหลว น้ำลาย น้ำมูก น้ำไขข้อ และน้ำปัสสาวะ

#### 3. ธาตุลม

ธาตุลม คือ องค์ประกอบของสิ่งมีชีวิต มีลักษณะเคลื่อนไหวได้ มีคุณสมบัติ คือ ความเบา เป็นสิ่งที่มิพลง ทำให้ร่างกายมีการเคลื่อนไหว เดิน นั่ง หรือนอนได้ ธาตุลมอาศัยธาตุดิน

และธาตุน้ำเป็นเครื่องนำพาพลัง และขณะเดียวกันธาตุลมพยุ่งธาตุดินและทำให้ธาตุน้ำเคลื่อนไหวไปมาได้ ธาตุลม มี 6 ประการ ได้แก่

- ลมพัดจากเบื้องล่างสู่เบื้องบน
- ลมพัดจากเบื้องบนสู่เบื้องล่าง
- ลมพัดอยู่ในท้องนอกสำไส้
- ลมพัดในกระเพาะอาหาร และลำไส้
- ลมพัดทั่วร่างกาย
- ลมหายใจเข้าออก

#### 4. ธาตุไฟ

ธาตุไฟ คือ องค์ประกอบของสิ่งมีชีวิต มีลักษณะที่เป็นความร้อน คุณสมบัติเผาผลาญให้แสงสลาย ไฟทำให้ลมและน้ำในร่างกายเคลื่อนที่ด้วยพลังแห่งความร้อนอันพอเหมาะ ไฟทำให้ธาตุดินอุ่น คือ อวัยวะต่าง ๆ ไม่เน่า ธาตุไฟ มี 4 ประการ ได้แก่

- ไฟที่ทำให้ร่างกายอบอุ่น
- ไฟที่ทำให้ร้อนระส่ำระสาย
- ไฟที่ทำให้ร่างกายเหี่ยวแห้งทรุดโทรม
- ไฟย่อยอาหาร

ธาตุทั้ง 4 ต้องอยู่ในภาวะสมดุล ร่างกายจึงจะเป็นปกติ ไม่เจ็บป่วย โดยมีความสัมพันธ์กันดังนี้

- ธาตุดินต้องอาศัยธาตุน้ำ ให้เกิดความชุ่มและเต่งตึงพอเหมาะ อาศัยลมพยุ่งให้คงรูปเคลื่อนไหว อาศัยธาตุไฟให้พลังงานความอบอุ่น ไม่เน่าเปื่อย

- ธาตุน้ำต้องอาศัยธาตุดินเป็นที่ซึมซับไว้ไม่ให้ไหลเหือดแห้ง อาศัยธาตุลมทำให้ไหลซึมซับทั่วร่างกาย

- ธาตุลม ธาตุน้ำและธาตุดินเป็นที่อาศัยและนำพาพลังไปในที่ต่าง ๆ ธาตุดินปะทะธาตุลม ให้เกิดการเคลื่อนที่ที่เหมาะสม

- ธาตุไฟ ทำให้ธาตุดินอบอุ่นและอาศัยธาตุดินเพื่อการเผาผลาญให้เกิดพลังงาน ธาตุไฟต้องอาศัยธาตุน้ำเพื่อการเผาผลาญที่พอเหมาะ ธาตุไฟทำให้ธาตุลมเคลื่อนที่ไปได้ ในขณะที่ธาตุลมสามารถทำให้ธาตุไฟเพิ่มการเผาผลาญให้มากขึ้นได้

จะเห็นได้ว่าธาตุทั้ง 4 ต่างอาศัยซึ่งกันและกัน จะขาดสิ่งใด สิ่งหนึ่งไม่ได้ หากมีความแปรปรวน เสียสมดุลขึ้น จะก่อให้เกิด อากาโร กำเริบ หย่อน หรือพิการ ส่งผลให้ร่างกายไม่สบาย เกิดเป็นโรคต่าง ๆ ขึ้นได้ เช่น โรคเบาหวาน (diabetes mellitus)

เบาหวานในทางการแพทย์แผนไทย หมายถึง ปัสสาวะที่มีรสหวาน จากการศึกษาโรคต่าง ๆ ที่ถูกบันทึกในคัมภีร์ทางด้านแพทย์แผนไทย จะไม่พบว่าเบาหวานนั้นเป็นโรค แต่เบาหวาน เป็นเพียงอาการเจ็บป่วยหนึ่ง ที่มีผลทำให้ร่างกายปัสสาวะออกมามีรสหวาน อย่างไรก็ตามไม่ได้มีคัมภีร์ระบุโรคหรืออาการนี้ไว้อย่างชัดเจน การแพทย์แผนไทยจึงวิเคราะห์โรคนี้ตามหลักสมดุลาตุทั้ง 4 ของร่างกาย ดังนี้

มูลเหตุ/สาเหตุการเกิดโรค

1. การรับประทานอาหาร จัดเป็นปัจจัยหลักที่ก่อให้เกิดโรค โดยผู้ที่เป็นโรคเบาหวานมักรับประทานในปริมาณที่มากกว่ากำลังไฟย่อยหรือรับประทานอาหารที่เหนียวนานให้ไฟย่อยในร่างกายเพิ่มมากขึ้น ซึ่งกำลังไฟย่อย จะมีมากขึ้นขึ้นอยู่กับแต่ละบุคคล โดยอาจขึ้นอยู่กับธาตุเจ้าเรือน ช่วงอายุหรือปัจจัยแวดล้อมต่าง ๆ และอาหารส่วนใหญ่ที่เป็นปัจจัยก่อให้เกิดโรค คืออาหารที่มีรสหวานและไขมัน

2. เกิดจากชาติสัมพันธ์ตระกูล (กรรมพันธุ์) คือ การสืบสายโลหิต หาก พ่อ แม่ ปู่ ย่า ตา หรือยาย เป็นโรคเบาหวาน ลูกจะมีโอกาสเป็นเบาหวานเช่นกัน

3. พฤติกรรมสุขภาพ ตามมูลเหตุการเกิดโรค 8 ประการ คือ การกินอาหาร การผืนอิริยาบถ การอยู่ในที่ร้อนหรือเย็นเกินไป การอดอาหาร อดน้ำและอดนอน การกลั่นอุจจาระและปัสสาวะ การทำงานเกินกำลังและมีกิจกรรมทางเพศมากเกินไป มีความเศร้าโศกเสียใจและดีใจเกินไป มีโทษมากเกินไป ซึ่งพฤติกรรมแต่ละอย่างจะส่งผลให้เกิดความกระทบกระเทือนต่อระบบต่าง ๆ ของร่างกายทำให้เจ็บป่วย จากการศึกษาของ สมยศ ศรีจารนัยและคณะ (2544) ศึกษาโรคเบาหวานในเชิงทฤษฎีการแพทย์แผนไทย พบว่าพฤติกรรมการกิน การนอน การดื่มน้ำ ขับถ่าย และสภาวะทางอารมณ์จะมีความสัมพันธ์กับการเป็นโรคเบาหวานอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับคนที่ไม่เป็นโรคเบาหวาน ซึ่งสอดคล้องกับพฤติกรรมเป็นมูลเหตุสำคัญที่ก่อให้เกิดโรคได้

4. ธาตุเจ้าเรือน คือ ธาตุหลักประจำตัวของแต่ละคน โดยธาตุทั้ง 4 จะแตกต่างกัน ซึ่งถือได้ว่าเป็นจุดอ่อนด้านสุขภาพของแต่ละคน ถ้ามีสภาวะแวดล้อม และพฤติกรรมที่ไม่เหมาะสมทำให้เกิดการเจ็บป่วยได้ สอดคล้องกับการศึกษาของ สมยศ ศรีจารนัยและคณะ (2544) และการศึกษาของ รุ่งราตี วิบูลชัย (2539) ที่ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างธาตุเจ้าเรือนกับการเกิดโรคเบาหวาน พบว่ากลุ่มผู้ป่วยที่มีธาตุไฟเป็นธาตุเจ้าเรือนจะพบว่าเป็นโรคเบาหวานมากกว่าธาตุอื่น ๆ ซึ่งธาตุเจ้าเรือนธาตุไฟจะมีจุดอ่อนของร่างกายเกี่ยวกับระบบย่อยอาหาร น้ำดี ระบบไหลเวียนเลือด ส่งผลต่อการเกิดโรค

ทฤษฎีการเกิดโรคเบาหวานตามหลักสมมูลของธาตุทั้ง 4

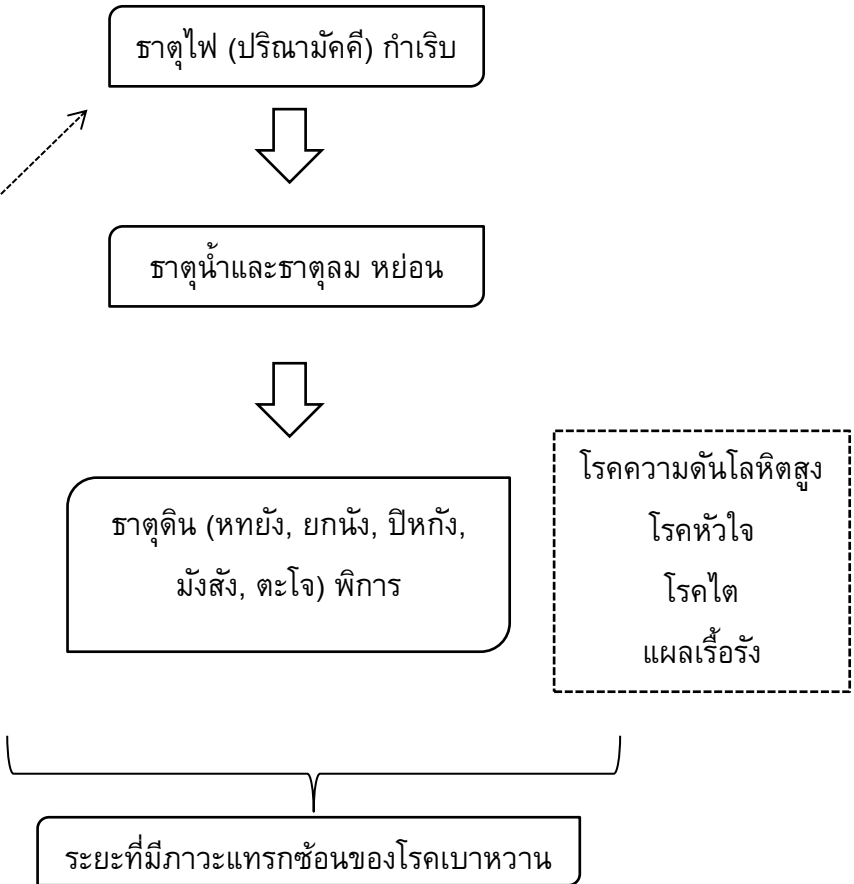
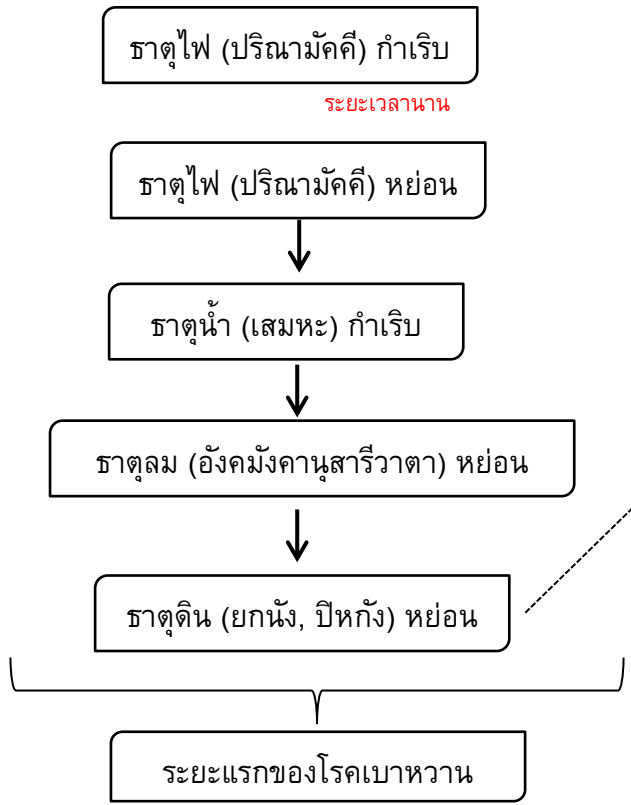
ในระยะแรกของการเป็นโรคเบาหวาน เริ่มจากพฤติกรรมของผู้ป่วยที่เกี่ยวข้องกับการรับประทานอาหารที่มีส่วนผสมของน้ำตาลและไขมันเป็นประจำ โดยปกติเมื่อรับประทานอาหาร ธาตุไฟในร่างกาย (ปริณามัคคี; ไฟย่อยอาหาร) จะทำหน้าที่ควบคู่กับน้ำย่อย ในการย่อยอาหาร เพื่อให้ได้พลังงานมาหล่อเลี้ยงส่วนต่าง ๆ ในร่างกาย โดยธาตุไฟนี้จะมีมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับธาตุเจ้าเรือนในแต่ละบุคคล จะส่งผลให้ธาตุไฟทำงานหนักขึ้น ซึ่งในช่วงมััจฉิมวัย (อายุ 16-32 ปี) มีปีตตะหรือธาตุไฟเป็นสมุฏฐาน ร่างกายมีพลังในการย่อยมาก แต่หากผู้ป่วยมีพฤติกรรม การรับประทานอาหารที่มีส่วนผสมของน้ำตาลและไขมันในปริมาณที่มากเป็นประจำ ต่อเนื่องกัน เป็นระยะเวลาานซึ่งมากเกินกำลังในการย่อยของธาตุไฟ เมื่อเข้าสู่ปัจฉิมวัย (อายุมากกว่า 32 ปี) ธาตุไฟที่ต้องทำงานหนักมาตลอดก็จะอ่อนกำลังลง (ธาตุไฟหย่อน) มีผลทำให้ระบบย่อยอาหารทำงานได้น้อยลง ส่งผลให้อาหารที่กินเข้าไปไม่ถูกย่อย เกิดอาการหิวบ่อย กินอาหาร เยอะ แต่ร่างกายไม่สามารถย่อยอาหารเพื่อนำพลังงานไปใช้หล่อเลี้ยงส่วนต่าง ๆ ได้ นอกจากนี้ อาหารที่มีรสหวาน มีคุณสมบัติบำรุงธาตุน้ำหรือระบบเสมหะในร่างกาย และจะซึมซาบไปบำรุง ผิวเนื้อ แต่เมื่อธาตุไฟหย่อน การซึมซาบจะไม่สมบูรณ์ทำให้มีการคั่งของน้ำหรือเสมหะในผิวเนื้อ (ธาตุน้ำกำเริบ) ส่งผลให้ธาตุลมเคลื่อนที่ผ่านเนื้อได้ลำบาก ระบบเลือดและลมในร่างกายจึง ไหลเวียนไม่สะดวก (ธาตุลมหย่อน) ทำให้ผู้ป่วยมีอาการเหนื่อยง่าย ปวดเมื่อยตามเนื้อตัว และ ด้วยคุณสมบัติของธาตุน้ำจะเคลื่อนที่จากที่สูงลงสู่ที่ต่ำ ทำให้น้ำนั้นไปกองอยู่บริเวณส่วนล่าง ของร่างกาย คือ บริเวณอุ้งเชิงกราน จึงทำให้มีอาการปัสสาวะมากและบ่อย เพื่อขับน้ำที่มาก เกินไปบริเวณส่วนล่างของร่างกาย นอกจากนี้ยังเกิดสภาวะธาตุน้ำ (น้ำดี) พัทธปีตตะหย่อน ส่งผลให้ตับอ่อนผลิตฮอร์โมนอินซูลินผิดปกติ (ธาตุดินหย่อน) อาจจะมีผลได้น้อย หรือผลิตได้ ปกติแต่ไม่สามารถทำงานได้ ส่งผลให้มีระดับน้ำตาลในเลือดสูง เลือดมีความหนืดมากขึ้น เมื่อเกิดภาวะระดับน้ำตาลในเลือดสูง ไตซึ่งทำหน้าที่ขับของเสียออกจากร่างกายในรูปของ ปัสสาวะ และดูดซึมสารอาหารที่มีประโยชน์กลับเข้าสู่ร่างกายเกิดการ ทำงานที่ผิดปกติ (ธาตุดิน หย่อน) โดยไม่สามารถดูดกลับน้ำตาลได้หมด ส่งผลให้มีน้ำตาลปนออกมากับปัสสาวะ เมื่อ ร่างกายเข้าสู่ระยะนี้แล้ว หากผู้ป่วยไม่สามารถรักษาและควบคุมการดำเนินโรคได้ ก็จะส่งผลต่อ ความเสื่อมของร่างกาย

เมื่อผู้ป่วยมีระดับน้ำตาลในเลือดสูง ส่งผลให้ร่างกายเร่งการเผาผลาญน้ำตาลที่ ตกค้างมากขึ้น (ธาตุไฟกำเริบ) เพื่อต้องการปรับสมดุลให้ร่างกายกลับมาสู่ภาวะปกติ ทำให้ ความร้อนภายในร่างกายเพิ่มมากขึ้น กระทบต่อธาตุน้ำและธาตุลม (หย่อน) เกิดอาการวิงเวียน ศีรษะ ซาบบริเวณปลายมือปลายเท้า เนื่องจากเลือดไม่สามารถไปเลี้ยงส่วนต่าง ๆ ได้ ซึ่งอาศัย ธาตุลมในการไหลเวียนไปทั่วร่างกาย เมื่อธาตุลมหย่อนก็ไม่สามารถพัดธาตุน้ำ (เลือด) ไปเลี้ยง ส่วนต่าง ๆ ได้ รวมทั้งธาตุลม (อังกมังกานุสารีวาตา; ลมพัดทั่วร่างกาย) หย่อน ซึ่งเกี่ยวข้องกับ

ระบบประสาทไม่สามารถรับส่งสัญญาณประสาทส่วนปลายได้ ส่งผลให้เกิดอาการชาบริเวณปลายมือปลายเท้า หากผู้ป่วยเกิดอุบัติเหตุหรือมีแผลบริเวณเท้า จะทำให้การรับรู้ความรู้สึกหรือความเจ็บปวดจากการเกิดแผลได้น้อยลง และด้วยเหตุผลที่ว่าระบบไหลเวียนเลือดไม่สามารถหล่อเลี้ยงอวัยวะส่วนปลายได้ ทำให้แผลที่เกิดขึ้นนั้นหายช้าลงหรือเกิดเป็นแผลเรื้อรังและลุกลามมากขึ้น เกิดเป็นภาวะแทรกซ้อนซึ่งเป็นแผลเรื้อรังบริเวณเท้าได้ (diabetic foot ulcer) นอกจากนี้การเกิดธาตุน้ำและธาตุลมหย่อน จะเหนี่ยวนำให้หทัยวาตะซึ่งตั้งอยู่ที่หทัยวัตถุ (หัวใจ) ต้องทำงานหนักขึ้น มีการพัคแรงหรือกำเริบขึ้น ซึ่งเทียบเคียงได้กับโรคความดันโลหิตสูง โดยปกติการพัคของหทัยวาตะจะพัคพาปริหทัยหคคิ (ลมที่ทำให้ร้อนระส่ำระส่าย) และโลหิตตั้งออกจากหัวใจไปตามลมอังกมังกานุสารีวาตา ดังนั้นเมื่อลมอังกมังกานุสารีวาตาทะยอนพัคได้ไม่ดี การส่งออกของโลหิตและปริหทัยหคคิเกิดความผิดปกติ (ส่งออกได้ไม่ดี) ทำให้ผู้ป่วยเกิดอาการ อ่อนเพลีย อิดโรย และรู้สึกระส่ำระส่าย เมื่อธาตุต่าง ๆ ที่ตั้งอยู่ที่หทัยวัตถุแสดง ความผิดปกติเหล่านี้อย่างต่อเนื่อง จะส่งผลให้ตัวหทัยวัตถุเองนั้นมีความผิดปกติหรือพิการได้เช่นกัน จากกลไกที่กล่าวมาข้างต้นนี้แสดงให้เห็นว่า ผู้ป่วยเบาหวานสามารถเกิดโรคความดันโลหิตสูงและโรคหัวใจแทรกซ้อนได้ (รูปที่ 5)



พฤติกรรมก่อโรค 8 ประการ : การรับประทานอาหารที่มี  
ส่วนผสมของน้ำตาลและไขมันที่มากเกินไป



รูปที่ 5 กลไกการเกิดโรคเบาหวานตามหลักสมดุลของธาตุทั้ง 4

#### 4. สมุนไพรที่เกี่ยวข้องกับการรักษาแผล (The roles of plant-derived compounds on wound healing: *in vitro*, *in vivo*, and clinical studies)

พืชสมุนไพรเป็นแหล่งของยารักษาโรคทั้งในทางการแพทย์แผนไทยและการแพทย์แผนปัจจุบัน เนื่องจากสารสำคัญหลายชนิดมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย ในปัจจุบันการใช้พืชสมุนไพรเป็นยารักษาโรคนั้นเป็นที่นิยมมากขึ้นเพื่อเป็นทางเลือกในการรักษา พืชสมุนไพรและสารสกัดจากพืชหลายชนิด มีการนำมาใช้ในการดูแลรักษาบาดแผล ซึ่งช่วยในการซ่อมแซมบาดแผลและการสร้างเนื้อเยื่อใหม่โดยผ่านกลไกต่าง ๆ ซึ่งในอดีตและปัจจุบันมีงานวิจัยการศึกษามากมายที่ศึกษาเกี่ยวข้องกับการใช้สมุนไพรต่อการหายของแผล ทั้งในระดับหลอดทดลอง (*in vitro*) สัตว์ทดลอง (*in vivo*) และการวิจัยเชิงคลินิก (clinical study)

##### 4.1 การศึกษาสารสกัดจากสมุนไพรที่มีคุณสมบัติในการรักษาแผลในระดับหลอดทดลอง (*in vitro*)

การศึกษาในระดับหลอดทดลอง เป็นการศึกษาในห้องปฏิบัติการทั่วไปที่สามารถทำได้ง่าย สะดวก รวดเร็ว และไม่เกี่ยวข้องกับการพิจารณาทางจริยธรรมเมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาในระดับสัตว์ทดลอง การทดสอบสารต่างๆ ต่อฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาสามารถทดสอบได้หลายความเข้มข้น โดยไม่มีข้อจำกัดทางด้านความแตกต่างของชุดทดสอบ การฟื้นฟูหรือการสร้างผิวหนังใหม่จะเกี่ยวข้องกับ connective, epithelial tissues, dermal fibroblasts และ human fibroblasts (primary cells หรือ cell lines) ซึ่งเซลล์เหล่านี้เหมาะกับการศึกษาสารทดสอบที่มีผลต่อกระบวนการหายของแผล การศึกษากระบวนการหายของแผลในระดับหลอดทดลองจะเกี่ยวข้องกับการปฏิสัมพันธ์ระหว่าง cell กับ cell และ cell กับ matrix เพื่อจำลองการเคลื่อนที่ของเซลล์ในระหว่างกระบวนการหายของแผล (Gottrup *et al.*, 2000; Wilhelm and Bielfeld, 2016) จากการศึกษาของ Demirci และคณะ (2014) ได้ศึกษาสารสกัดเมทานอลจากใบของ *Verbascum speciosum* ต่อคุณสมบัติต่างๆ ของเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการหายของแผล โดยศึกษาการมีชีวิตอยู่ของเซลล์ human dermal fibroblast cells (HF), mouse fibroblast cells (L929) และ human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) โดยใช้วิธี cell viability assay พบว่าในวันที่ 1, 2 และ 3 หลังการทดสอบเซลล์ทั้ง 3 ชนิดด้วยสารสกัดจากใบของ *V. speciosum* ที่ความเข้มข้น 10-200 µg/ml ไม่พบความเป็นพิษต่อเซลล์ HF, L929 และ HUVECs และพบว่าในวันที่ 3 หลังการทดสอบ ที่ความเข้มข้น 200 µg/ml มีผลต่อเพิ่มการแบ่งเซลล์ L929 และ HUVECs นอกจากนี้ได้ศึกษาการแพร่กระจายและเคลื่อนที่ของเซลล์ L929-HUVEC cells ด้วยวิธี co-culture scratch assays พบว่า กลุ่มที่ได้รับการทดสอบด้วยสารสกัดจากใบของ *V. speciosum* มีอัตราการปิดของแผล (wound closure rate) เร็วกว่ากลุ่มควบคุม และพบว่าเซลล์ L929 สามารถแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวน และเคลื่อนที่ไปยังบริเวณแผลได้

เร็วกว่าเซลล์ HUVEC จากการศึกษาของ Taleker และคณะ (2017) ได้ศึกษาผลของสารสกัดด้วยน้ำของตำรับยาที่ประกอบด้วย *Vitex negundo* L., *Emblca officinalis* Gaertn และ *Tridax procumbens* L. ต่อการเคลื่อนที่เซลล์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการหายของแผล ได้แก่ fibroblast และ keratinocytes (cell lines) โดยใช้วิธี Scratch assay พบว่า ตำรับยาที่ความเข้มข้น 5 µg/ml มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของเซลล์ fibroblast มากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ( $p < 0.05$ ) ตำรับยาที่ความเข้มข้น 3 µg/ml มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของเซลล์ keratinocyte มากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ( $p < 0.05$ ) นอกจากนี้การศึกษานี้ยังพบการศึกษาอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับการหายของแผลในระดับหลอดทดลอง แสดงดัง ตารางที่ 3

#### 4.2 การศึกษาสารสกัดจากสมุนไพรที่มีคุณสมบัติในการรักษาแผลในระดับสัตว์ทดลอง (*in vivo*)

การศึกษาในระดับสัตว์ทดลองมีระดับความน่าเชื่อถือมากกว่าในระดับหลอดทดลอง เนื่องจากเป็นการศึกษาในระบบร่างกายของสัตว์ทดลองซึ่งสามารถเทียบเคียงได้กับระบบร่างกายของมนุษย์ แต่มีข้อจำกัดทางด้านจริยธรรมการใช้สัตว์และสัตว์ทดลองมีความแตกต่างกันของสัตว์แต่ละตัว (individual differences) ซึ่งอาจจะทำให้ผลการทดลองเกิดความคลาดเคลื่อนได้ การใช้สัตว์ทดลองศึกษาผลของสารจากสมุนไพรต่อกระบวนการหายของแผลมีทั้งแบบ artificial model และ tissue model ซึ่งการเลือกใช้ model ขึ้นอยู่กับตัวแปรที่ต้องการจะทดสอบ สำหรับ artificial model เช่น subcutaneous chamber/sponges และ subcutaneous tubes ส่วน tissue model เช่น excision wounds, incision wounds, superficial wounds, dead space และ burn wounds ซึ่งนิยมใช้ในการตรวจสอบระดับของการสังเคราะห์เนื้อเยื่อใหม่ การสังเคราะห์ collagen การสังเคราะห์หลอดเลือดใหม่ และการวัดความแข็งแรงของเนื้อเยื่อบริเวณแผล (Dorsett-Martin and Wysocki, 2008; Gal *et al.*, 2008; Wilhelm and Bielfeld, 2016) Singhal และคณะ (2011) ได้ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดด้วย ethanol จากใบของ *Argyreia nervosa* ซึ่งอยู่ในวงศ์ convolvulaceae ต่อการหายของแผลในหนูปกติ และหนูเบาหวานที่เหนี่ยวนำด้วย alloxan monohydrate โดยทำให้เกิดแผลแบบ excisional wound model (ขนาด 300 mm<sup>2</sup> และลึก 2 mm) พบว่าหนูปกติ ในวันที่ 8 และ 16 หลังการเกิดแผล กลุ่มที่ได้รับการทาแผลด้วยยาขี้ผึ้งที่มีส่วนผสมของสารสกัดเอทานอลจากใบของ *A. nervosa* มีขนาดของพื้นที่แผลน้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และมีเปอร์เซ็นต์การปิดของแผล (%wound closure) ในวันที่ 16 เท่ากับ 92.96% ซึ่งสูงกว่ากลุ่มควบคุม (80.27%) แต่กลุ่มที่ได้รับการป้อนสารสกัดเอทานอลของ *A. nervosa* ขนาดของพื้นที่แผลไม่มีความแตกต่างกันกับกลุ่มควบคุม ในส่วนของหนูเบาหวาน ในวันที่ 16 หลังการเกิดแผล พบว่าทั้งกลุ่มที่ได้รับการทาด้วยยาขี้ผึ้งและได้รับการป้อนสารสกัดเอทานอล

ของ *A. nervosa* มีขนาดของพื้นที่แผลน้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และมี %wound closure สูงกว่ากลุ่มควบคุมในทุกช่วงเวลา Taleker และคณะ (2017) ได้ศึกษาผลของสารสกัดด้วยน้ำของตำรับยา ที่ประกอบด้วย *Vitex negundo* L., *Emblica officinalis* Gaertn และ *Tridax procumbens* L. ต่อการหายของแผลในหนูแรทโดยใช้ excision wound model พบว่าหนูกลุ่มที่ได้รับการรักษาด้วยสารสกัดจากน้ำของตำรับยามีขนาดของแผลลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ในวันที่ 3, 6, 9, 12 และ 15 และพบว่าในวันที่ 15 หนูกลุ่มที่ได้รับการรักษาด้วยสารสกัดจากน้ำของตำรับยามี %wound contraction เท่ากับ 99.2% นอกจากนี้ได้นำตัวอย่างเนื้อเยื่อจากแผลที่หายแล้วตรวจวิเคราะห์ปริมาณของ collagen และ hydroxyproline พบว่า กลุ่มที่ได้รับการรักษาด้วยสารสกัดน้ำของตำรับยามีปริมาณของ collagen และ hydroxyproline สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม นอกจากนี้การศึกษานี้ยังพบการศึกษาอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องกับ การหายของแผลในระดับสัตว์ทดลอง แสดงดัง ตารางที่ 4

#### 4.3 การศึกษาสารสกัดจากสมุนไพรที่มีคุณสมบัติในการรักษาแผลในระดับคลินิก (clinical study)

การศึกษาในระดับคลินิกเป็นการศึกษาที่มีความน่าเชื่อถือมากที่สุด แต่มีข้อจำกัดทางด้านจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ และจำเป็นต้องมีผลการศึกษาทั้งในระดับหลอดทดลองและ สัตว์ทดลองยืนยันความปลอดภัยของการใช้จริงในมนุษย์ ซึ่งการศึกษาในระดับคลินิกที่ เกี่ยวข้องกับผลของสารสกัดจากสมุนไพรต่อกระบวนการหายของแผลจะพบการศึกษาใน รูปแบบของแผลชนิดต่าง ๆ ในผู้ป่วย เช่น infection wound, burn wound หรือ diabetic wound เป็นต้น จากการศึกษาเชิงคลินิกของ Xu และ Jin (2015) ได้ทดสอบผลของการใช้ยา Shengji ointment (SO) รักษาแผลติดเชื้อในผู้ป่วย yang syndrome โดยใช้วิธี multicenter randomized controlled trial ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาแผลด้วยยา SO (treatment group) จำนวน 330 คน และกลุ่มผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาแผลด้วย Votalin (control group) จำนวน 110 คน ผู้ป่วยทั้งหมดได้รับการรักษาทุกวันเป็นเวลา 21 วัน พบว่าหลังการ รักษา 7 วัน ขนาดพื้นที่ของแผลใน treatment group ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อ เปรียบเทียบกับ control group ( $p=0.002$ ) นอกจากนี้พบว่าระดับความเจ็บปวด และความลึก ของแผลใน treatment group ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับ control group ( $p<0.01$ ) จากการศึกษาเชิงคลินิกของ Muangman และคณะ (2016) ในการทดสอบผลของ แผ่นปิดแผล โดยใช้ 100% polyester gauze ที่เคลือบด้วยสารสกัดจากสมุนไพร 2 ชนิด ได้แก่ 5% *Centella asiatica* (บัวบก) และ 2.5% *Aloe vera* (ว่านหางจระเข้) (herbal extracts dressing) ต่อการรักษาผู้ป่วยที่มีแผลชนิด burn wound โดยใช้วิธี simple randomized

prospective clinical study ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่ม herbal group ได้รับการรักษาแผลด้วย herbal extracts dressing จำนวน 17 คน และกลุ่ม control group ได้รับการรักษาแผลด้วย commercial dressing (paraffin และ 0.5% chlorhexidine acetate) ผู้ป่วยทั้งหมดได้รับการรักษาด้วยแผ่นปิดแผล และเปลี่ยนแผ่นปิดแผลทุก ๆ 3 วัน จนกว่าแผลหาย พบว่า ผู้ป่วยในกลุ่ม herbal group มีระยะเวลาในการหายของแผล เท่ากับ  $18.53 \pm 1.66$  วัน ซึ่งน้อยกว่ากลุ่ม control group ( $20.06 \pm 2.51$  วัน) และพบว่าในวันที่ 15 และ 20 ของการรักษา กลุ่ม herbal group มี %epithelialization สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม control group ( $p= 0.043$  และ  $p= 0.010$  ตามลำดับ) จากการศึกษาเชิงคลินิกของ Ko และคณะ (2014) ในการทดสอบผลของตำรับยาสมุนไพร (NF3) ประกอบด้วยสมุนไพร 2 ชนิด คือ *Radix Astragali* และ *Radix Rehmanniae* ในอัตราส่วน 2:1 ซึ่งอยู่ในรูปแบบยาผง ต่อการรักษาแผลบริเวณเท้าของผู้ป่วยเบาหวาน โดยใช้วิธี randomized double-blind placebo-controlled study ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มๆ ละ 8 คน คือ กลุ่ม herbal group ได้รับการรักษาแผลด้วย NF3 ครั้งละ 5 g วันละ 2 ครั้ง เข้า-เย็น และกลุ่ม control group ได้รับการรักษาแผลด้วย placebo วันละ 2 ครั้ง เข้า-เย็น ผู้ป่วยทั้งหมดได้รับการรักษาระยะเวลารวม 6 เดือน พบว่ากลุ่ม herbal group มีขนาดพื้นที่แผล (3.55%) ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับ control group (1.52%) ( $p= 0.062$ ) และจากผลการทดสอบ การตอบสนองต่อ sensory neuropathy พบว่าในกลุ่ม herbal group มีการตอบสนองลดลงจาก 27% เป็น 7% และกลุ่ม control group มีการตอบสนองลดลงจาก 37% เป็น 35% นอกจากนี้กลุ่ม herbal group มีระดับของ TNF-alpha ใน serum ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับ control group ( $p= 0.034$ ) และจากการศึกษาโดยการใช้วิธี Microarray study พบว่ากลุ่ม herbal group มีการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับ การสร้าง fibroblasts การสังเคราะห์หลอดเลือดใหม่ และต้านการอักเสบ จากรายงานของ Namjoyan และคณะ (2016) ได้ทดสอบผลของการใช้ครีม Dragon's blood ซึ่งเป็น resin ที่ได้จากต้น *Croton lechleri* ต่อการรักษาแผลในผู้ป่วย โดยใช้วิธี double-blind, placebo-controlled, randomized clinical trial ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่ม therapeutic group ซึ่งได้รับการรักษาด้วย Dragon's blood cream และกลุ่มที่ได้รับการรักษาด้วยยาหลอก คือ placebo group ผู้ป่วยทุกคนได้รับการทาครีมวันละ 2 ครั้ง และได้รับการประเมินเปอร์เซ็นต์การหายของแผล โดยใช้เวลาในการรักษาจนกระทั่งแผลหายสนิท ซึ่งพบว่าในวันที่ 3, 5, 7 และ 10 หลังการรักษาด้วย Dragon's blood cream มีเปอร์เซ็นต์การหายของแผล เท่ากับ 31.06, 63.77, 77.80 และ 89.14% ตามลำดับซึ่งสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม placebo group (4.74, 23.50, 43.90 และ 61.95% ตามลำดับ) ( $p= 0.0001$ )

ตารางที่ 3 Medicinal plants that are capable of wound healing activity *in vitro*.

No.	Plant species/Family	Plant organs/Type extract	Mechanism of action	References
1	<i>Calendula officinalis</i> /Asteraceae	flowers/ hexane and ethanol	Stimulated proliferation and migration of fibroblasts	Fronza <i>et al.</i> , 2009
2	<i>Atropa belladonna</i> /Solanaceae	whole plant/aqueous	Induction fibronectin and galectin-1 rich ECM formation	Gal <i>et al.</i> , 2012
3	<i>Citrus tamurana</i> / Rutaceae	peel/aqueous	Enhancing skin fibroblast migration	Harishkumar <i>et al.</i> , 2013
4	<i>Acorus calamus</i> /Araceae	leaves/aqueous	Inhibition of the expression of TNF-alpha, IL-1beta, IL-6 and iNOS at the mRNA level	Shi <i>et al.</i> , 2014
5	<i>Adiantum capillus-veneris</i> /Pteridaceae	shoots/methanol	Improving the expression of <i>Tgfbeta1</i> and <i>Vegf-A</i> gene	Negahdari <i>et al.</i> , 2017
6	<i>Commiphora molmol</i> /Burceraceae	whole plant/methanol	Promoting the migration of fibroblasts	
7	<i>Aloe vera</i> /Asphodelaceae	leaves/gel	Up-regulated the expression of TGF-beta1 and bFGF in fibroblast cells	Hormozi <i>et al.</i> , 2017

ตารางที่ 3 (Continued)

No.	Plant species/Family	Plant organs/Type extract	Mechanism of action	References
8	<i>Combretum mucronatum</i> /Combretaceae	leaves/aqueous	Stimulated cellular differentiation of keratinocytes	Kisseih <i>et al.</i> , 2015
9	<i>Achyrocline satureioides</i> /Asteraceae	whole plant/ethanol	Stimulated keratinocyte and fibroblast proliferation	Alerico <i>et al.</i> , 2015
10	<i>Matricaria recutita</i> /Asteraceae	aerial parts/aqueous	Stimulated keratinocyte proliferation	
11	<i>Melia azedarach</i> /Meliaceae	leaves/aqueous	Stimulated keratinocyte proliferation	
12	<i>Mirabilis jalapa</i> /Nyctaginaceae	leaves/aqueous	Stimulated keratinocyte proliferation	
13	<i>Calendula officinalis</i> /Asteraceae	flowers/ hexane and ethanol	Activating the transcription factor NF-keppa B, increasing the expression of IL-8 (mRNA and protein) in inflammatory phase and increasing collagen level	Nicolaus <i>et al.</i> , 2017

ตารางที่ 4 Medicinal plants that are capable of wound healing activity *in vivo*.

No.	Plant species/Family	Plant organs/Type extract	Mechanism of action	References
1	<i>Rheum officinale</i> Baill /Polygonaceae	roots/ Emodin	Stimulation of tissue regeneration and accelerating healing of cutaneous wounds which is related to TGF-beta1/Smad signaling pathway.	Tang <i>et al.</i> , 2007
2	<i>Radix rehmanniae</i> /Scrophulariaceae	whole plant/aqueous	Increasing developed scars and epithelialization as well as good formation of capillaries with enhanced VEGF expression.	Lau <i>et al.</i> , 2009
3	<i>Arnebia densiflora</i> /Boraginaceae	root barks/hexane and chloroform	Increase in the synthesis of collagen, fibronectin, and transforming growth factor-beta1	Akkol <i>et al.</i> , 2009
4	<i>Hevea brasiliensis</i> /Euphorbiaceae	latex	Increasing vascular permeability and angiogenesis.	Mendonca <i>et al.</i> , 2010
5	<i>Atropa belladonna</i> /Solanaceae	whole plant/aqueous	Increasing production of fibronectin, collagen-3 and galectin-1 in granulation tissue	Gal <i>et al.</i> , 2012



ตารางที่ 4 (Continued)

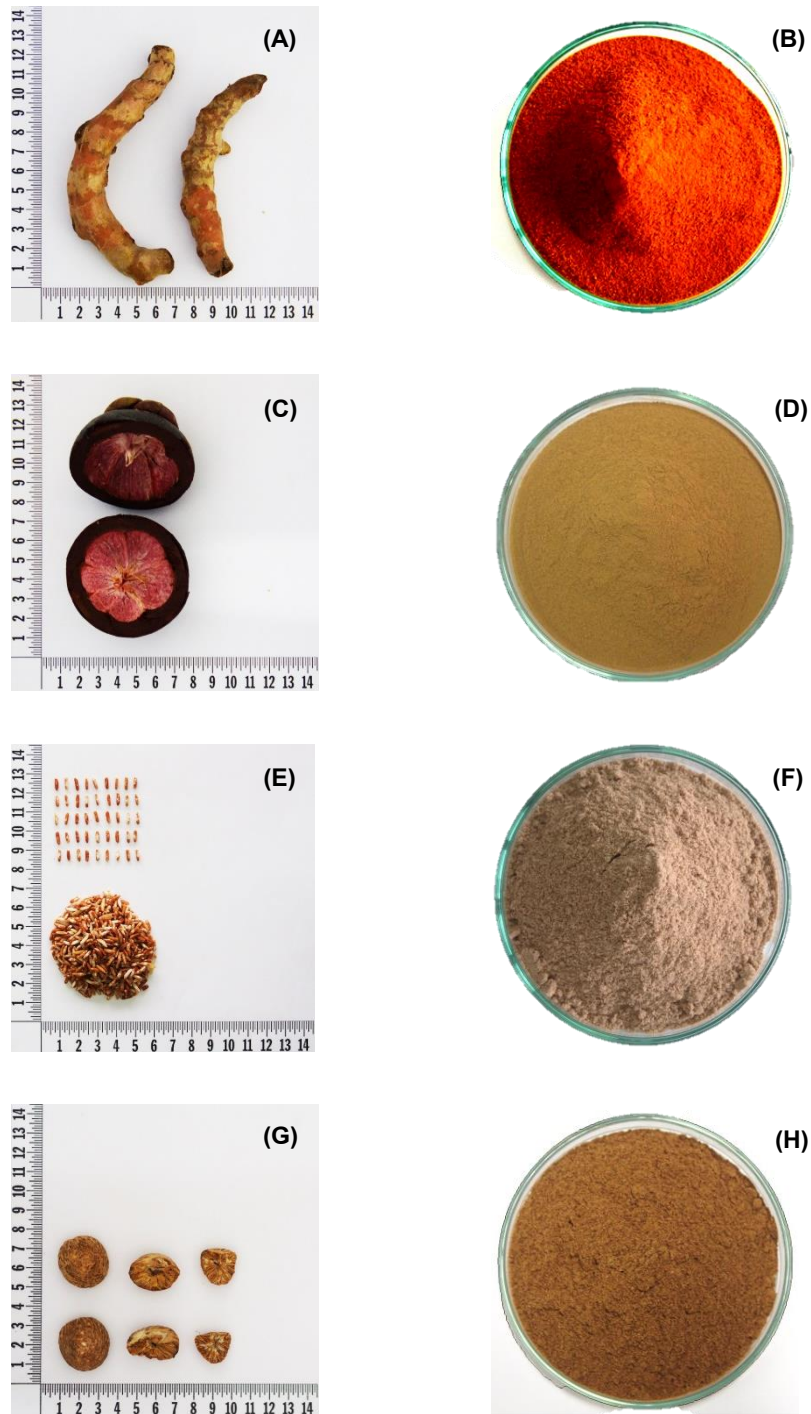
No.	Plant species/Family	Plant organs/Type extract	Mechanism of action	References
6	<i>Punica granatum</i> /Lathyraceae	fruit skin/methanol	Increasing TNF-alpha and IL-6 level in early wound healing phase	Nayak <i>et al.</i> , 2013
7	<i>Zingiber zerumbet</i> /Zingiberaceae	rhizomes/Zerumbone	Stimulated tissue regeneration and fibroblasts formation Enhanced TGF-beta1, VEGF and collagen IV expression	Liu <i>et al.</i> , 2016
8	<i>Lawsonia inermis</i> /Lythraceae	leaves/aqueous	Enhanced wound epithelialization	Jridi <i>et al.</i> , 2017
9	<i>Pongamia pinnata</i> /Fabaceae	leaves/methanol	Up-regulated the expression of TNF-alpha and IL-6 in early wound healing phase	Dwivedi <i>et al.</i> , 2017
10	<i>Hibiscus rosa-sinensis</i> /Malvaceae	flower/N-butyl alcohol	Enhancing the macrophages activity, accelerating angiogenesis and collagen fiber deposition response mediated by VEGF and TGF-beta1	Shen <i>et al.</i> , 2017

## 5. การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสมุนไพรองค์ประกอบในตำรับยาสมานแผล (Ya-Samarn-Phlae) และการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของยาสมานแผล

การแพทย์แผนไทย (thai traditional medicine) เป็นภูมิปัญญาในการดูแลสุขภาพของประชาชนชาวไทย จนกลายเป็นวัฒนธรรมการดูแลสุขภาพที่หลากหลาย มีการผสมผสานกับการแพทย์แบบอื่นและมีการปรับตัวอย่างต่อเนื่อง สามารถตอบสนองความต้องการของประชาชนในการดูแลสุขภาพหลายมิติ ทั้งด้านกาย จิตใจ สังคม วัฒนธรรมและความเชื่อ (Marles and Farnsworth, 1995; กรมพัฒนาการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก กระทรวงสาธารณสุข, 2550) จากความเชื่อว่าสมุนไพรส่วนมากจะมีฤทธิ์อ่อน ไม่ค่อยมีพิษหรือไม่เกิดฤทธิ์ข้างเคียงเฉียบพลัน (วรรณุช เกียรติพงษ์ถาวรและคณะ, 2530) ประกอบกับรัฐบาลมีนโยบายที่จะพัฒนาสมุนไพรตามแผนพัฒนาการเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติ โดยกำหนดแนวทางในการพัฒนาสมุนไพรไว้ 3 แนวทางคือ 1) เพื่อใช้ในงานสาธารณสุขมูลฐาน 2) เพื่อใช้ในอุตสาหกรรม และ 3) เพื่อส่งออก โดยเฉพาะการใช้น้ำยาหรือครีมใส่แผลซึ่งสกัดจากพืชสมุนไพรเพื่อช่วยลดอันตรายจากการติดเชื้อและ/หรือช่วยส่งเสริมการสร้างเนื้อเยื่อใหม่บริเวณแผล โดยมีผู้ทดลองใช้น้ำผึ้ง น้ำเชื่อมเข้มข้น (วรรณุช เกียรติพงษ์ถาวร, 2525) ครีมใบบัวบก (ศิริรัตน์ โกศลวัฒน์, 2537) ครีมเปลือกมังคุด (วัฒน์ชัย ปานจินดา, 2535) และวุ้นว่านหางจระเข้ (วรรณุช เกียรติพงษ์ถาวรและคณะ, 2530) พบว่าได้ผลดีในด้านการรักษาแผลในทางการแพทย์แผนไทยมักจะมีการใช้สมุนไพรในการรักษาโรคเป็นตำรับยามากกว่าสมุนไพรเดี่ยว ซึ่งตำรับยาสมุนไพรจะประกอบด้วยสมุนไพรมากกว่าหนึ่งชนิดขึ้นไป

จากการศึกษาก่อนหน้านี้ ได้ศึกษาตำรับยาสมานแผลในภาคใต้ พบว่าประสิทธิภาพของการใช้ตำรับยาในการทดสอบฤทธิ์ต่าง ๆ มีความสามารถดีกว่าการใช้สมุนไพรเดี่ยว ยาสมานแผล ซึ่งประกอบด้วยสมุนไพร 4 ชนิด คือ เปลือกมังคุด เหง้าขมิ้นชัน เมล็ดหมาก และเมล็ดข้าวสาร (รูปที่ 6) เป็นตำรับยาของหมอสสมพร ชาญวณิชย์สกุล ซึ่งเป็นแพทย์แผนไทย และอาจารย์แพทย์แผนไทยอาวุโสของคณะกรรมการแพทย์แผนไทย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ หมอสสมพร มีประสบการณ์ในการรักษาผู้ป่วยโรคต่าง ๆ เป็นเวลามากกว่า 50 ปี ซึ่งโรคที่ให้การรักษามากที่สุดคือ โรคไขเรื้อรัง สตรีวัยทอง โรคหอบหืด โรคผิวหนัง รวมทั้งการรักษาแผลทั้งแบบเฉียบพลันและแผลเรื้อรัง โดยหมอสสมพร ได้เรียนรู้การใช้ตำรับยาสมานแผลจากผู้เป็นพ่อซึ่งเป็นหมอพื้นบ้านและทำงานเป็นผู้คุมเรือนจำ ในพื้นที่จังหวัดชุมพร หมอสสมพร ได้สังเกตเห็นผู้เป็นพ่อมีการเตรียมตำรับยาสมานแผลบ่อยครั้ง จึงได้มีการสอบถาม และได้รับคำตอบว่า นักโทษในเรือนจำซึ่งถูกล่ามโซ่บริเวณเท้าเป็นเวลานานจะเกิดแผลเรื้อรังขึ้นด้วยจิตวิญญานการเป็นหมอของพ่อจึงได้เตรียมยาสมานแผลตำรับนี้ในการใช้รักษานักโทษเหล่านั้น การเตรียมยาแบบวิธีดั้งเดิม คือ การนำสมุนไพรสดทั้ง 4 ชนิด คั่วในกระทะที่ร้อนพอดีจนได้สมุนไพรที่มีความกรอบนำมาตำให้เป็นผง จากนั้นมีการเตรียมมะพร้าวสุก โดยขูดเอาแต่

เนื้อมะพร้าวคั้นเป็นกะทิ จากนั้นใส่ลงในกระทะพร้อมทั้งใส่สมุนไพรมะพร้าวที่ตำเป็นผงไว้ข้างต้น เคี่ยวบนเตาไฟเรื่อย ๆ จนได้น้ำมัน และกรองเอาน้ำมันจากยาสมานแผลนี้บรรจุใส่ขวด เพื่อนำไปรักษาให้กับนักโทษ วิธีการใช้แบบดั้งเดิม คือ นำสำลีชุบน้ำมันสมานแผลทาลงไปบริเวณแผล ซึ่งสามารถรักษาแผลของนักโทษได้ จากนั้นมา หมอสมพรจึงมีการใช้ตำรับยาสมานแผลนี้ในการรักษาแผลหลายชนิด เช่น แผลงูกัด แผลไฟไหม้น้ำร้อนลวก รวมทั้งแผลเบาหวาน



រូបភាព ៦ Macroscopic characters and powders of *Curcuma longa* (A and B), *Garcinia mangostana* (C and D), *Oryza sativa* (E and F) and *Areca catechu* (G and H).

5.1 การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสมุนไพรวงศ์ประกอบในตำรับยาสมานแผล ประกอบด้วย สมุนไพรรวม 4 ชนิด ได้แก่ มังคุด ขมิ้นชัน หมากสง และข้าวสาร ซึ่งสมุนไพรวงศ์ประกอบมี ฤทธิ์ทางชีวภาพที่เกี่ยวข้องกับการหายของแผล แสดงดังตารางที่ 5

#### 1. มังคุด (*Garcinia mangostana* L.)

การใช้ทางการแพทย์แผนไทย เปลือกผล รสฝาด บดเป็นผง หรือชง หรือตำรับประทาน แก้ก้องเสีย แก้กัดมูกเลือด ผนกับน้ำปูนใส ทาแผลเน่าเปื่อยพุพอง แผลมีหนอง สมานแผลสด

สารสำคัญ สารสำคัญที่เป็นองค์ประกอบหลัก คือสารในกลุ่ม Xanthones เช่น alpha-mangostin, beta-mangostin, gamma-mangostin, mangostinone, smeachxanthone A และ garcinone E เป็นต้น (Jung *et al.*, 2006)

ฤทธิ์ทางชีวภาพของมังคุด

- ฤทธิ์ต้านการอักเสบ

จากการศึกษาของ Nakatani และคณะ (2002) ได้ศึกษาสาร gamma-mangostin ที่แยกได้จากเปลือก ของ *G. mangostana* พบว่าสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ COX-1 และ COX-2 ได้ โดยมีค่า IC<sub>50</sub> เท่ากับ 0.8 และ 2  $\mu$ M ตามลำดับ

จากการศึกษาของ Tewtrakul และคณะ (2009) ได้ศึกษาผลของสารสกัดจากเปลือก ของ *G. mangostana* และสารสำคัญ (alpha-mangostin และ gamma-mangostin) ที่แยกได้จาก เปลือกของ *G. mangostana* ต่อฤทธิ์ต้านการอักเสบใน RAW264.7 macrophage cells ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย lipopolysaccharide (LPS) พบว่า สารสกัดจากเปลือกของ *G. mangostana* มีผลต่อการยับยั้งการสร้าง NO และ PGE<sub>2</sub> ได้ โดยมีค่า IC<sub>50</sub> เท่ากับ 1.0 และ 6.0  $\mu$ g/ml ตามลำดับ ส่วน alpha-mangostin ผลต่อการยับยั้งการสร้าง NO และ PGE<sub>2</sub> ซึ่งมีค่า IC<sub>50</sub> เท่ากับ 3.1 และ 13.9  $\mu$ M ตามลำดับ และ gamma-mangostin สามารถยับยั้งการสร้าง NO และ PGE<sub>2</sub> ซึ่งมีค่า IC<sub>50</sub> เท่ากับ 6.0 และ 13.5  $\mu$ M ตามลำดับ และพบว่าทั้ง alpha-mangostin และ gamma-mangostin สามารถยับยั้งการสร้าง TNF-alpha และ IL-4 ได้ โดยมีค่า IC<sub>50</sub> อยู่ในช่วง 31.8-64.8  $\mu$ M นอกจากนี้พบว่าทั้งสารสกัดจากเปลือกของ *G. mangostana* และ alpha-mangostin มีผลยับยั้งการแสดงออก iNOS และ COX-2 แต่ gamma-mangostin มีผลยับยั้ง เฉพาะ iNOS นอกจากนี้พบว่า alpha-mangostin สามารถยับยั้งการอักเสบบริเวณอุ้งเท้า ของหนูทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย carrageenan ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ gamma-mangostin ไม่สามารถยับยั้งการอักเสบบริเวณอุ้งเท้าของหนูทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย carrageenan ได้ (Chen *et al.*, 2007) การศึกษาของ Kumar และคณะ (2015) ได้ศึกษา ฤทธิ์ของสารสกัดด้วยเอทิลอะซีเตทจากเปลือกของ *G. mangostana* ต่อการยับยั้งการสร้าง NO ในเซลล์ RAW264.7 macrophage cells ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย LPS พบว่า สารสกัดที่ความเข้มข้น

0.9-15.6  $\mu\text{g/ml}$  สามารถยับยั้งการสร้าง NO ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และจากการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์โดยใช้วิธี MTT assay สารสกัดทุกความเข้มข้นไม่พบความเป็นพิษต่อเซลล์ RAW264.7 macrophage cells ซึ่งเซลล์มีชีวิตรอดมากกว่า 90% เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

จากการศึกษาของ Liu และคณะ (2016) ได้ศึกษาผลของสารในกลุ่ม xanthones ที่แยกได้จากเปลือกของ *G. mangostana* ต่อฤทธิ์ยับยั้งการสร้าง NO ใน lipopolysaccharide (LPS)-stimulated RAW264.7 cells ซึ่ง NO เป็นสารสื่อกลางที่ควบคุมการตอบสนองต่อการอักเสบ แต่การสร้าง NO มากเกินไปจะทำให้เซลล์และเนื้อเยื่อเกิดการความเสียหาย ทำให้เกิดโรคต่างๆ รวมทั้งการเกิดแผลที่เท้าในโรคเบาหวานด้วย จากการศึกษาพบว่า Garcinoxanthones B และ C สามารถยับยั้งการสร้าง NO ได้อย่างมีนัยสำคัญ โดยมีค่า  $\text{IC}_{50}$  เท่ากับ  $11.3 \pm 1.7$  และ  $18.0 \pm 1.8$   $\mu\text{M}$  ตามลำดับ และพบว่า Garcinoxanthones B สามารถยับยั้งการแสดงออกของ inducible NO synthase (iNOS) ได้

#### - ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

จากการรายงานของ Lim และคณะ (2013) ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดด้วย 70% เมทานอล จากเปลือก ผล และเมล็ดของ *G. mangostana* โดยใช้วิธี ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay และ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) assay พบว่า สารสกัดจากเปลือกมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้สูงกว่าผลและเมล็ดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยสารสกัดจากเปลือกมีค่าความสามารถในการรีดิวซ์ไอโหดรอนซ์ชันหรือ ferrous sulphate equivalent antioxidant capacity (FEAC) value เท่ากับ 18.9 mM/g ซึ่งสูงกว่าสารสกัดจากผลและเมล็ด 27.0 และ 8.6 เท่า ตามลำดับ และสารสกัดจากเปลือกมีค่าความสามารถในการเข้าจับอนุมูลอิสระของสารสกัดเทียบเท่ากับสารมาตรฐาน Trolox 1 มิลลิโมลาร์ หรือ trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) value เท่ากับ 122.00  $\mu\text{M/g}$  ซึ่งสูงกว่าสารสกัดจากผลและเมล็ด 5.0 และ 1.5 เท่า ตามลำดับ

จากรายงานของ Ngawhirunpat และคณะ (2010) ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเปลือก ของ *G. mangostana* โดยใช้ตัวทำละลาย 3 ชนิดในการสกัด ได้แก่ น้ำ เมทานอล และเฮกเซน จากการศึกษาปริมาณของ alpha-mangostin โดยใช้เทคนิค HPLC ในสารสกัดทั้ง 3 ชนิด พบว่า สารสกัดด้วยน้ำไม่พบ alpha-mangostin แต่ในสารสกัดด้วยเฮกเซน พบ alpha-mangostin เท่ากับ 28.7% w/w ซึ่งพบปริมาณมากกว่าสารสกัดด้วยเมทานอล (15.5% w/w) แต่ปริมาณของสารฟลาโวนอยด์และแทนนิน พบมากที่สุดในการสกัดด้วยน้ำ รองลงมาคือเมทานอล และเฮกเซน ตามลำดับ และจากการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยใช้วิธี DPPH assay พบว่า สารสกัดด้วยน้ำ เมทานอล และเฮกเซน มีค่า  $\text{IC}_{50}$  เท่ากับ 11.0,

14.7 และ 41.2  $\mu\text{g/ml}$  ตามลำดับ ส่วน alpha-mangostin มีค่า  $\text{IC}_{50}$  เท่ากับ 89.2 mM นอกจากนี้ สารสกัดด้วยน้ำยังสามารถยับยั้งการเกิด lipid peroxidation ได้ดีที่สุด โดยมีค่า  $\text{IC}_{50}$  เท่ากับ 85.1  $\mu\text{g/ml}$  และจากการทดสอบการเหนี่ยวนำเซลล์ keratinocyte ด้วย hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) พบว่า สารสกัดด้วยน้ำที่ความเข้มข้น 50  $\mu\text{g/ml}$  สามารถป้องกันความเสียหายของเซลล์ โดยการถูกทำลายจากปฏิกิริยาออกซิเดชันได้

Palakawong และคณะ (2010) ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเปลือกผล ใบบ และเปลือกต้นของ *G. mangostana* โดยใช้วิธี DPPH assay พบว่าเปลือกผลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีที่สุด รองลงมาคือ ใบบ และเปลือกต้น ตามลำดับ โดยมีค่า  $\text{IC}_{50}$  เท่ากับ 5.9, 9.4, และ 6.4  $\mu\text{g/ml}$  ตามลำดับ

Garcia-Salas และคณะ (2010) ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเปลือกและเนื้อในผล ของ *G. mangostana* โดยใช้วิธี oxygen radical absorbance capacity (ORAC) assay, ABTS<sup>•+</sup> radical scavenging activity และ FRAP assay พบว่ามีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ เท่ากับ 4088, 3591 และ 1222  $\mu\text{mol trolox equivalents/g}$  ตามลำดับ

Tjahjania และคณะ (2014) ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเปลือก ของ *G. mangostana* โดยใช้ตัวทำละลาย 4 ชนิดในการสกัด ได้แก่ เอทานอล เฮกเซน เอทิลอะซิเตท และบิวทานอล โดยใช้วิธี DPPH assay พบว่า สารสกัดด้วยเฮกเซน มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด โดยมีค่า  $\text{IC}_{50}$  เท่ากับ 6.5  $\mu\text{g/ml}$  รองลงมาคือ เอทานอล บิวทานอล และเอทิลอะซิเตท ตามลำดับ และพบว่าในสารสกัดด้วยน้ำมีระดับของ เอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) สูงที่สุด

#### - ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย

มีการศึกษาพบว่า สารสกัดเอทานอลของเปลือกมังคุดที่ความเข้มข้น 0.36% มีฤทธิ์ต้านการยึดเกาะของ *Streptococcus mutans* บนพื้นผิวหลอดจัดฟัน (Putranti *et al.*, 2013) Tatiya-aphiradee และคณะ (2016) ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อ methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ของสารสกัดด้วยเอทานอลและเมทานอลจากเปลือกมังคุด ทั้งในระดับหลอดทดลองและสัตว์ทดลอง พบว่า จากการศึกษาด้วยวิธี broth microdilution assay พบว่าสารสกัดด้วยเอทานอลมีค่า minimum inhibitory concentration (MIC) และ minimum bactericidal concentration (MBC) เท่ากับ 17 และ 30  $\mu\text{g/ml}$  ตามลำดับ ซึ่งดีกว่าสารสกัดด้วยเมทานอลที่มีค่า MIC และ MBC เท่ากับ 20 และ 35  $\mu\text{g/ml}$  ตามลำดับ การทดสอบในระดับสัตว์ทดลองใช้ superficial skin infection model in mice พบว่า 10% ของสารสกัดด้วยเอทานอลสามารถลด

จำนวนเชื้อ MRSA จากแผลติดเชื้อได้มากกว่า 100 colonies ในวันแรกหลังการรักษา และแผลสามารถหายสนิทในวันที่ 9 หลังการรักษา

- ฤทธิ์ต่อการหายของแผล

จากงานวิจัยของ Nganlasom และคณะ (2008) พบว่า สารสกัดด้วยเอทานอลจากเปลือกมังคุดที่ใช้ในการรักษาแผลในหนูที่เหนียวทำให้เกิดเบาหวานมีประสิทธิภาพดีกว่ากลุ่มควบคุมที่ได้รับยาหลอก โดยมี %wound contraction ในวันที่ 4, 6 และ 8 เท่ากับ 53.29, 70.96 และ 80.57% ตามลำดับ ในขณะที่กลุ่มควบคุมได้รับยาหลอกมี %wound contraction ในวันที่ 4, 6 และ 8 เท่ากับ 33.49, 50.00 และ 64.76% ตามลำดับ จากการศึกษาของ Charernsriwilaiwat และคณะ (2013) ได้ศึกษาการใช้ chitosan-based nanofiber mats ที่มีส่วนผสมของ 3% alpha-mangostin ต่อการหายของแผลในหนูปกติ พบว่าในวันที่ 1 และ 4 หลังการรักษา กลุ่มที่ได้รับ 3% alpha-mangostin fiber mats dressing มี % wound closure มากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

ความเป็นพิษ ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งผิวหนัง (human melanoma SK-MEL-28 cell; SK-MEL-28) พบว่า สาร Alpha-mangostin, Beta-mangostin และ 8-deoxygartanine มีค่าความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ได้ 50% (IC<sub>50</sub>) เท่ากับ 5.92, 3.55 และ 3.83 µg/ml ตามลำดับ (Wang *et al.*, 2013)

2. ขมิ้นชัน (*Curcuma longa* L.)

การใช้ทางการแพทย์แผนไทย เหง้า มีรสฝาด หวาน เอียน แก้ไข้เรื้อรัง แก้โรคผิวหนัง แก้เสมหะและโลหิต แก้ท้องร่วง สมานแผล ขับลมภายใน แก้ผื่นคัน หยอดตาแก้ตาบวม ตาแดง น้ำคั้นจากเหง้าสด ทาแก้แผลถลอก แก้โรคผิวหนังผื่นคัน ลดการอักเสบ รักษาแผลในกระเพาะอาหาร

สารสำคัญ สารสำคัญที่พบในขมิ้นชัน ได้แก่ curcumin, ar-turmerone, methycurcumin, demethoxy curcumin, bisdemethoxy curcumin, sodium curcumin (Gupta *et al.*, 2010)

- ฤทธิ์ทางชีวภาพของขมิ้นชัน

curcumin เป็นสารองค์ประกอบหลักที่ตรวจพบในเหง้าขมิ้นชัน มีการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพต่างๆ ของ curcumin ได้แก่ anti-aging, anti-cancer และ wound healing activity (Maheshwari *et al.*, 2006) บทบาทของสาร curcumin มีผลต่อกระบวนการหายของแผลในทุกๆ ระยะทั้ง inflammation, proliferation และ remodeling phase (Akbik *et al.*, 2014) จากรายงานของ Kant และคณะ (2014) ได้ศึกษาฤทธิ์ของ 0.3% curcumin ใน pluronic gel ต่อการหายของแผลในหนูเบาหวานที่เหนียวนำด้วย streptozotocin โดยใช้ excision wound model พบว่า



ในวันที่ 7-19 กลุ่มที่ได้รับการรักษาด้วย curcumin มี %wound contraction มากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม นอกจากนี้ พบว่า กลุ่มที่ได้รับการรักษาด้วย curcumin สามารถลดการแสดงออกของ inflammatory cytokines/enzymes (TNF-alpha, IL-1beta และ MMP-9) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม เพิ่มระดับของ anti-inflammatory cytokine (IL-10) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และเพิ่มระดับของ antioxidant enzymes (superoxide dismutase; SOD, catalase และ glutathione peroxidase; GPx) ซึ่งจากผลการศึกษานี้สามารถบ่งชี้ได้ว่า curcumin มีผลต่อระยะ inflammation ของกระบวนการหายของแผล การตอบสนองต่อการอักเสบในกระบวนการหายของแผลจะเกี่ยวข้องกับการทำงานของ nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF-KB) pathway ซึ่ง NF-KB จะถูกกระตุ้นด้วยการทำงานของเอนไซม์ kinases (AKT, PI3K และ IKK) จากรายงานของ Mohanty และคณะ (2012) ได้ศึกษาผลของ curcumin loaded oleic acid based polymeric (COP) bandage ต่อการหายของแผลในหนูปกติ พบว่าในวันที่ 4, 8 และ 10 หลังการรักษา หนูในกลุ่มที่ได้รับ COP มี %wound area น้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม นอกจากนี้พบว่า COP มีผลลดการแสดงออกของ PI3K และ pAKT protein ในเนื้อเยื่อแผลแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และพบว่าการแสดงออกของ NF-KB mRNA ในเนื้อเยื่อแผลก็ลดลงเช่นกัน ซึ่งจากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า curcumin มีผลต่อการยับยั้ง PI3K/AKT/NF-KB signaling pathway โดยมีผลลดการทำงานของ PI3K และ pAKT kinases ทำให้ลดการกระตุ้นการทำงานของ NF-KB gene ได้ โดยส่งผลกระทบต่อฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบบริเวณแผล นอกจากการออกฤทธิ์ในระยะการอักเสบแล้ว curcumin ยังมีผลออกฤทธิ์ในระยะ proliferation phase จากรายงานของ Kulac และคณะ (2013) ได้ศึกษาผลของการใช้ curcumin ต่อการรักษาแผล (burn wound) ในหนูทดลอง พบว่าในวันที่ 4 หลังการรักษาแผล กลุ่มที่ได้รับการรักษาด้วย curcumin มีการหายของแผลเร็วกว่ากลุ่มควบคุม โดยมีผลต่อการเพิ่มการสะสมของ collagen เพิ่มการสร้างหลอดเลือดใหม่ เพิ่มการสร้างเนื้อเยื่อ granulation และเพิ่มการซ่อมแซมเซลล์เยื่อบุผิวบริเวณแผลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม นอกจากนี้พบว่า ในวันที่ 8 และ 12 หลังการรักษาแผล กลุ่มที่ได้รับการรักษาด้วย curcumin มีระดับของ hydroxyproline เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ( $p < 0.05$ ) Durgaprasad และคณะ (2011) พบว่า หนูทดลองที่ได้รับการรักษาแผลด้วย curcumin มี % wound contraction เท่ากับ  $90.11 \pm 4.83$  % ซึ่งมากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ( $66.64 \pm 2.5\%$ ) และพบว่ากลุ่มที่ได้รับ curcumin สามารถลดระยะเวลาในการสร้างเนื้อเยื่อใหม่ (14 วัน) แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (19 วัน) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องเกี่ยวกับฤทธิ์

ต่อการหายของแผลจากสารสกัดของเหง้าขมิ้นชัน ได้แก่ จากการศึกษาของ Kundu และคณะ (2014) พบว่าเหง้าขมิ้นชัน 15 g ผสมใน petroleum jelly 85 g (gauze impregnated with turmeric paste) สามารถรักษาแผลในกระต่ายได้ดีกว่ากลุ่มควบคุม (pyrogen-free distilledwater-soaked gauze) โดยมี %wound contraction size ในวันที่ 14 เท่ากับ  $5.78 \pm 0.01$  ในขณะที่กลุ่มควบคุม มี %wound contraction size เท่ากับ  $62.71 \pm 0.01$  และจากการศึกษาของ Purohit และคณะ (2013) ได้ทดสอบสารสกัดด้วยเอทานอลจากเหง้าขมิ้นชันต่อการหายของแผล (excision wound model) ในหนูแรท พบว่า พื้นที่หรือขนาดของแผล (wound area) ในกลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากขมิ้นชันขนาดของแผลลดลงมากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยในวันที่ 9 เท่ากับ  $0.09 \pm 0.65 \text{ mm}^2$  จากวันแรก ( $200.55 \pm 1.42 \text{ mm}^2$ ) และแผลหายสนิทในวันที่ 12 แต่ในกลุ่มควบคุมซึ่งใช้ povidone iodine ointment เป็นมาตรฐาน ขนาดของแผลลดลงในวันที่ 9 เท่ากับ  $34.28 \pm 1.24 \text{ mm}^2$  และแผลหายสนิทในวันที่ 15 นอกจากนี้ขมิ้นชันยังมีฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ เช่น ฤทธิ์ต้านไบโอฟิล์ม สาร curcumin ที่ความเข้มข้น 100  $\mu\text{g/ml}$  มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของ *Vibrio harveyi*, *Vibrio parahaemolyticus* และ *Vibrio vulnificus* ซึ่งมีการสร้างไบโอฟิล์มลดลง 69, 56 และ 79% ตามลำดับ (Packiavathy *et al.*, 2013) และมีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างสารเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ 61, 71 และ 62% ตามลำดับ (Packiavathy *et al.*, 2014) สาร curcumin ที่ความเข้มข้น 8  $\mu\text{g/ml}$  มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของ *Helicobacter pylori* น้ำมันหอมระเหยจากขมิ้นที่ความเข้มข้น 0.5-4  $\text{mg/ml}$  มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการยึดเกาะของ *S. mutans* (Lee *et al.*, 2011)

ความเป็นพิษ ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไตของลิง (kidney epithelial cells of monkey; Vero cells), เซลล์รังไข่ของหนูแฮมสเตอร์จีน (chinese hamster ovary; CHO cells), เซลล์มะเร็งตับ (human hepatoma; HepG2) และเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (colon carcinoma; HCT116) พบว่า สารสกัดจากเหง้าขมิ้นชันมีค่า  $\text{IC}_{50}$  เท่ากับ 21.7, 3.21, 46.6 และ 39  $\mu\text{g/ml}$  ตามลำดับ (Ismail *et al.*, 2010)

### 3. หมากรุก (*Areca catechu* L.)

การใช้ทางการแพทย์แผนไทย เมล็ด มีรสฝาด สมานทั้งภายในและภายนอก แก้บิดปวดเบ่ง แก้ปวดแน่นท้อง ฆ่าพยาธิ ขับปัสสาวะ ฝนทาแผลเน่าเปื่อย แก้ปากเปื่อย

สารสำคัญ สารสำคัญที่พบในหมากรุก ได้แก่ isorhamnetin, quercetin, liquiritigenin, 5,7,4'-trihydroxy-3',5'-dimethoxyflavone, catechin, resveratrol, ferulic acid, vanillic acid, 5,8-epidioxiergosta-6,22-dien-3 beta-ol, stigmasta-4-en-3-one, beta-sitosterol, cycloartenol และ de-O-methylsiodiplodin (Jaiswal *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2012)

ฤทธิ์ทางชีวภาพของหมาก

- ฤทธิ์ต้านการอักเสบ

จากรายงานของ Huang และคณะ (2010) ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดด้วยอะซีโตนจากเมล็ดของ *A. catechu* ซึ่งมีสาร catechins เป็นองค์ประกอบหลัก โดยใช้ 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-treated human oral cancer SAS cells พบว่าสามารถยับยั้งการทำงานของ TPA ต่อการเหนี่ยวนำ COX-2 ได้ที่ความเข้มข้น 0.1-1  $\mu\text{g/ml}$  โดยผ่านกระบวนการยับยั้งการแสดงออกของยีน ERK นอกจากนี้ได้ศึกษาในระดับสัตว์ทดลองพบว่า การทดสอบโดยให้หนูทดลองกินสารสกัดด้วยอะซีโตนจากเมล็ดของ *A. catechu* ขนาด 1 และ 10  $\text{mg/kg/day}$  เป็นเวลา 5 วัน สามารถยับยั้งการบวมเนื่องจากการเหนี่ยวนำด้วย carrageenan และลดปริมาณของ  $\text{PGE}_2$  ได้ จากรายงานของ Bhandare และคณะ (2010) ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดด้วย hydroalcoholic จากเมล็ดของ *A. catechu* ในระดับสัตว์ทดลองโดยใช้ carrageenan-induced rat paw edema model พบว่าหลังจากการเหนี่ยวนำด้วย carrageenan 1 และ 3 ชั่วโมง สารสกัดด้วย hydroalcoholic จากเมล็ดของ *A. catechu* ขนาด 250, 500 และ 1000  $\text{mg/kg}$  สามารถยับยั้งการบวมได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม Khan และคณะ (2011) ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบของ aqueous fraction จากเมล็ดของ *A. catechu* โดยใช้วิธี carrageenan-induced rat paw edema model พบว่า ที่ขนาด 100  $\text{mg/kg}$  สามารถต้านการอักเสบได้แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับควบคุม นอกจากนี้ มีการใช้วิธี  $\text{PGE}_2$ -induced rat paw edema model และ arachidonic acid-induced rat paw edema model พบว่าหลังจากการเหนี่ยวนำด้วย  $\text{PGE}_2$  และ arachidonic acid ที่เวลา 1, 2, 3 และ 4 ชั่วโมง aqueous fraction ขนาด 100  $\text{mg/kg}$  สามารถยับยั้งการบวมของอุ้งเท้าหนูได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม จากงานวิจัยนี้สามารถอธิบายได้ว่าฤทธิ์ต้านการอักเสบของ *A. catechu* เป็นผลมาจากการยับยั้งการแสดงออกของ  $\text{PGE}_2$  และ arachidonic acid

- ฤทธิ์ต่อการหายของแผล

จากการศึกษาของ Verma และคณะ (2012) ใช้สารสกัดด้วยเอทานอลจากเมล็ดหมากต่อการรักษาแผล (burn wound model) ในหนูแรท พบว่าหนูกลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากเมล็ดหมากมีการหายของแผลที่ดีกว่ากลุ่มควบคุม โดยมี %wound contraction ในวันที่ 15 เท่ากับ  $94.76 \pm 2.52\%$  ในขณะที่กลุ่มควบคุมซึ่งได้รับยาหลอก มี %wound contraction ในวันที่ 15 เท่ากับ  $58.55 \pm 1.18\%$

- ฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ

จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า สารสกัดจากเมล็ดหมากที่ความเข้มข้น 16.67  $\mu\text{g/ml}$  มี

ฤทธิ์ยับยั้งระบบ quorum-sensing ของ *P. aeruginosa* (Koh and Tham, 2011) Khan และคณะ (2011) พบว่า สารสกัดด้วยเมทานอล และ aqueous fraction จากเมล็ดของ *A. catechu* มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH โดยมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 5.34 และ 7.28  $\mu\text{g/ml}$  ตามลำดับ

ความเป็นพิษ การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม (human MCF-7 breast carcinoma cell; MCF-7 cells) พบว่า สารสกัดเมทานอลจากผลหมากมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 775.1  $\mu\text{g/ml}$  (Anajwala *et al.*, 2010)

#### 4. ข้าวสาร (*Oryza sativa* L.)

การใช้ทางการแพทย์แผนไทย ข้าวสาร รสมันหอมหวาน บำรุงร่างกาย แก้กตาฟาง แก้เหน็บชา แขน้ำดำเป็นแฉง แก้บวม แก้ปวด ตำผสมกับน้ำสุราแก้ลมพิษผื่นคัน

สารสำคัญที่พบในข้าว ได้แก่ arginine, alpha-tocopherol, gamma-oryzanol, phytic acid, lysophosphatidylcholine และ phosphatidylcholine (Chung *et al.*, 2005; Henderson *et al.*, 2012)

ฤทธิ์ทางชีวภาพของข้าวสาร

- ฤทธิ์ต้านการอักเสบ

จากการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Shalini และคณะ (2011) ได้ศึกษาสารสกัดด้วยเมทานอลจาก *Oryza sativa* L. พบว่ามีฤทธิ์ต้านการอักเสบ ซึ่งสามารถยับยั้งการบวมบริเวณอุ้งเท้าหนูได้ โดยใช้วิธี carrageenan-induced rat paw edema และจากการศึกษาของ Kitisin และคณะ (2015) ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดจากข้าวสายพันธุ์ต่างๆ ได้แก่ ข้าวสังข์หยด ข้าวเหนียวดำ และข้าวหอมนิล โดยการทดสอบฤทธิ์ยับยั้ง pro-inflammatory cytokines (IL-6, TNF-alpha and NF-keppaB) ซึ่งทดสอบด้วยวิธี ELISA technique จากการเหนี่ยวนำด้วย lipopolysaccharide ใน human promyelocytic leukemia (HL-60) cell พบว่าสารสกัดจากข้าวสังข์หยดสามารถยับยั้ง TNF-alpha และ NF-kB ได้ดี และยังสามารถยับยั้งการสร้าง NO ได้อีกด้วย

ความเป็นพิษ ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปอด (COR-L23) และเซลล์เนื้อเยื่อมนุษย์ (MRC5) พบว่า สารสกัดคลอโรฟอร์มจากข้าวมีค่า  $IC_{50}$  มากกว่า 100  $\mu\text{g/ml}$  (Uttama and Ittharat, 2010)

##### 4.5.2 การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของยาสมานแผล

Chusri และคณะ (2012) ได้ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดด้วยเอทานอลจากตำรับยาสมานแผลต่อฤทธิ์ยับยั้งการสร้างและการทำลายไบโอฟิล์ม ที่สร้างจากเชื้อ *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 พบว่าที่ความเข้มข้น 0.63-5.00  $\mu\text{g/ml}$  สามารถลดการสร้างไบโอฟิล์มได้ประมาณ 30-40% และที่ความเข้มข้น 10 และ 20  $\mu\text{g/ml}$  สามารถทำลาย 7-day-

old staphylococcal biofilm ได้ 90%

Chusri และคณะ (2013a) ได้ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดด้วยเอทานอลจากตำรับยาสมานแผลต่อการยับยั้งและการทำลายไบโอฟิล์ม ที่สร้างจากเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคที่ทำให้เกิดการบาดเจ็บของเนื้อเยื่อ และเป็นสาเหตุของการเกิดแผลบริเวณเท้าของผู้ป่วยเบาหวาน โดยใช้วิธี crystal violet assay พบว่าสารสกัดด้วยเอทานอลจากยาสมานแผลที่ความเข้มข้น 62.5-1000 µg/ml สามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มจากเชื้อ *P. aeruginosa* ATCC 10145 ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้พบว่าสารสกัดด้วยเอทานอลจากยาสมานแผลที่ความเข้มข้น 62.5 µg/ml สามารถทำลายไบโอฟิล์ม (old biofilm) ที่สร้างจากเชื้อ *P. aeruginosa* ATCC 10145 ได้ 97.3% หลังการให้สารทดสอบเป็นเวลา 24 ชม.

Chusri และคณะ (2013b) ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดด้วยเอทานอลจากตำรับยาสมานแผล พบว่าสามารถยับยั้งการสร้าง NO ซึ่งเป็นสารสื่อกลางของการอักเสบ จาก macrophages RAW 264.7 cells ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย lipopolysaccharide ได้ โดยมีค่า IC<sub>50</sub> เท่ากับ 71.06 µg/ml และจากผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ พบว่าสามารถต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ hydroxyl radical ได้ดี โดยมีค่า IC<sub>50</sub> เท่ากับ 19.24 และ 13.58 µg/ml ตามลำดับ

Chusri และคณะ (2014) ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดด้วยเอทานอลจากตำรับยาสมานแผล พบว่า มีค่า MIC ต่อเชื้อ methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) และ methicillin-susceptible *S. aureus* (MSSA) อยู่ในช่วง 3.9-7.8 µg/ml

Chokpaisarn และคณะ (2019) ได้ศึกษาผลของยาสมานแผลในรูปแบบน้ำมันต่อฤทธิ์ต้านไบโอฟิล์มที่สร้างจากเชื้อ *P. aeruginosa* ATCC 10145 พบว่า ยาน้ำมันสมานแผลสามารถยับยั้งและทำลายสร้างไบโอฟิล์มได้อย่างมีนัยสำคัญหลังการทดสอบด้วยยาสมานแผลเป็นเวลา 3 ชั่วโมง

นอกจากนี้ ทางผู้วิจัยได้ศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบและฤทธิ์ต่อการหายของแผลในระดับสัตว์ทดลอง (preliminary study) จากการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบของน้ำมันสมานแผลโดยใช้วิธี EPP-induced rat ear edema พบว่า น้ำมันสมานแผลที่ความเข้มข้น 4.2 และ 8.4% w/v มีแนวโน้มยับยั้งการอักเสบได้หลังจากการเหนี่ยวนำด้วย EPP ที่เวลา 30 นาที 1 และ 2 ชั่วโมง และจากการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบของขี้ผึ้งสมานแผลโดยใช้วิธี carrageenan-induced rat paw edema พบว่า ยาขี้ผึ้งสมานแผลที่ความเข้มข้น 4.2 และ 8.4% มีแนวโน้มยับยั้งการอักเสบได้หลังจากการเหนี่ยวนำด้วย carrageenan ที่เวลา 1, 2 และ 3 ชั่วโมง และจากการศึกษาฤทธิ์ของยาขี้ผึ้งสมานแผลที่ความเข้มข้น 4.2% ต่อการหายของแผลในหนูเบาหวาน (GK/Jcl) โดยใช้วิธี excision wound model พบว่ายาขี้ผึ้งสมานแผลที่ความเข้มข้น 4.2% มีแนวโน้มส่งเสริมให้การหายของแผลเร็วกว่ากลุ่มควบคุม โดยในวันที่ 5 หลังการเกิดแผล กลุ่มที่ได้รับยาขี้ผึ้งมี

%wound contraction มากกว่า 90% และแผลหายสนิทในวันที่ 13 แต่ในกลุ่มควบคุมมี %wound contraction เพียง 74% และแผลไม่หายในวันที่ 13

มีรายงานการศึกษาก่อนหน้านี้ซึ่งได้ทดสอบความคงตัวของสารสำคัญในยาสมานแผลรูปแบบยาเตรียมแผ่นปิดแผลโดยใช้สภาวะเร่ง (freeze/thaw cycles) มีการทดสอบจำนวน 5 รอบ พบว่ายาสมานแผลในรูปแบบยาเตรียมแผ่นปิดแผลก่อนผ่านสภาวะเร่งมีปริมาณของ alpha-mangostin และ cucumin เท่ากับ 0.36 และ 0.49 mg/g ตามลำดับ และหลังจากการผ่านสภาวะเร่งยาสมานแผลในรูปแบบยาเตรียมแผ่นปิดแผลมีปริมาณของ alpha-mangostin คงที่ ในขณะที่ปริมาณของ curcumin ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับค่าเริ่มต้น

ตารางที่ 5 The biological activities involved wound healing of herbal components in Ya-Samarn-Phlae.

Herbal components	Wound healing activity <sup>A</sup>	Other biological activities involved wound healing <sup>B</sup>
<i>Garcinia mangostana</i> (pericarp)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Enhancing wound contraction, shortened epithelialization period and increased tensile strength</li> <li>- Increasing wound contraction rate</li> <li>- Increasing thickness and density of collagen</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Anti-oxidant effect in DPPH assay</li> <li>- Anti-oxidant effect in DPPH assay and NBT reduction assay</li> <li>- Anti-microbial activity against <i>S. epidermidis</i> and <i>S. aureus</i></li> <li>- Anti-biofilm development activity of <i>P. aeruginosa</i></li> <li>- Anti-inflammatory effect in rat models. Decrease of paw swelling by carrageenan injection</li> <li>- Anti-inflammatory effect by inhibition of inducible NO PGE<sub>2</sub> and COX-2 synthase</li> </ul>

<sup>A</sup>Information was obtained from Nganlasom *et al.*, 2008 ; Nainwal *et al.*, 2010; Fitri *et al.*, 2016; Sugihartini and Wiradhika, 2017

<sup>B</sup>Information was obtained from Puripattavong *et al.*, 2006; Chomnawang *et al.*, 2007; Yincharoen, 2014; Kumar *et al.*, 2015; Chusri *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2016

ตารางที่ 5 (Continued)

Herbal components	Wound healing activity <sup>A</sup>	Other biological activities involved wound healing <sup>B</sup>
<i>Curcuma longa</i> (rhizome)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Enhancing fibroblast migration, granulation tissue formation, collagen deposition, and in general re-epithelization</li> <li>- Increasing the amount of type III collagen relative to type I</li> <li>- Increasing biosynthesis of extracellular matrix (ECM)</li> <li>- Improving wound contraction by increasing the production of TGF-beta and therefore increasing fibroblast proliferation</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Anti-oxidant effect: reduces oxidative stress by reacting with free radicals or reactive oxygen species (ROS) and acts as a free-radical scavenger</li> <li>- Anti-microbial activity against <i>S. epidermidis</i> and <i>S. aureus</i></li> <li>- Anti-biofilm formation activity by <i>P. aeruginosa</i> and inhibition of quorum sensing (QS) genes</li> <li>- Anti-inflammatory effect by inhibiting the activity of NK-(kappa)B transcription factor, reducing the production of TNF-alpha and IL-1 cytokines</li> </ul>

<sup>A</sup>Information was obtained from Akbik *et al.*, 2014; Mohanty and Sahoo, 2017

<sup>B</sup>Information was obtained from Akbik *et al.*, 2014; Moghadamtousi *et al.*, 2014; Afrose *et al.*, 2015; Gupta *et al.*, 2015; Chusri *et al.*, 2016; Mohanty and Sahoo, 2017



ตารางที่ 5 (Continued)

Herbal components	Wound healing activity <sup>A</sup>	Other biological activities involved wound healing <sup>B</sup>
<i>Areca catechu</i> (seed)	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Improving wound contraction by activation p-Smad2 involves up-regulation and activation of TGF-beta</li> <li>- Enhancing accumulation of dense bundles collagen fibers</li> <li>- Increasing the expression of VEGF in wound area</li> <li>- Enhancing the tensile strength of granulation tissue</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Anti-oxidant effect toward DPPH radicals, hydroxyl radicals, iron (II) chelating and lipooxygenase</li> <li>- Anti-microbial activity against <i>S. epidermidis</i> and <i>S. aureus</i></li> <li>- Anti-inflammatory effect by inhibition the carrageenan induced inflammatory edema, PGE<sub>2</sub> levels and inducible NO synthase</li> <li>- Anti-inflammatory effect by regulates COX-2 expression</li> </ul>

<sup>A</sup>Information was obtained from Khan *et al.*, 2011; Verma *et al.*, 2012; Maria *et al.*, 2016; Sekar *et al.*, 2016

<sup>B</sup>Information was obtained from Ahn *et al.*, 2009; Bhandare *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2010; Khan *et al.*, 2011; Chusri *et al.*, 2016

ตารางที่ 5 (Continued)

Herbal components	Wound healing activity <sup>A</sup>	Other biological activities involved wound healing <sup>B</sup>
<i>Oryza sativa</i> (seed)	- Promoting cellular growth by upregulation of IGF-1	- Anti-oxidant effect by DPPH radical scavenging, ferrous reducing power and lipid peroxidation inhibition - Anti-microbial activity against <i>S. aureus</i> - Anti-inflammatory effect by inhibition of pro- inflammatory cytokines (IL-6, TNF-alpha, and NF-kB), NO production, MMP-2 and MMP-9 activities

<sup>A</sup>Information was obtained from Oh *et al.*, 2016

<sup>B</sup>Information was obtained from Pumirat and Luplertlop, 2013; Kitisin *et al.*, 2015

## 6. การพัฒนาสัตว์ทดลองที่ใช้เป็นโมเดลการศึกษาโรคเบาหวาน

โรคเบาหวาน (Diabetes mellitus) เกิดจากความผิดปกติของร่างกายที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมแทบอลิซึม โดยมีสาเหตุมาจากความผิดปกติหรือถูกทำลายของเซลล์ตับอ่อนซึ่งทำหน้าที่สร้างอินซูลิน (insulin) ในการควบคุมระดับน้ำตาลในเลือด โดยปกติน้ำตาลที่เข้าสู่เซลล์ร่างกายเพื่อใช้เป็นพลังงานภายใต้การควบคุมของอินซูลิน หากเกิดความผิดปกติ จะส่งผลให้ร่างกายหลังอินซูลินได้น้อยหรือหยุดการหลั่งอินซูลิน หรืออาจเกิดจากอินซูลินที่หลั่งออกมาไม่สามารถทำงานได้ตามปกติ เนื่องจากภาวะดื้อต่ออินซูลิน ทำให้มีระดับน้ำตาลในเลือดสูง (hyperglycemia) และหากเกิดความผิดปกติขึ้นในระยะยาวจะทำให้เกิดภาวะแทรกซ้อนต่าง ๆ เช่น ภาวะการมองเห็นที่แย่ง การเกิดความผิดปกติในกระบวนการหายของแผล ก่อให้เกิดแผลเรื้อรัง โรคในระบบหลอดเลือดและสมอง และภาวะไตวาย โรคเบาหวานมีการจำแนกประเภทต่าง ๆ ไว้หลายชนิด แต่ชนิดที่พบได้บ่อยคือ type 1 และ type 2 diabetes (King, 2012)

- โรคเบาหวานชนิดที่ 1 (type 1 diabetes, insulin dependent diabetes mellitus หรือ IDDM) เป็นชนิดที่พบได้น้อย สาเหตุเกิดจากภูมิคุ้มกันของร่างกายมีการทำลาย beta-cell ซึ่งเป็นเซลล์สร้างอินซูลินในตับอ่อน หรืออาจจะเรียกว่า โรคต้านภูมิตัวเอง (autoimmune) ผู้ป่วยจำเป็นต้องได้รับการรักษาโดยการฉีดอินซูลินเพื่อควบคุมระดับน้ำตาลในเลือด เนื่องจากอาจเกิดภาวะน้ำตาลในเลือดสูงเกินไปหรืออาจจะเกิดภาวะเลือดเป็นกรดจากสารคีโตน (ketoacidosis) ทำให้หมดสติและเสียชีวิต มักพบในผู้ที่มีอายุน้อย และมีรูปร่างผอม (Belle *et al.*, 2011)

- โรคเบาหวานชนิดที่ 2 (type 2 diabetes, non-insulin dependent diabetes mellitus หรือ NIDDM) เป็นชนิดที่พบบ่อย ซึ่งผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดนี้ร่างกายยังคงมีการสร้างและหลั่งอินซูลิน แต่อินซูลินที่หลั่งออกมาไม่สามารถทำงานได้ตามปกติ หรือเกิดภาวะดื้ออินซูลิน (insulin resistance) ซึ่งสามารถรักษาโดยการควบคุมอาหารหรือรับประทานยาร่วมด้วย มักพบในผู้สูงอายุ ผู้ที่มีน้ำหนักตัวมาก หรือขาดการออกกำลังกาย โดยเฉพาะผู้ที่มีประวัติบุคคลในครอบครัวป่วยด้วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ร่วมด้วย (Kahn *et al.*, 2014)

ในปัจจุบันโรคเบาหวาน เป็นโรคที่ส่งผลกระทบต่อคุณภาพชีวิต เศรษฐกิจ และสังคม และมีแนวโน้มของจำนวนผู้ป่วยที่เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วทั่วโลก จึงมีการมุ่งพัฒนายาใหม่เพื่อรักษาเบาหวานอย่างต่อเนื่อง ขั้นตอนที่สำคัญในการพัฒนายา คือ การศึกษากลไกการออกฤทธิ์และความเป็นพิษของยาในสัตว์ทดลองเพื่อประเมินความปลอดภัยก่อนการทดสอบต่อไปในมนุษย์ ดังนั้นการใช้สัตว์ทดลองเพื่อเป็นโมเดลศึกษารักษาโรคเบาหวานหรือภาวะแทรกซ้อนต่าง ๆ ที่เกิดจากโรคเบาหวาน จึงถูกคิดค้นและพัฒนาขึ้นอย่างต่อเนื่องในปัจจุบัน ได้แก่ การใช้สารเคมี เช่น streptozotocin และ alloxan เพื่อชักนำให้เกิดภาวะเบาหวานชนิดที่ 1 ส่วนการชักนำให้เกิดภาวะเบาหวานชนิดที่ 2 อาจจะใช้วิธีการให้อาหารที่มีส่วนประกอบของไขมันในปริมาณสูง เพื่อชักนำให้หนูเกิดภาวะอ้วน และภาวะดื้ออินซูลิน

นอกจากวิธีการที่กล่าวมาข้างต้นแล้ว ยังมีการพัฒนาวิธีต่างๆ เพื่อชักนำภาวะเบาหวานให้ใกล้เคียงกับที่เกิดขึ้นในมนุษย์ ได้แก่ การพัฒนาพันธุกรรมหนูทดลองเป็นสายพันธุ์ที่มีภาวะเบาหวาน เป็นต้น (Jarukamjorn *et al.*, 2011)

### การใช้สัตว์ทดลองในการศึกษาโรคเบาหวาน

รายงานผลการศึกษาภาวะของโรคเบาหวานในสัตว์ทดลองที่มีการศึกษาและรายงานไว้ นิยมใช้หนูเป็นโมเดลในการทดลอง ซึ่งสามารถแบ่งออกได้เป็น โมเดลหนูทดลองโรคเบาหวานชนิดที่ 1 ซึ่งมีทั้งโมเดลแบบ การใช้สารเคมีชักนำให้เกิดภาวะเบาหวาน (chemically induced type 1 diabetes) และการพัฒนาพันธุกรรมให้เป็นหนูสายพันธุ์ที่มีภาวะเบาหวาน (spontaneous autoimmune models of type 1 diabetes) ในส่วนของโมเดลหนูทดลองโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ได้แก่ spontaneous type 2 diabetic model (obese และ non-obese model) และการให้อาหารที่มีส่วนประกอบของไขมันในปริมาณสูง (high fat feeding) เพื่อให้หนูอ้วนและเกิดภาวะดื้อต่ออินซูลิน (King, 2012)

### โมเดลหนูทดลองโรคเบาหวานชนิดที่ 1

ลักษณะสำคัญของโรคเบาหวานชนิดที่ 1 คือ ภูมิคุ้มกันของร่างกายมีการทำลาย beta-cell ซึ่งเป็นเซลล์สร้างอินซูลินในตับอ่อน หรืออาจจะเรียกว่า โรคต้านภูมิตัวเอง (autoimmune) ทำให้มีความบกพร่องของการสร้างอินซูลิน ในโมเดลหนูทดลองนิยมใช้หนู spontaneous autoimmune models of type 1 diabetes จำนวน 2 สายพันธุ์ ได้แก่ non-obese diabetic (NOD) mice และ Biobreeding (BB) rat (Yang and Santamaria, 2006) โดย BB rat ถูกพัฒนามาจากการผสมพันธุ์แบบต่างสายเลือด (outbred rat) ในหนู Wistar rat และ NOD mice ถูกพัฒนามาจากการผสมพันธุ์แบบสายเลือดเดียวกัน (inbred rat) ของหนูสายพันธุ์ Cataract Shionogi (CTS) mice ซึ่งทั้ง 2 สายพันธุ์จะมีลักษณะที่คล้ายกัน คือ จะพบการแสดงออกของภาวะปัสสาวะมาก (polyuria), มีน้ำตาลกลูโคสในปัสสาวะ (glycosuria) น้ำหนักน้อย พบการแทรกซึมของเม็ดเลือดขาวชนิด lymphocyte บริเวณ islets of Langerhans ของตับอ่อน beta-cell ถูกทำลายส่งผลให้ไม่สามารถสร้างอินซูลินได้ หนูทดลองจึงมีความจำเป็นที่จะต้องได้รับอินซูลินอย่างต่อเนื่องในการดำรงชีวิต เช่นเดียวกับโรคเบาหวานชนิดที่ 1 ในคน (Pearson *et al.*, 2015) นอกจากการใช้ spontaneous autoimmune models of type 1 diabetes ยังมีการใช้สารเคมีชักนำให้เกิดภาวะเบาหวาน (chemically induced type 1 diabetes) ได้อีกด้วย โดยสารเคมีที่นิยมใช้มี 2 ชนิด คือ streptozotocin และ alloxan (King, 2012)

การใช้ streptozotocin (STZ) ชักนำภาวะเบาหวานในหนูทดลอง STZ เป็นสารประกอบ glucosamine-nitrosourea จากธรรมชาติ กลไกของ STZ ที่สามารถชักนำให้เกิดเบาหวาน เกี่ยวข้องกับการเกิดอนุมูลอิสระ เช่น superoxide, hydrogen peroxide และ NO เป็นต้น สาร

STZ มีกลไกการเข้าสู่เซลล์เช่นเดียวกับการนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์ โดยมีโปรตีนตัวรับชื่อ Glucose transporter 2 (GLUT2) เป็นตัวนำพาเข้าสู่เซลล์ และเมื่อ STZ เข้าสู่เซลล์ของตับอ่อนจะชักนำให้เกิดปฏิกิริยา alkylation ส่งผลให้เกิดการทำลาย beta-cell ดังนั้น STZ จึงสามารถชักนำให้เกิดภาวะเบาหวานชนิดที่ 1 ได้ (Wu and Yan, 2015) ซึ่งขนาดของสารที่ใช้ในการชักนำขึ้นอยู่กับความแตกต่างในแต่ละสายพันธุ์ของหนูทดลอง จากการศึกษาก่อนหน้านี้ พบว่าขนาดของสาร STZ ที่ใช้ในการชักนำให้เกิดเบาหวานชนิดที่ 1 ในหนูแรท คือ 25-100 mg/kg (intravenous; iv) ในขณะที่หนูเมาส์ต้องใช้ในปริมาณที่สูงกว่า (Abeeleh *et al.*, 2009) Arora และคณะ (2009) พบว่า STZ ขนาด 180 mg/kg (intraperitoneal; ip) สามารถชักนำให้หนูเมาส์ (Swiss abino mice) เกิดภาวะเบาหวานชนิดที่ 1 ได้ แต่จากการศึกษาพบว่าการชักนำภาวะเบาหวานด้วย STZ ขนาด 180 mg/kg (ip) เพียงครั้งเดียว ทำให้หนูทดลองตาย 2 ใน 8 ตัว ดังนั้น การชักนำให้หนูเกิดภาวะเบาหวานเพื่อศึกษาโรคแทรกซ้อนจากเบาหวานในระยะยาว อาจใช้ STZ ปริมาณต่ำในการชักนำให้เกิดโรคเบาหวาน

การใช้ alloxan ชักนำภาวะเบาหวานในหนูทดลอง alloxan เป็นอนุพันธ์ของไพริมิดีน (pyrimidine derivative) มีกลไกเข้าสู่เซลล์โดย GLUT2 และมีผลทำลาย beta-cell เช่นเดียวกับ STZ และยังมีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ glucokinase ในร่างกายจึงสามารถชักนำให้เกิดภาวะเบาหวานชนิดที่ 1 ได้ ซึ่งขนาดของ alloxan ที่ใช้ในการชักนำภาวะเบาหวานในหนูทดลอง มีความแตกต่างกัน จากการศึกษาก่อนหน้านี้ พบว่าการฉีด alloxan ขนาด 150 mg/kg (ip) ในหนู Swiss albino mice เพียงครั้งเดียว สามารถชักนำให้หนูเกิดภาวะเบาหวานชนิดที่ 1 ได้ โดยมีระดับน้ำตาลในเลือดเท่ากับ 300-350 mg/dl (Belhekar *et al.*, 2013) จากรายงานของ Feshani และคณะ (2011) มีการใช้ alloxan ขนาด 100 mg/kg (subcutaneous; sc) ในหนู Wistar rats เพียงครั้งเดียว สามารถชักนำให้หนูเกิดภาวะเบาหวานชนิดที่ 1 ได้ โดยมีระดับน้ำตาลในเลือดมากกว่า 250 mg/dl

## โมเดลหนูทดลองโรคเบาหวานชนิดที่ 2

1. การใช้โมเดลที่มีการพัฒนาพันธุกรรมให้เป็นหนูสายพันธุ์ที่มีภาวะเบาหวานชนิดที่ 2 (spontaneous type 2 diabetic model)

### 1.1 Obese (ob) models of type 2 diabetes

- Lep<sup>ob/ob</sup> mice เป็นหนูที่เกิดจากการกลายพันธุ์ของ leptin (*Lep*) gene ที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติซึ่งได้รับการผสมพันธุ์จากหนู C57BL/6 mice โดยมีความบกพร่องของ leptin ที่สร้างมาจาก *ob* gene ซึ่งเป็นโปรตีนทำหน้าที่ส่งสัญญาณจากเซลล์ไขมันไปยัง hypothalamus เพื่อลดความอยากอาหาร (Ahima *et al.*, 1996) ส่งผลให้หนูกินอาหารในปริมาณมาก เกิดภาวะอ้วนรุนแรง เกิดภาวะดื้อต่ออินซูลิน (insulin resistance) ทำให้มีระดับน้ำตาลในเลือดสูงขึ้นเมื่อมีอายุ 4 สัปดาห์ และจะมีความเข้มข้นของระดับน้ำตาลในเลือดสูงสุดในช่วง 4-5 เดือน (Lindstrom, 2007)

- Lepr<sup>db/db</sup> mice เป็นหนูที่เกิดจากการกลายพันธุ์ของ leptin receptor (*Lepr*) gene ที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติซึ่งได้รับการผสมพันธุ์จากหนู C57BL/KsJ mice โดยมีความบกพร่องของ leptin receptor ซึ่งทำหน้าที่จับกับ leptin ที่บริเวณ arcuate nucleus of the hypothalamus (ARC) ซึ่งเป็นตำแหน่งของเซลล์ประสาทที่เพิ่มความอยากอาหาร (orexigenic neuron) และเซลล์ประสาทที่ลดความอยากอาหาร (anorexigenic neuron) ซึ่ง leptin เมื่อจับกับ leptin receptor จะเพิ่มการทำงานของ anorexigenic neuron และยับยั้งการทำงานของ orexigenic neuron ทำให้ลดความอยากอาหาร และกินอาหารได้น้อยลง เมื่อเกิดความบกพร่องของ leptin receptor จะทำให้ leptin ไม่สามารถออกฤทธิ์ได้ จึงทำให้หนูเพิ่มความอยากอาหาร เกิดภาวะอ้วนรุนแรง ทำให้มีระดับน้ำตาลในเลือดสูงขึ้นเมื่อมีอายุ 2 สัปดาห์ และจะมีความเข้มข้นของระดับน้ำตาลในเลือดสูงสุดในช่วง 3-4 เดือน (Srinivasan and Ramarao, 2007)

- Zucker fatty rats (ZFR) หนูทดลองสายพันธุ์ ZFR เกิดจากการกลายพันธุ์ของ leptin receptor (*Lepr*) gene หลังจากการผสมพันธุ์ระหว่าง Merck M-strain กับ Sherman rats ส่งผลให้เกิดการเหนี่ยวนำให้หนูมีภาวะกินอาหารเยอะ และเกิดความอ้วน ในช่วงอายุ 4 สัปดาห์ มีระดับอินซูลินในเลือดสูง และมีลักษณะของภาวะแทรกซ้อนของโรคเบาหวาน คือ มีระดับไขมันในเลือดสูง และมีความดันโลหิตสูงร่วมด้วย นอกจากนี้ยังพบว่าเกิดความบกพร่องของ glucose tolerance (Srinivasan and Ramarao, 2007) และเมื่อเกิดการผสมพันธุ์ระหว่างสายเลือดเดียวกันของ ZFR นั้น จะก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ หนูทดลองมีการแสดงออกของภาวะที่มีอินซูลินในเลือดสูง เรียกสายพันธุ์นี้ว่า Zucker diabetic fatty rats (ZDF) ซึ่งสายพันธุ์นี้จะมีน้ำหนักตัวน้อยกว่า ZFR แต่มีความรุนแรงของภาวะดื้อต่ออินซูลินมากกว่า และเกิดการ apoptosis ของ beta-cell สูง (Pick *et al.*, 1998)

## 1.2 Nonobese models of type 2 diabetes

- Goto-Kakizaki (GK) rat คือ หนูทดลองประเภท polygenic model of type 2 diabetes ซึ่งได้รับการพัฒนาสายพันธุ์ให้เป็นโมเดลหนูเบาหวานชนิดที่ 2 แบบไม่อ้วน ในปี 1973 นักวิจัยชื่อว่า Goto และ Kakizaki จาก Tohoku university ประเทศญี่ปุ่น ได้เริ่มศึกษาโดยการนำหนูทดลองสายพันธุ์ Wistar rat มาทดสอบ glucose tolerance test (GTT) โดยก่อนการทดสอบวัดค่าระดับน้ำตาลในเลือดเริ่มต้นของหนูทุกตัว และป้อนสารละลายกลูโคส ขนาด 2 g/kg ให้กับหนูทดลอง หลังจากนั้นวัดระดับน้ำตาลในเลือดหลังจากป้อนสารละลายกลูโคส ที่เวลา 30, 60, 90 และ 120 นาที เพื่อคัดเลือกหนูที่มีภาวะทนต่อน้ำตาลกลูโคส (glucose tolerance) หรือหนูที่มีระดับน้ำตาลในเลือดมากกว่าหรือเท่ากับ 200 mg/dl ที่เวลา 120 นาที หลังการป้อนกลูโคส มาผสมพันธุ์กัน และนำรุ่นลูกที่ได้จากการผสมพันธุ์กันนั้น มาทดสอบ GTT ซ้ำเช่นเดิม และเลือกหนูที่มีภาวะทนต่อน้ำตาลกลูโคส มาผสมพันธุ์ต่อแบบ repetitive breeding ในสายเลือดเดียวกัน จำนวนหลายรุ่น ซึ่งหลังจากการผสมพันธุ์นั้นก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ โดยพบว่า หนูทดลองมีระดับน้ำตาลในเลือดสูงขณะอดอาหาร (fasting hyperglycaemia) ซึ่งสูงกว่าหนูปกติประมาณ 50-55% และเกิดขึ้นเองโดยธรรมชาติ ซึ่งผลการศึกษานี้สามารถอธิบายโดยทฤษฎีของ polygenic traits ได้ดีกว่า special diabetes gene (Goto *et al.*, 1975; Goto and Kakizaki, 1981) โดยในหนู GK rat มีตำแหน่งของ quantitative trait loci (QTL) บน chromosome 2, 4, 5, 8, 10 และ 17 ที่สามารถควบคุมลักษณะของการแสดงออกของความทนต่อน้ำตาลกลูโคสตั้งแต่กำเนิดซึ่งได้รับการถ่ายทอดทางพันธุกรรมจากรุ่นสู่รุ่น ทำให้ หนู GK rat มีลักษณะใกล้เคียงคนที่เป็นโรคเบาหวานชนิดที่ 2 โดยลักษณะทั่วไปที่พบในหนู GK rat และผู้ป่วยโรคเบาหวานแสดงดังตารางที่ 6 และจากรายงานพบว่า หนู GK rat มีน้ำหนักตัวต่ำกว่าหนูปกติประมาณ 10-30% ทำให้หนูไม่มีสภาวะอ้วน มีระดับอินซูลินในเลือดต่ำ (hypoinsulinaemia) มีการสร้างน้ำตาลกลูโคสจากตับเพิ่มมากขึ้น ลดการสังเคราะห์ glycogen จากกลูโคส ลดการดูดซึมกลูโคสไปใช้ในกล้ามเนื้อลายและเนื้อเยื่อไขมัน มีความบกพร่องของความทนต่อกลูโคสและพบภาวะแทรกซ้อนของโรคเบาหวานได้ตั้งแต่อายุ 2 สัปดาห์แรก (Ostenson and Efendic, 2007) นอกจากนี้พบว่าความบกพร่องของน้ำตาลกลูโคสต่อการกระตุ้นการหลั่งอินซูลินจาก beta-cell นั้นมีสาเหตุมาจากการทำหน้าที่ที่ผิดปกติของ ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel และ L-type Ca<sup>2+</sup> channel (Tsuura *et al.*, 1993) และหลังจาก 8 สัปดาห์ จะพบภาวะน้ำตาลในเลือดสูงแบบคงที่ และต่อเนื่องเป็นระยะเวลานาน (Mrialles and Portha, 2001) การพัฒนาหนูสายพันธุ์ GK rat สามารถนำมาใช้เป็นโมเดลการศึกษาภาวะแทรกซ้อนของโรคเบาหวานที่พบในคนได้ เช่น peripheral neuropathy (Sato *et al.*, 2003; Brussee *et al.*, 2008), retinopathy (Yagihashi *et al.*, 1982) และ diabetic wound (Al-Mulla *et al.*, 2011)

ตารางที่ 6 The characteristics found in GK rat and diabetic patients. (Akash *et al.*, 2013)

Features	GK Rats	Human
Insulin response to glucose	Decreased	Decreased
Insulin response to GLP-1	Increased	Not determined
Glucose oxidation	Decreased	Decreased
GPDH activity	Decreased	Decreased
ATP/ADP ratio	Decreased	Decreased
GLUT2	Decreased	Decreased
Glucokinase	Decreased	Decreased
ISR2	Decreased	Decreased
Pro-insulin/insulin ratio	Increased	Increased
Markers of systemic inflammation	Increased	Increased
Lipid profiles	Increased	Increased

GK: Goto-Kakizaki; GLP-1: Glucagon-like peptide-1; GPDH: Glycerol-3-phosphate dehydrogenase; ATP: Adenosine triphosphate; ADP: Adenosine diphosphate; GLUT2: Glucose transporter; IRS-2: insulin receptor substrate-2.



- Spontaneously Diabetic Torii (SDT) Rat หนูสายพันธุ์ SDT คือหนูสายพันธุ์ใหม่ที่เกิดภาวะเบาหวานชนิดที่ 2 ขึ้นเองตามธรรมชาติ จากการผสมพันธุ์หนู Sprague-Dawley rat ซึ่งใช้เป็นสายพันธุ์ต้นกำเนิด ของ SDT rat โดยจะพบลักษณะของการเกิด glucose intolerance ทำให้มีระดับกลูโคสในเลือดสูง มีระดับอินซูลินในเลือดต่ำ และมีภาวะไตรกลีเซอไรด์ในเลือดสูง (Shinohara *et al.*, 2000) เนื่องจาก SDT rat มีภาวะน้ำตาลในเลือดสูงเรื้อรังจึงได้รับการพัฒนาเป็นโมเดลในการใช้ศึกษาภาวะแทรกซ้อนของโรคเบาหวาน เช่น ภาวะเบาหวานขึ้นจอประสาทตา ปลายประสาทอักเสบ และโรคไตวายจากเบาหวาน (Kakehashi *et al.*, 2006; Sasase *et al.*, 2013)

## 2. การเหนี่ยวนำด้วยอาหารที่มีส่วนประกอบของไขมันในปริมาณสูง (high fat feeding)

โมเดลการเหนี่ยวนำด้วยอาหารที่มีส่วนประกอบของไขมันปริมาณสูงในหนูสายพันธุ์ C57BL/6 mice และ Sprague-Dawley (SD) rat จะส่งผลให้หนูเกิดภาวะอ้วน มีระดับอินซูลินในเลือดสูงกว่าปกติ และมีการเปลี่ยนแปลงความสมดุลของกลูโคส (glucose homeostasis) (Winzell and Ahren, 2004) อาหารปกติ (chow-fed) ที่ใช้ในการเลี้ยงสัตว์ทดลอง จะประกอบด้วย โปรตีน 26% คาร์โบไฮเดรต 63% และไขมัน 11% แต่สำหรับอาหารที่ใช้เหนี่ยวนำให้เกิดภาวะเบาหวานชนิดที่ 2 จะมีการเพิ่มส่วนผสมของไขมันมากขึ้น ประมาณ 58% โดยพบว่าหนูที่ได้รับอาหารแบบ high-fat-fed มีน้ำหนักตัวเพิ่มมากขึ้นใน 1 สัปดาห์แรก เมื่อเปรียบเทียบกับหนูที่ได้รับอาหารแบบ chow-fed โดยน้ำหนักตัวหนูที่เพิ่มมากขึ้น ซึ่งเกี่ยวข้อง กับภาวะดื้อต่ออินซูลิน และความบกพร่องของ beta-cell ส่งผลให้เกิดความบกพร่องของความทนต่อกลูโคส (King, 2012)

## การศึกษากระบวนการหายของแผลในโมเดลหนูทดลองโรคเบาหวานชนิดที่ 2

การศึกษาในครั้งนี้มีการใช้ตำรับยาสมานแผลต่อการศึกษาผลต่อกระบวนการหายของแผลในหนูเบาหวานชนิดที่ 2 ซึ่งสายพันธุ์ของหนูทดลองที่นิยมใช้เป็นโมเดลการศึกษาในปัจจุบันมีด้วยกันหลายสายพันธุ์ ได้แก่ Lep<sup>ob/ob</sup> mice จากรายงานของ Kampfer และคณะ (2005) ได้ศึกษาการอักเสบซึ่งเกี่ยวข้องกับบทบาทของ cyclooxygenase (COX)-1 และ -2 ต่อการสร้าง prostaglandin (PG) ในเนื้อเยื่อแผลของหนู Lep<sup>ob/ob</sup> mice พบว่ากลุ่ม Lep<sup>ob/ob</sup> mice มีการแสดงออกของ COX-1 น้อยลง แต่มี COX-2 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม WT และพบว่า กลุ่ม Lep<sup>ob/ob</sup> mice ที่ได้รับ murine recombinant leptin ขนาด 2 µg/g (ip) ทุกวันเป็นระยะเวลา 13 วัน ก่อนการสร้างแผล มีการแสดงออกของ COX-1 เพิ่มขึ้นในเซลล์ keratinocytes บริเวณขอบแผล และในเนื้อเยื่อบริเวณแผลมีการแสดงออกของ COX-2 ลดลง ซึ่งไม่แตกต่างกันเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม WT นอกจากนี้ยังมีรายงานของ Zhao และคณะ (2017) ได้ศึกษาผลของการใช้ hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) ต่อการหายของแผลในหนู

Lep<sup>ob/ob</sup> mice (fasting blood glucose = 14.90±0.64 mmol/l) พบว่าการรักษาด้วย H<sub>2</sub>S สามารถเพิ่มอัตราการหายของแผลได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (Lep<sup>ob/ob</sup> mice ได้รับ saline) โดยมีผลต่อการลดการแทรกซึมของเซลล์ neutrophil และ macrophage ลดการสร้าง TNF-alpha, IL-6 และ MMP-9 นอกจากนี้พบว่ามีผลของการสะสมของ collagen และการสร้างหลอดเลือดใหม่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม นอกจากนี้มีการใช้หนูสายพันธุ์ Lepr<sup>db/db</sup> mice จากรายงานของ Lee และคณะ (2004) ได้ใช้ Lepr<sup>db/db</sup> mice ในการศึกษาผลของการใช้ electrical TGF-beta1 gene stimulation ต่อการรักษาแผลในหนูเบาหวาน พบว่า 5 วันหลังการรักษาบริเวณแผลมีอัตราการสร้างเนื้อเยื่อใหม่ การสังเคราะห์ collagen และการสร้างหลอดเลือดใหม่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และจากรายงานของ Fukui และคณะ (2017) ได้ใช้ Lepr<sup>db/db</sup> mice ในการศึกษาผลของการใช้ liposome-encapsulated hemoglobin (h-LEH 2 ml/kg; iv) ต่อการรักษาแผลในหนูเบาหวานเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับการรักษาด้วย saline 2 ml/kg (iv) พบว่า ในวันที่ 4 และ 7 หลังการรักษาแผล กลุ่มที่ได้รับ h-LEH 2 มีอัตราการหายของแผลเร็วกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม นอกจากนี้มีการใช้หนูสายพันธุ์ ZDF จากรายงานการศึกษาหนูทดลองสายพันธุ์ ZDF พบว่ามีความบกพร่องของกระบวนการหายของแผล ซึ่งสามารถใช้เป็นโมเดลใหม่ในการศึกษาความบกพร่องของกระบวนการหายของในหนูทดลอง ซึ่งเป็นเบาหวานชนิดที่ 2 และมีภาวะอ้วนได้ โดยพบว่า หนู ZDF มีความบกพร่องต่อการหดตัวของแผล มีการสร้างสะเก็ดน้ำเหลืองเพิ่มขึ้น มีการเพิ่มขึ้นของการอักเสบ และมีหนอง ในวันที่ 10 หลังการเกิดแผล พบว่า granulation tissue มีการเรียงตัวของเซลล์เส้นใยที่ผิดปกติ มีความเข้มข้นของ hydroxyproline ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับหนูปกติ การแสดงออกของ IL-6, myeloperoxidase (MPO) และ collagenase-3 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับหนูปกติ ในทางกลับกับการแสดงออกของ type I collagen และ elastin ลดลง (Slavkovsky *et al.*, 2011) และสายพันธุ์ที่นิยมใช้ในการศึกษาภาวะแทรกซ้อนต่างๆ ของโรคเบาหวาน คือ GK rat จากรายงานของ Wakutta และคณะ (2007) ได้ศึกษาการหายของแผลบริเวณผิวหนังด้านหน้าของกระจกตาดำ (corneal epithelium) ในหนู GK rat ซึ่งมีระดับน้ำตาลกลูโคส เท่ากับ 259±55 mg/dl เปรียบเทียบกับหนู Wistar rat ซึ่งมีระดับน้ำตาลกลูโคส เท่ากับ 116±11 mg/dl พบว่า อัตราการหายของแผลในหนู GK rat (0.509±0.043 mm<sup>2</sup>/h) ช้ากว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม Wistar rat (0.611±0.047 mm<sup>2</sup>/h) Al-Mulla และคณะ (2011) ได้ศึกษาความบกพร่องของการอักเสบ และการทำงานของ TGF-beta1/Smad และ TNF-alpha/NF-keppaB signaling pathway ในกระบวนการหายของแผลของหนู GK rat เพศเมีย พบว่าในวันที่ 3 และ 7 หลังการเกิดแผล หนู GK rat มี %wound closure และ %re-epithelization น้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อ

เปรียบเทียบกับหนู Wistar rat และพบว่าหนู GK rat มีความบกพร่องในการสะสมของสารองค์ประกอบใน ECM ที่มีความสำคัญต่อกระบวนการหายของแผล นั่นคือ มีการแสดงออกของ fibronectin, type 1 collagen และ hydroxyproline (ตัวบ่งชี้ของการสะสมของ collagen) ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม Wistar rat และพบการแสดงออกของ VEGF ลดลง บ่งชี้ถึงความบกพร่องในกระบวนการสังเคราะห์หลอดเลือดใหม่บริเวณเนื้อเยื่อแผล นอกจากนี้ พบว่า ในวันที่ 3 และ 7 หลังการเกิดแผล หนู GK rat มีการแสดงออกของ TGF-beta และ p-Smad2/Smad3 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม Wistar rat แต่ในทางตรงกันข้ามพบว่าการแสดงออกของ Smad7 เพิ่มขึ้น ซึ่งบ่งชี้ถึงการทำงานที่บกพร่องของ TGF-beta1/Smad signaling pathway ร่วมกับการทำงานมากขึ้นของ TNF-alpha/NF-keppaB signaling pathway โดยพบว่า มีปริมาณของ MPO, macrophage และการแสดงออกของ TNF-alpha เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม Wistar rat ซึ่งสิ่งเหล่านี้บ่งชี้ถึงการเกิดกระบวนการอักเสบมากขึ้น จากรายงานนี้แสดงให้เห็นได้ชัดว่ากระบวนการหายของแผลที่ช้าลงในหนู GK rat เป็นผลมาจากการเกิดกระบวนการอักเสบที่ผิดปกติ นอกจากนี้ยังมีรายงานที่เกี่ยวข้องกับการศึกษากระบวนการหายของแผลในหนู GK rat เช่น Huang และคณะ (2014) ได้ศึกษาผลของน้ำตาลในเลือดสูง ต่อการหายของแผลกดทับในหนู GK rat เปรียบเทียบกับหนู Wistar rat โดยระดับน้ำตาลในเลือดก่อนการทดสอบใน GK rat เท่ากับ  $209.2 \pm 44.0$  mg/dl และในหนู Wistar rat เท่ากับ  $112.7 \pm 22.8$  mg/dl ในวันที่ 14 หลังการทดสอบ ระดับน้ำตาลในเลือดของ GK rat เท่ากับ  $214.0 \pm 71.0$  mg/dl และในหนู Wistar rat เท่ากับ  $102.0 \pm 24.0$  mg/dl จากการศึกษาการหายของแผลกดทับ พบว่าในกลุ่ม GK rat มีการหายของแผลช้ากว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับ Wistar rat และจากการตรวจประเมินทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของเนื้อเยื่อบริเวณแผล พบว่า กลุ่ม GK rat มีการแทรกซึมของเซลล์เม็ดเลือดขาวในทุกชั้นของผิวหนังตั้งแต่วันที่ 7-14 หลังการเกิดแผล มีการเจริญเติบโตของ collagen ที่ไม่สมบูรณ์และมีความหนาแน่นของ collagen ในเนื้อเยื่อแผลน้อยกว่า Wistar rat Kong และคณะ (2014) ได้ศึกษาการใช้ mesenchymal stem cells (PMSCs) ในการรักษาแผลของหนู GK rat เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับ PBS พบว่าในวันที่ 15 หลังการรักษาแผลด้วย PMSCs มี %wound area น้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ( $17.34 \pm 2.01\%$  และ  $39.28 \pm 4.63\%$  ตามลำดับ) และจากการเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อในวันที่ 15 เพื่อตรวจประเมินทางจุลกายวิภาคศาสตร์ พบว่ากลุ่มที่ได้รับการรักษาแผลด้วย PMSCs มีการสะสมของ collagen และมีความหนาแน่นของ granulation tissue เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังมีการตรวจประเมินการสร้างหลอดเลือดใหม่ของเนื้อเยื่อบริเวณแผลโดยใช้วิธี von Willebrand factor (vWF) staining พบว่าในวันที่ 15 หลังการรักษาแผลด้วย PMSCs พบว่ามีความ

หนาแน่นของหลอดเลือด ( $16.52 \pm 2.36$  vessels) มากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ( $4.35 \pm 0.73$  vessels)

#### 4.7 การวิเคราะห์หาระดับของโปรตีนและการตรวจติดตามโปรตีนที่สนใจ

วิธีการตรวจวัดระดับของโปรตีนที่มีความสำคัญและได้รับความนิยมใน enzyme-linked immunosorbent (ELISA) technique ซึ่งสามารถใช้ตรวจวัดความเข้มข้นของโปรตีนได้ตั้งแต่ ng/ml ถึง pg/ml ที่มีอยู่ในตัวอย่างรูปแบบต่างๆ เช่น serum, plasma, urine, tissue/cultured cell supernatant หรือ tissue homogenate ซึ่งหลักการและรายละเอียดของวิธี ELISA มีดังนี้

ELISA technique เป็นวิธีการตรวจสอบปฏิกิริยาระหว่าง antibody และ antigen โดยใช้ เอนไซม์เป็นตัวบ่งชี้ ซึ่งสามารถใช้ตรวจหา antibody หรือ antigen ได้อย่างจำเพาะเจาะจง มีความไวสูง ง่าย และรวดเร็ว การทดสอบโดยทั่วไปมักใช้วัสดุประเภท solid phase เช่น 96 well phase เป็นตัวดูดซับ antibody หรือ antigen ไว้ก่อน และเติมสารตัวอย่างที่มี antibody หรือ antigen เมื่อเกิดปฏิกิริยา ระหว่าง antibody และ antigen บน solid phase จากนั้นจึงเติม antibody ที่มีความจำเพาะที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ลงไป และเติม substrate ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เชื่อมต่อกับ antibody จะเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเปลี่ยน substrate ที่ไม่มีสีให้เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีสี (chromomeric substrate) ซึ่งเอนไซม์ต่างๆ ที่ใช้ใน ELISA ได้แก่ alkaline phosphatase หรือ horseradish peroxidase เป็นต้น การพัฒนา ELISA ในรูปแบบต่างๆ ทำให้สามารถใช้เทคนิคนี้ในการตรวจสอบได้ทั้ง antibody และ antigen ในแง่คุณภาพและปริมาณได้ (Aydin, 2015) การทดสอบ ELISA สามารถแบ่งออกได้เป็น 4 แบบ คือ

1. Direct ELISA หลักการของการทดสอบคือ เคลือบ solid phase ด้วย antibody ที่จำเพาะต่อ antigen ที่ต้องการตรวจหาในตัวอย่าง เมื่อเติมตัวอย่างที่มี antigen ก็จะไปจับกับ antibody ดังกล่าว หลังจากการล้างส่วนที่ไม่ทำปฏิกิริยาออก เติม antibody ตัวที่สองซึ่งมีความจำเพาะกับ antigen ที่ต้องการตรวจหา โดย antibody ถูกติดฉลากด้วยเอนไซม์ จากนั้นเติม substrate การเปลี่ยนแปลงของ substrate จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณ antigen ที่ตรวจหา (Engvall, 2010)

2. Indirect ELISA วิธีการนี้เป็นการทดสอบที่ดัดแปลงมาจาก direct ELISA ให้มีความสะดวกในการปฏิบัติมากขึ้น โดยใช้ secondary antibody ที่ไม่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ และใช้ antibody ที่จำเพาะต่อ immunoglobulin ติดฉลากด้วยเอนไซม์ เป็นตัวกระทำเพิ่มเติมในการทดสอบ เพื่อวัดปริมาณของ secondary antibody ซึ่งจับกับ antigen ที่ต้องการตรวจหา โดยเป็นการวัดปริมาณ antigen ในตัวอย่างแบบทางอ้อม ซึ่งในการทดสอบ primary antibody และ secondary antibody จะต้องเป็น immunoglobulin ของสัตว์ต่างชนิดกัน เพื่อป้องกันการเกิดผลบวกเท็จขึ้น indirect ELISA มีข้อได้เปรียบกว่าการใช้ direct ELISA เพื่อตรวจหา antigen

เนื่องจากสามารถใช้ antibody ที่จำเพาะต่อ immunoglobulin ติดฉลากด้วยเอนไซม์ ชนิดเดียว สำหรับการตรวจหา antigen ได้หลายชนิด โดยมีข้อแม้ว่า secondary antibody ในแต่ละระบบ นั้นจะต้องได้มาจากสัตว์ชนิดเดียวกัน นอกจากนี้ indirect ELISA จะมีความไวมากกว่า direct ELISA ในการตรวจหา antigen ชนิดเดียวกัน เนื่องจาก secondary antibody หนึ่งโมเลกุล สามารถทำปฏิกิริยากับ antibody ต่อ immunoglobulin ติดฉลากด้วยเอนไซม์ นั้นได้หลาย โมเลกุล ดังนั้นจึงเป็นการช่วยเพิ่มปริมาณโมเลกุลของเอนไซม์ต่อ antigen หนึ่งโมเลกุล มีผลทำให้การทดสอบมีความไวมากขึ้น (Lindstrom and Wager, 1978)

3. Competitive ELISA วิธีนี้สามารถตรวจหาได้ทั้ง antigen และ antibody หากต้องการ ตรวจสอบ antigen เคลือบ solid phase ด้วย antibody จากนั้นเติม antigen ที่ติดฉลากด้วย เอนไซม์ในปริมาณที่แน่นอน และเติมตัวอย่างที่มี antigen ลงไปเพื่อแย่งจับกับ antibody ที่อยู่บน solid phase หรือหากต้องการตรวจหา antibody เคลือบ solid phase ด้วย antigen จากนั้น เติม antibody ที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ในปริมาณที่แน่นอน และเติมตัวอย่างที่มี antibody ลงไป เพื่อแย่งจับกับ antigen อยู่บน solid phase (Yorde *et al.*, 1976)

4. Sandwich ELISA เป็นวิธีที่ใช้ตรวจหา antigen โดยเคลือบ solid phase ด้วย antibody และเติมตัวอย่างที่ต้องการตรวจสอบ จากนั้น antigen ในตัวอย่างจะจับกับ antibody บนพื้นผิว solid phase เติม secondary antibody ที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ และเติม enzyme-labelled anti-detector ลงไปทำให้เกิดปฏิกิริยา (Kato *et al.*, 1977)

### วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาฤทธิ์ด้านการอักเสบและอธิบายกลไกการออกฤทธิ์ของผลิตภัณฑ์ในรูปแบบยาน้ำมันสมานแผลและยาเตรียมแผ่นปิดแผลในสัตว์ทดลอง
2. เพื่อศึกษาฤทธิ์ต่อการหายของแผล และอธิบายกลไกการออกฤทธิ์ของผลิตภัณฑ์ในรูปแบบยาน้ำมันสมานแผลและยาเตรียมแผ่นปิดแผลในหนูขาวสายพันธุ์ปกติ และ หนูเบาหวานชนิดที่ 2
3. เพื่อเปรียบเทียบความสามารถในการต้านการอักเสบและการหายของแผลของผลิตภัณฑ์ทั้ง 2 รูปแบบ

## บทที่ 2

### วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

#### วัสดุและอุปกรณ์

##### สารเคมี

1. Acetic acid (J.T.Baker)
2. Betadine solution (BETADINE®)
3. Catechin (Sigma-Aldrich)
4. Chloroform (Sigma-Aldrich)
5. Dimethyl sulfoxide (Fisher Chemical)
6. Egg yolk (Sigma-Aldrich)
7. Ethanol (Sigma-Aldrich)
8. Hexane (Sigma-Aldrich)
9. Hydrochloric acid (J.T.Baker)
10. Lambda-Carrageenan (Sigma-Aldrich)
11. Liquid nitrogen
12. Phenylbutazone (Sigma-Aldrich)
13. Phosphate buffer tablets (PBS) (Sigma-Aldrich)
14. Methanol (Sigma-Aldrich)
15. Naphthylethylenediamine dihydrochloride (NED) (Sigma-Aldrich))
16. Normal saline solution 0.9% (B BRAUN)
17. Solcoseryl ointment (MENARINI)
18. Sodium nitroprusside (Sigma-Aldrich))
19. Sulphanilamide (Sigma-Aldrich)

## อุปกรณ์

1. Analytical balance รุ่น ab204 s 2/fact (mettlertoledo)
2. Ashless filter paper No.40 (Whatman)
3. Biopsy punch ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 mm (Acu-Punch®)
4. Crucible
5. Desiccator
6. Digital vernier caliper (FACOM)
7. Duran bottle (Duran)
8. Evaporating dish (Pyrex)
9. Filter paper No.1 (Whatman)
10. Freezer -80 °C (STATEMED)
11. Glucometer and strips (Accu-chek® Performa)
12. Hot air oven (Venticell)
13. Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร (Axygen)
14. Microplate Reader รุ่น Sunrise (TECAN)
15. Muffle furnace (Nabertherm)
16. Multi-Mode microplate reader รุ่น EnSpire® (PerkinElmer)
17. Micropipette ขนาด 2-20 ไมโครลิตร 20-200 ไมโครลิตร และ 100-1000 ไมโครลิตร (Select BioProducts)
18. Microtiter plate แบบ 96 well flatted bottom (Nunc™)
19. Multichannel micropipette ขนาด 20-200 ไมโครลิตร (Finnpipette)
20. Needle ขนาด G26.5 และ G23.5 (Nipro)
21. Pipette tip ขนาด 250 ไมโครลิตรและ 1000 ไมโครลิตร (Axygen)
22. Rotary evaporator (Heidolph)
23. Self-Adherent Wrap (3M Coban)
24. Surgical instruments (HILBRO)
25. Syringe ขนาด 1 และ 3 มิลลิลิตร (Nipro)
26. Test tube ขนาด 10 มิลลิลิตร (Pyrex)
27. UV-Vis Spectrophotometer รุ่น Genesys 10 UV-Vis (Spectranic)
28. Vortex mixer (Vortex genie)
29. Volumetric flask ขนาด 10 มิลลิลิตร (Pyrex)



### ตำรับยาที่ใช้ศึกษา และการเตรียมตัวอย่าง

ตำรับยาที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ คือ ตำรับยาสมานแผล (Ya-Samarn-Phlae; YaSP) ซึ่งมีสมุนไพรประกอบในตำรับทั้งหมด 4 ชนิด ได้แก่ เหง้าขมิ้นชัน (*Curcuma longa* L.; CL) เปลือกมังคุด (*Garcinia mangostana* L.; GM) เมล็ดข้าวสาร (*Oryza sativa* L.; OS) และ เมล็ดหมากสง (*Areca catechu* L.; AC) โดยตำรับยาสมานแผลเป็นของ นายสมพร ชาญวณิชย์สกุล หมอพื้นบ้านในจังหวัดสงขลาและเป็นแพทย์แผนไทยประจำโรงพยาบาลการแพทย์แผนไทย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ แหล่งที่มาของสมุนไพรที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ คือ เปลือกมังคุดและเมล็ดข้าวสารจากพื้นที่ในจังหวัดพัทลุง ในส่วนของเหง้าขมิ้นชันและเมล็ดหมากจากพื้นที่ในจังหวัดสงขลา

การศึกษาในครั้งนี้ แบ่งสมุนไพรและตำรับยาสมานแผลที่ใช้ในการวิจัยเป็น 4 รูปแบบ ได้แก่

รูปแบบที่ 1 คือ การนำผงสมุนไพรเดี่ยวในตำรับยาสมานแผลทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ เหง้าขมิ้นชัน เปลือกมังคุด เมล็ดหมากสง และเมล็ดข้าวสาร หมักด้วย 95% เอทานอล ในอัตราส่วนของสมุนไพรต่อตัวทำละลาย เท่ากับ 1:2 เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 (Whatman® Grade 1 filter paper) และนำไประเหยเอทานอลออกโดยใช้เครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน ได้เป็นสารสกัดด้วยเอทานอลของขมิ้นชัน (ethanol extracts from *Curcuma longa* L.; E-CL), มังคุด (ethanol extracts from *Garcinia mangostana* L.; E-GM), ข้าวสาร (ethanol extracts from *Oryza sativa* L.; E-OS) และหมากสง (ethanol extracts from *Areca catechu* L.; E-AC)

รูปแบบที่ 2 คือ การนำผงสมุนไพรเดี่ยวทั้ง 4 ชนิด ในอัตราส่วนที่เท่ากัน (1:1:1:1) หมักด้วย 95% เอทานอล ในอัตราส่วนของตำรับยาต่อตัวทำละลาย เท่ากับ 1:2 เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 และนำไประเหยเอทานอลออกโดยใช้เครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน ได้เป็นสารสกัดเอทานอลของตำรับยาสมานแผล (ethanol extracts from Ya-Samarn-Phlae; E-YaSP)

รูปแบบที่ 3 คือ การเตรียมตำรับยาสมานแผลในรูปแบบยาน้ำมัน โดยใช้สมุนไพรทั้ง 4 ชนิดในอัตราส่วนที่เท่ากัน (อย่างละ 62.5 กรัม) สกัดด้วยน้ำมันมะพร้าวสกัดเย็นปริมาตร 1500 มิลลิลิตร โดยการเคี่ยวที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 ให้เป็นน้ำมันที่มีลักษณะสีเหลืองใสไม่มีตะกอน ได้เป็นยาสมานแผลในรูปแบบน้ำมัน (traditionally prepared-Ya-Samarn-Phlae; T-YaSP)

รูปแบบที่ 4 คือ การเตรียมยาสมานแผลในรูปแบบยาเตรียมแผ่นปิดแผล โดยนำ T-YaSP 1 ส่วน ผสมกับ white soft paraffin 3 ส่วน หลอมละลายที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นเตรียมผ้าโปร่งดูดซึม (adsorbent gauze) ที่ปราศจากเชื้อ ขนาด

10x10 ตารางเซนติเมตร จุ่มลงในยาเตรียมสมานแผล โดยให้ยาเตรียมเคลือบบนผ้าโปร่งดูดซึมจนทั่วแผ่น จากนั้นวางพับแผ่นปิดแผลไว้ในสภาพปราศจากเชื้อและป้องกันแสง 30 นาที เพื่อให้แผ่นปิดแผลเย็นลงและเคลือบติดกับผ้าโปร่งดูดซึม และบรรจุแผ่นปิดแผลในถุงอะลูมิเนียมฟรอยด์สุญญากาศ ได้เป็นยาสมานแผลในรูปแบบยาเตรียมเคลือบแผ่นปิดแผล (ointment base for Ya-Samarn-Phlae tulle-gras dressings; YaSP)

## วิธีการทดลอง

### 1. การตรวจสอบคุณภาพของสมุนไพรวงศ์ประกอบในตำรับยาสมานแผลตามแนวทางขององค์การอนามัยโลก (World Health Organization)

#### 1.1 การตรวจลักษณะเฉพาะทางกายภาพของสมุนไพรร

##### 1.1.1 การศึกษาลักษณะทางมหภาคของสมุนไพรร

โดยนำสมุนไพรรวงศ์ประกอบของตำรับยาสมานแผลทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ เหง้าขมิ้นชัน เปลือกมังคุด เมล็ดข้าวสาร และเมล็ดหมากสง มาล้างทำความสะอาด และศึกษาลักษณะภายนอกของสมุนไพรรแต่ละชนิด เช่น ลักษณะผิวนอก รอยย่น ขนาด ความกว้าง ความยาว สีเนื้อในของสมุนไพรร โดยวิธีการดูด้วยตาเปล่า หรือใช้แว่นขยาย โดยอ้างอิงจาก Thai Herbal Pharmacopoeia และ Ayurvedic pharmacopoeia of India

##### 1.1.2 การศึกษาลักษณะทางจุลภาคของผงยาสมุนไพรร

โดยนำสมุนไพรรที่ผ่านการตรวจสอบลักษณะทางมหภาค มาบดเป็นผง ผ่านร่งเบอร์ 60 เพื่อใช้ในการตรวจลักษณะทางจุลภาคของเนื้อเยื่อพืชสมุนไพรรโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ การเตรียมตัวอย่างสไลด์ ทำโดยหยดน้ำยาที่เหมาะสมกับเนื้อเยื่อพืชที่ต้องการจะตรวจสอบเอกลักษณ์ 2 หยดลงบนแผ่นสไลด์ น้ำยาที่ใช้ย้อมผงพืชสมุนไพรร ได้แก่ น้ำกลั่นใช้ดูเซลล์พาราคีมา และแป้ง น้ำยากรดพิคริก (picric acid stain solution) ใช้ย้อม aleurone grains ติดสีเหลือง น้ำยาไอโอดีน (2% iodine solution) ใช้ย้อมเม็ดแป้ง ติดสีน้ำเงินหรือม่วง หรือน้ำยาซูดานทรี (sudan III stain solution) ใช้ย้อมเม็ดน้ำมัน ติดสีส้ม เป็นต้น จากนั้นใช้ปลายเข็มเขี่ยผงสมุนไพรรเล็กน้อยเคาะลงบนแผ่นสไลด์ตำแหน่งที่มีน้ำยาย้อม และผสมผงสมุนไพรรและน้ำยาย้อมให้เข้ากัน พักไว้ 10 นาที ปิดด้วย cover slip โดยระวังไม่ให้เกิดฟองอากาศขึ้นภายใน จากนั้นใช้วัสดุดูดซับสารละลายของน้ำยาที่ล้นออกมาจากการปิดด้วย cover slip นำแผ่นสไลด์ไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อดูลักษณะเซลล์ของเนื้อเยื่อสมุนไพรร จากนั้นบันทึกภาพและชื่อเซลล์ที่ตรวจพบ โดยอ้างอิงจาก Thai Herbal Pharmacopoeia และ Ayurvedic pharmacopoeia of India

## 1.2 การตรวจเอกลักษณ์ของผงสมุนไพร: การตรวจสอบวัตถุเจือปนและสิ่งแปลกปลอม

### 1.2.1 การหาปริมาณสิ่งแปลกปลอม (determination of foreign matter)

สุ่มตรวจผงสมุนไพรในตำรับยาสมานแผล แต่ละชุดการทดลอง ชุดละ 100 กรัม นำมาเกลี่ยในภาชนะแบนราบ ตรวจหาและคัดแยกสิ่งแปลกปลอมด้วยตาเปล่าหรือด้วยแว่นขยาย ชั่งน้ำหนักสิ่งแปลกปลอมด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง แล้วคำนวณหาร้อยละของสิ่งแปลกปลอมในตัวอย่าง ทำชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ แล้วนำมาคำนวณหาค่าเฉลี่ย ปริมาณสิ่งแปลกปลอมตามสูตร

$$\text{ปริมาณสิ่งแปลกปลอม (\%w/w)} = (A / B) \times 100$$

เมื่อ A คือ น้ำหนักสิ่งแปลกปลอม (กรัม) และ B คือ น้ำหนักผงสมุนไพรเริ่มต้น (กรัม)

### 1.2.2 การหาปริมาณความชื้น (loss of mass on drying)

ชั่งผงสมุนไพร 4 มิลลิกรัม ด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง ใส่ใน plate ที่ทราบน้ำหนักแน่นอน เเผาที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วนำมาดูความชื้นด้วยโถดูดความชื้น (desiccator) 30 นาที ชั่งน้ำหนักจนได้น้ำหนักคงที่ ทำชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ คำนวณหาร้อยละของปริมาณความชื้นตามสูตร

$$\text{ปริมาณความชื้น (\%w/w)} = [(W1 - W2) / (W1 - W)] \times 100$$

เมื่อ W คือ น้ำหนักของ plate (กรัม), W1 คือ น้ำหนักของ plate และผงสมุนไพรก่อนอบ (กรัม), W2 คือ น้ำหนักของ plate และผงสมุนไพรหลังอบ (กรัม)

### 1.2.3 การหาปริมาณเถ้ารวม (total ash)

เตรียมเผาเบ้าเคลือบและฝา (crucible) โดยอบแห้งที่อุณหภูมิ 450 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำออกมาใส่ในโถดูดความชื้น 30 นาที และชั่งด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง จนได้น้ำหนักคงที่ จากนั้นนำผงสมุนไพรปริมาณ 4 กรัม บรรจุในเบ้าเคลือบนำไปเผาที่อุณหภูมิ 450 องศาเซลเซียส เวลา 3 ชั่วโมง นำออกมาใส่ในโถดูดความชื้น 30 นาที ชั่งด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง จนได้น้ำหนักคงที่ ทำชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ แล้วคำนวณหาร้อยละของปริมาณเถ้ารวมทั้งหมดของผงสมุนไพรตามสูตร

$$\text{ปริมาณเถ้ารวมทั้งหมด (\%w/w)} = [(A - B) / W] \times 100$$

เมื่อ A คือ ค่าเฉลี่ยของน้ำหนักเบ้าเคลือบและฝาที่แน่นอนหลังการเผาตัวอย่าง, B คือ ค่าเฉลี่ยของน้ำหนักเบ้าเคลือบและฝาที่แน่นอนก่อนการเผาตัวอย่าง และ W คือ น้ำหนักผงสมุนไพรตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์

### 1.2.4 การหาปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรด (acid-insoluble ash)

ละลาย total ash ด้วยน้ำกลั่น 15 มิลลิลิตร และกรดไฮโดรคลอริก (hydrochloric acid; HCl) 10 มิลลิลิตร ในบีกเกอร์ ปิดฝาแล้วนำไปต้มที่อุณหภูมิ 130 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น กรองส่วนที่ไม่ละลายด้วยกระดาษกรองเบอร์ 40 จากนั้นล้างตะกอนด้วยน้ำ

ร้อนจนตะกอนเป็นสีขาวหรือไม่มีสี นำกระดาษกรองที่กรองแล้วใส่ใน crucible ที่มีน้ำหนักที่แน่นอน นำเข้าเตาเผาอุณหภูมิ 500 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง นำออกมาใส่ในโถดูดความชื้น 30 นาที ชั่งด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง จนได้น้ำหนักคงที่ บันทึกน้ำหนัก ทำชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ แล้วคำนวณหาร้อยละของปริมาณแถ้าที่ไม่ละลายในกรดของผงสมุนไพร ตามสูตร

$$\text{ปริมาณแถ้ารวมทั้งหมด (\%w/w)} = [(A - B) / W] \times 100$$

เมื่อ A คือ ค่าเฉลี่ยของน้ำหนักเบ้าเคลือบและฝาที่แน่นอน หลังการเผาตัวอย่าง, B คือ ค่าเฉลี่ยของน้ำหนักเบ้าเคลือบและฝาที่แน่นอน ก่อนการเผาตัวอย่าง และ W คือ น้ำหนักผงสมุนไพรตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์

### 1.3 การตรวจเอกลักษณ์ของสมุนไพร: การตรวจสอบปริมาณสารสำคัญในสมุนไพร

#### 1.3.1 การหาปริมาณสารสกัดด้วยเอทานอล (ethanol-soluble extractive)

บรรจุผงสมุนไพร 5 กรัมในขวดวัดปริมาตร (volumetric flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร เต็ม 95% เอทานอล 100 มิลลิลิตร ปิดด้วยพาราฟิล์ม (parafilm) เขย่าต่อเนื่อง 6 ชั่วโมง และวางทิ้งไว้ 18 ชั่วโมง จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 นำสารละลายที่กรองได้จำนวน 20 มิลลิลิตร ใส่ในชามระเหย (evaporating dish) ที่ทราบน้ำหนักแน่นอน นำไประเหยบนอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส จนได้น้ำหนักที่คงที่ ทำชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ คำนวณหาร้อยละของปริมาณสารสกัดที่มีอยู่ในตัวอย่างตามสูตร

$$\text{ปริมาณสารสกัดด้วยเอทานอล (\%w/w)} = (A / B) \times 100$$

เมื่อ A คือ น้ำหนักสารสกัด (กรัม) และ B คือ น้ำหนักผงสมุนไพร (กรัม)

#### 1.3.2 การหาปริมาณสารสกัดด้วยน้ำ (water-soluble extractive)

บรรจุผงสมุนไพร 5 กรัมในขวดวัดปริมาตรขนาด 250 มิลลิลิตร เต็ม chloroform water 100 มิลลิลิตร ปิดด้วยพาราฟิล์ม เขย่าต่อเนื่อง 6 ชั่วโมง และวางทิ้งไว้ 18 ชั่วโมง จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 นำสารละลายที่กรองได้จำนวน 20 มิลลิลิตร ใส่ในชามระเหย ที่ทราบน้ำหนักแน่นอน นำไประเหยบนอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิแล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส จนได้น้ำหนักที่คงที่ ทำชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ คำนวณหาร้อยละของปริมาณสารสกัดด้วยน้ำที่มีอยู่ในตัวอย่างตามสูตร

$$\text{ปริมาณสารสกัดด้วยน้ำ (\%w/w)} = (A / B) \times 100$$

เมื่อ A คือ น้ำหนักสารสกัด (กรัม) และ B คือ น้ำหนักผงสมุนไพร (กรัม)

### 1.3.3 การหาปริมาณสารสกัดด้วยเฮกเซน (hexane-soluble extractive)

บรรจุผงสมุนไพร 5 กรัมในขวดวัดปริมาตรขนาด 250 มิลลิลิตร เติมเฮกเซน 100 มิลลิลิตร ปิดด้วยพาราฟิล์มเขย่าต่อเนื่อง 6 ชั่วโมง และวางทิ้งไว้ 18 ชั่วโมง จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 นำสารละลายที่กรองได้จำนวน 20 มิลลิลิตร ใส่ในชามระเหยที่ทราบน้ำหนักแน่นอน นำไประเหยบนอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส จนได้น้ำหนักที่คงที่ ทำชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ คำนวณหาร้อยละของปริมาณสารสกัดด้วยน้ำที่มีอยู่ในตัวอย่างตามสูตร

$$\text{ปริมาณสารสกัดด้วยเฮกเซน (\%w/w)} = (A / B) \times 100$$

เมื่อ A คือ น้ำหนักสารสกัด (กรัม) และ B คือ น้ำหนักผงสมุนไพร (กรัม)

### 1.3.4 การหาปริมาณน้ำมันหอมระเหย (volatile oil content)

ใช้ชุดกลั่นน้ำมันหอมระเหยตามที่กำหนดไว้ใน Thai Herbal Pharmacopoeia บรรจุผงสมุนไพร 10 กรัมในขวดก้นกลม เติมน้ำ 100 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ ให้เข้ากัน ประกอบชุดกลั่นน้ำมันหอมระเหย โดยเติมน้ำลงใน graduate tube จนถึงระดับปริมาตร 2 มิลลิลิตร แล้วเติมไซลีน (xylene) 2 มิลลิลิตร และต้มด้วยความร้อน 130-150 องศาเซลเซียส จนน้ำเริ่มเดือด ปรับความร้อนให้ได้อัตราเร็วในการกลั่น 2-3 มิลลิลิตรต่อนาที เป็นเวลา 5 ชั่วโมง ปิดเครื่องทำความร้อน ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นประมาณ 15 นาที ไซให้น้ำใน graduate tube ไหลออกช้าๆ จนกระทั่งระดับของสารละลายผสมไซลีนและน้ำมันหอมระเหยอยู่ที่ preparation line ทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง ระดับของสารละลายผสมไซลีนและน้ำมันหอมระเหยอยู่ที่ระดับ 0 อ่านปริมาตรของสารละลายผสมของไซลีน และน้ำมันหอมระเหยเป็นมิลลิลิตร นำปริมาตรของไซลีน (มิลลิลิตร) หักลบออกจากปริมาตรของสารละลายผสมไซลีน และน้ำมันหอมระเหย ทำชุดการทดลอง 3 ซ้ำ คำนวณหาร้อยละของปริมาณน้ำมันหอมระเหยที่มีอยู่ในตัวอย่างตามสูตร

$$\text{ปริมาณน้ำมันหอมระเหย (\%v/w)} = [A - 2 \text{ (ml)} / B] \times 100$$

เมื่อ A คือ ปริมาตรน้ำที่อ่านได้ (มิลลิลิตร) และ B คือ น้ำหนักผงสมุนไพร (กรัม)

### 1.3.5 การหาปริมาณเคอร์คูมินอยด์ (curcuminoid content)

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน ชั่งสารละลายมาตรฐานเคอร์คูมิน 2 มิลลิกรัม นำมาละลายด้วยเมทานอล ปรับปริมาตรให้เป็น 5.0 มิลลิลิตร ในขวดวัดปริมาตร หา standard curve ของเคอร์คูมิน โดยดูดสารละลายมาตรฐานเคอร์คูมินด้วยเครื่องดูดจ่ายสารละลาย (micropipette) ปริมาตร 20, 40, 50, 60 และ 80 ไมโครลิตร ตามลำดับ ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร จำนวน 5 ขวด ปรับปริมาตรด้วยเมทานอล จนครบ 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงหรือ optical density (OD) ที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐาน

การเตรียมตัวอย่าง ชั่งผงสมุนไพร 300 มิลลิกรัม บรรจุในขวดวัดปริมาตรขนาด

10 มิลลิลิตร เติม tetrahydrofuran จนได้ปริมาตรครบ 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 24 ชั่วโมง โดยการเขย่าต่อเนื่อง ตูตสารละลายส่วนใส 1 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตร ขนาด 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยเมทานอลจนครบ 25 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นตูดสารละลายตัวอย่างมา 1 มิลลิลิตรใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยเมทานอลจนครบ 50 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสง ที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณเคอร์คูมินอยด์โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน

### 1.3.6 การหาปริมาณแทนนิน (tannin content)

ชั่งผงสมุนไพร 4 กรัม บรรจุในขวดรูปชมพู่ (erlenmeyer flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 150 มิลลิลิตร จากนั้นวางบนอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ที่ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ทำให้เย็นและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นในขวดวัดปริมาตรขนาด 250 มิลลิลิตร นำสารสกัดที่ได้กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1

จากนั้นหาปริมาณสารสกัดด้วยน้ำ (T1) โดยตูดสารสกัดที่กรองได้มา 50 มิลลิลิตร ระเหยแห้งด้วยเครื่องเครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (rotary evaporator) และนำสารที่ได้ใส่ลงในชามระเหยที่ทราบน้ำหนักที่แน่นอน อบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำมาตูดความชื้นด้วยโถตูดความชื้น 30 นาที ชั่งน้ำหนักจนได้น้ำหนักคงที่

หาปริมาณสารสกัดด้วยน้ำที่ไม่จับกับ hide powder (T2) โดยตูดสารสกัดที่กรองได้มา 80 มิลลิลิตร เติม hide powder 6 กรัม และเขย่าต่อเนื่องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 นำสารที่กรองได้ 50 มิลลิลิตร ระเหยแห้งด้วยเครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน และนำสารที่ได้จากการระเหยแห้งใส่ลงในชามระเหยที่ทราบน้ำหนักที่แน่นอน อบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วนำมาตูดความชื้นด้วยโถตูดความชื้น 30 นาที ชั่งน้ำหนักจนได้น้ำหนักคงที่

หาปริมาณ hide powder ที่ละลายกับน้ำ (T3) โดยชั่ง hide powder 6 กรัม บรรจุในขวดรูปชมพู่ เติมน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร และเขย่าต่อเนื่องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 นำสารที่กรองได้ 50 มิลลิลิตร ระเหยแห้งด้วยเครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน และนำสารที่ได้ใส่ลงในชามระเหยที่ทราบน้ำหนักที่แน่นอน อบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วนำมาตูดความชื้นด้วยโถตูดความชื้น 30 นาที ชั่งน้ำหนักจนได้น้ำหนักคงที่ จากนั้นคำนวณหาปริมาณ แทนนิน จากสูตร

$$\text{ปริมาณแทนนิน (\%w/w)} = \{(TX + T3) \times 5 \times 100\} / W$$

เมื่อ TX คือ T1 - T2 (T1 คือ น้ำหนักสารสกัดด้วยน้ำหลังการอบ และ T2 คือ น้ำหนักสารสกัดด้วยน้ำที่ไม่จับกับ hide powder หลังการอบ), T3 คือ น้ำหนัก hide powder ที่ละลายได้ในน้ำหลังการอบ และ W คือ น้ำหนักของผงสมุนไพร

## 2. การประเมินคุณสมบัติทางเคมีด้วย liquid chromatograph-mass spectrometer (LC-MS) และ การทดสอบหาปริมาณสารสำคัญ ด้วย high performance liquid chromatography (HPLC)

### 2.1 การประเมินคุณสมบัติทางเคมีของตำรับยาสมานแผลด้วยเครื่อง LC-MS

ตัวอย่างที่ใช้ในการตรวจสอบ ได้แก่ E-CL, E-GM, E-OS, E-AC, E-YaSP, T-YaSP และ YaSP โดยละลายสารตัวอย่างด้วยเมทานอล และส่งตัวอย่างทดสอบที่ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา โดยใช้เครื่อง liquid chromatography mass spectrometry LC-MS-MS, 6545 Accurate-Mass Q-TOF, Agilent Technologies, Germany สภาวะการทดสอบ คือ

Column	: Hypersil™ ODS (4.6×250 mm, 5 µm)	
Draw speed	: 100.0 µL/min	
Eject speed	: 400.0 µL/min	
Injection volume	: 5.00 µL	
Gas temperature	: 325 °C	
Gas flow	: 13 l/min	
Nebulizer	: 35 psig	
Mobile phase	: water (A), 0.1% formic acid (B), 100% acetonitrile (C)	
Time (min)	: %Solvent A	: %Solvent C
4.0	90.0	10.0
22.0	20.0	80.0
28.0	20.0	80.0
34.0	90.0	10.0

## 2.2 การวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญของตำรับยาสมานแผลโดยใช้เครื่อง high performance liquid chromatography (HPLC)

การวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ alpha-mangostin, curcumin และ arecoline ด้วยเครื่อง HPLC มีตัวอย่างที่ใช้ในการตรวจสอบ ได้แก่ T-YaSP และ YaSP โดยละลายสารตัวอย่างด้วยเมทานอล และส่งตัวอย่างทดสอบที่ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา โดยใช้เครื่อง high-performance liquid chromatograph, 1200, Agilent Technologies, Germany (HPLC-Agro) โดยใช้เทคนิค reverse phase high-performance liquid chromatography

สภาวะการทดสอบ คือ

Column	: Hypersil™ ODS (4.6×250 mm, 5 μm)	
Injection volume	: 20 μl	
Flow rate	: 1.00 ml/min	
Column temperature	: 25 °C	
Run time	: 20 min	
Detector wavelength	: 320 nm for alpha-mangostin; 425 nm for curcumin; 254 nm for arecoline	
Mobile phase	: methanol (A), 2% formic acid (B), acetonitrile (C)	
Time (min)	: %Solvent B	: %Solvent C
0.0	20.0	0.0
5.0	20.0	0.0
6.0	20.0	80.0
15.0	10.0	90.0
20.0	20.0	0.0



### 3. การวิเคราะห์ฤทธิ์ทางชีวภาพที่เกี่ยวข้องกับการสลายของอนุมูลอิสระของสมุนไพรประกอบ และตำรับยาสมุนไพรในหลอดทดลองและความปลอดภัยของยาสมุนไพร

3.1 การประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี nitric oxide (NO) scavenging activity assay (Mandal *et al.*, 2011)

นำสารสกัดด้วยเอทานอลของตำรับยาสมุนไพร (E-YaSP) ที่ความเข้มข้น 0.01-0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ผสมกับ 100 มิลลิโมลาร์ sodium nitroprusside 20 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ในที่มืดเป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นเติม 1% sulphaniamide 30 ไมโครลิตร บ่มเป็นเวลา 8 นาที ในที่มืด และเติม 0.1% naphthylethylenediamine dihydrochloride (NED) 30 ไมโครลิตร บ่มเป็นเวลา 8 นาที ในที่มืด นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 543 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader ทำการทดสอบตัวอย่างละ 3 ซ้ำ โดยใช้ catechin เป็นสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน รายงานค่าที่วัดได้เป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้งไนตริกออกไซด์ (% NO inhibition) ดังสูตร

$$\% \text{ NO inhibition} = \frac{(\text{Abs}_{\text{control}} - \text{Abs}_{\text{sample}})}{\text{Abs}_{\text{control}}} \times 100$$

$\text{Abs}_{\text{control}}$	คือ	ค่าการดูดกลืนแสงของ PBS 40 ไมโครลิตร กับ sodium nitroprusside 20 ไมโครลิตร 1% sulphaniamide 30 ไมโครลิตร และ 0.1% NED 30 ไมโครลิตร
$\text{Abs}_{\text{sample}}$	คือ	ค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่าง 40 ไมโครลิตร กับ sodium nitroprusside 20 ไมโครลิตร 1% sulphaniamide 30 ไมโครลิตร และ 0.1% NED 30 ไมโครลิตร

3.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบ (anti-inflammatory activity) ด้วยวิธียับยั้งการหลั่ง nitric oxide (NO) ในเซลล์ macrophage RAW 264.7 ที่ได้รับการกระตุ้นการอักเสบด้วย lipopolysaccharide (LPS) (Sudsai *et al.*, 2013)

การทดสอบความเป็นพิษ (cytotoxicity test) ของ E-CL, E-GM, E-OS, E-AC และ E-YaSP ต่อเซลล์ macrophage RAW 264.7 โดยเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารชนิด dulbecco's modified eagle medium (DMEM) ที่มีส่วนผสมของซีรัมลูกวัว 10% (10% of fetal bovine serum) และ 1% penicillin/streptomycin solution บ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะมี 5% คาร์บอนไดออกไซด์

เตรียมสารสกัดโดยเจือจางด้วย 10% DMSO ในอาหารเลี้ยงเซลล์ ให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 1-400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และนำไปกรองผ่านเมมเบรนรูพรุนขนาด 0.2 ไมครอน เพื่อให้ปราศจากเชื้อ จากนั้นนำไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี Sulforhodamine B (SRB assay) และคำนวณเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม จากนั้นเลือกความเข้มข้นสูงสุดที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการหลั่ง NO

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการหลั่ง NO ในเซลล์ macrophage RAW 264.7 ที่ได้รับการกระตุ้นการอักเสบด้วย LPS ทำโดยเพาะเลี้ยงเซลล์ใน 96-well plate ให้ได้ความเข้มข้น  $2.5 \times 10^4$  เซลล์ต่อไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะมี 5% คาร์บอนไดออกไซด์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออก และเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ที่มีส่วนผสมของสารสกัดความเข้มข้นต่าง ๆ ที่มีและไม่มี LPS (1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะมี 5% คาร์บอนไดออกไซด์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 300 g เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นดูดส่วนของ supernatant ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย Griess ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มในที่มืด เป็นเวลา 15 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader ทำการทดสอบตัวอย่างละ 3 ซ้ำ จากนั้นคำนวณความเข้มข้นของไนไตรท์โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของโซเดียมไนไตรท์ ( $\text{NaNO}_2$ ) ที่ความเข้มข้น 1.56-100 ไมโครโมลาร์

3.3 การทดสอบฤทธิ์กระตุ้นการหายของบาดแผลโดยใช้แบบจำลองการหายของบาดแผล (*in vitro* wound healing model) ด้วยวิธี wound scratch assay ในเซลล์ผิวหนังของมนุษย์ (human dermal fibroblast (HDF) cells) (Muhommod *et al.*, 2013)

การทดสอบความเป็นพิษ (cytotoxicity test) ของ E-CL, E-GM, E-OS, E-AC และ E-YaSP ต่อเซลล์ HDF โดยเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารชนิด dulbecco's modified eagle medium (DMEM) ที่มีส่วนผสมของซีรัมลูกวัว 10% (10% of fetal bovine serum) และ 1% penicillin/streptomycin solution บ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะมี 5%

### คาร์บอนไดออกไซด์

เตรียมสารสกัดโดยเจือจางด้วย 10% DMSO ในอาหารเลี้ยงเซลล์ ให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 0.0001-1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และนำไปกรองผ่านเมมเบรนรูพรุนขนาด 0.2 ไมครอน เพื่อให้ปราศจากเชื้อ จากนั้นนำไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี Sulforhodamine B (SRB assay) และคำนวณเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม จากนั้นเลือกความเข้มข้นสูงสุดที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ไปทดสอบฤทธิ์กระตุ้นการหายของบาดแผลด้วยวิธี wound scratch assay

การทดสอบฤทธิ์กระตุ้นการหายของบาดแผลด้วยวิธี wound scratch assay ทำโดยเพาะเลี้ยงเซลล์ HDF ใน 24-well plate ให้ได้ความเข้มข้น  $3 \times 10^5$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออก และใช้ pipette tip ขนาด 200 ไมโครลิตร ชีดเส้นตามแนวเส้นผ่านศูนย์กลางของ 24-well plate เพื่อให้เกิดช่องว่าง (artificial wound) และล้างเซลล์ที่หลุดจากการชีดออกด้วย PBS จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนผสมของสารสกัดความเข้มข้นต่าง ๆ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะมี 5% คาร์บอนไดออกไซด์ วิเคราะห์ผล โดยคำนวณระยะห่างที่ลดลงระหว่างรอยขีดที่สร้างขึ้น จากภาพถ่ายเซลล์เพาะเลี้ยงภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ที่เวลา 0, 8, 24 และ 48 ชั่วโมง หลังการบ่มเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งใช้ 10% DMSO แทนสารสกัด และใช้วิตามินซีเป็นสารมาตรฐาน

### 3.4 การทดสอบความระคายเคืองของยาสมานแผลในสัตว์ทดลอง (primary skin irritation test) (OECD, 2002)

การทดสอบการก่อความระคายเคืองผิวหนังกระต่ายของยาสมานแผลในรูปแบบ T-YaSP และ YaSP อ้างอิงวิธีการทดสอบหมายเลข 404 : การทดสอบการก่อความระคายเคืองต่อผิวหนังของ OECD Guidelines for Testing of Chemicals (2002)

การเตรียมสัตว์ทดลอง ในการทดลองใช้กระต่ายสีขาวสายพันธุ์ New Zealand White ทั้งสองเพศ จากภาควิชาสัตวบาล คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม น้ำหนักตัวประมาณ 2-3 กิโลกรัม โดยนำกระต่าย 3 ตัว (ต่อ 1 ตัวอย่างทดสอบ) มาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการก่อนการทดสอบ 1 สัปดาห์ เพื่อให้สัตว์ทดลองปรับความคุ้นเคยกับสถานที่ โดยกระต่ายจะได้รับน้ำและอาหารตามปกติ และก่อนทำการทดสอบ 1 วัน กระต่ายทุกตัวจะถูกโกนขนบริเวณลำตัวใต้หัวไหล่ชิดกระดูกสันหลังทั้งสองข้าง เป็นบริเวณ 10x10 ตารางเซนติเมตร ด้วยปัตตาเลี่ยนไฟฟ้าโดยระมัดระวังไม่ให้ผิวหนังเกิดแผล

วิธีการทดสอบ เริ่มทำการทดสอบโดยใช้ไมโครปิเปตดูดยาสมานแผลรูปแบบ T-YaSP ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร หรือซังยาสมานแผลในรูปแบบ YaSP 0.5 กรัม เกลี่ยลงบนผ้าพันแผลมาตรฐานขนาด 2.5x2.5 ตารางเซนติเมตร (patch) ทบซ้อนกัน 10 ชั้น ทำให้

ปราศจากเชื้อด้วยวิธีที่เอียงโดยใช้แรงดันไอน้ำ และนำมาปิดลงบนผิวหนังหลังกระต่ายด้านหนึ่ง ที่โกนขนเตรียมไว้ (บริเวณทดสอบ) ส่วนบริเวณหลังอีกด้านหนึ่งของกระต่ายตัวเดิมปิดด้วย patch ที่เคลือบด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร (บริเวณควบคุม) ยึด patch ด้วยพลาสติก และห่อลำตัวกระต่ายด้วยผ้ายัด เพื่อยึด patch ติดกับผิวหนังไม่ให้เคลื่อนหลุด เมื่อครบ 4 ชั่วโมง เปิด patch ออก แล้วใช้สำลีชุบน้ำอุ่นเช็ดเบาๆ เพื่อให้ตัวอย่างทดสอบที่เหลือค้างอยู่บนผิวหนังหลุดออก ตรวจสอบการแดงและบวมตรงบริเวณทดสอบ ที่เวลา 1, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง และหากพบว่ายังมีอาการแดงและบวมอยู่ให้ตรวจสอบการจนถึงวันที่ 14 วิเคราะห์ผล โดยการให้คะแนนตามหลักเกณฑ์ที่กำหนด จากนั้นนำคะแนนที่ได้ไปคำนวณหาดัชนีการระคายเคืองเบื้องต้น

#### หลักเกณฑ์การให้คะแนน

##### ความแดงของผิวหนัง (erythema)

ลักษณะ	คะแนน
ไม่มีผื่นแดง	0
มีผื่นแดงเล็กน้อยเห็นได้ไม่ชัด	1
มีผื่นแดงเห็นได้ชัด	2
มีผื่นแดงปานกลางถึงรุนแรง	3
มีผื่นแดงปานกลางถึงรุนแรงถึงผิวหนังตกสะเก็ด	4

##### ความบวมของผิวหนัง (edema)

ลักษณะ	คะแนน
ไม่มีการบวม	0
มีการบวมเล็กน้อยเห็นได้ไม่ชัด	1
มีการบวมเล็กน้อย เห็นขอบบริเวณบวมได้ชัดเจน	2
มีการบวมปานกลาง ขอบบริเวณที่บวมสูงจากผิวหนัง บริเวณข้างเคียงประมาณ 1 มิลลิเมตร	3
มีการบวมรุนแรง ขอบบริเวณที่บวมสูงจากผิวหนัง บริเวณข้างเคียงประมาณ 1 มิลลิเมตร และลามไปสู่บริเวณข้างเคียง	4

### วิธีการคำนวณ

คำนวณดัชนีการระคายเคืองเบื้องต้นต่อผิวหนัง ดังนี้

คำนวณคะแนนการระคายเคืองเบื้องต้น (primary irritation score; PIS) บนพื้นที่ทดสอบของผิวหนังกระต่าย

PIS ที่บริเวณทดสอบ = ผลรวมความแดงและความบวมที่บริเวณทดสอบ/จำนวนที่สังเกตผล PIS

ที่บริเวณควบคุม = ผลรวมความแดงและความบวมที่บริเวณควบคุม/จำนวนที่สังเกตผล

จำนวนสังเกตผล คือ จำนวนคะแนนที่สังเกต ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

PIS บนพื้นที่ทดสอบของกระต่ายแต่ละตัว = PIS ที่บริเวณทดสอบ - PIS ที่บริเวณควบคุม

คำนวณดัชนีการระคายเคืองเบื้องต้นต่อผิวหนัง (primary dermal irritation index; PDII)

PDII ต่อผิวหนัง = ผลรวมของ PIS บนพื้นที่ทดสอบของผิวหนังกระต่ายทุกตัว/จำนวนกระต่าย

### เกณฑ์การตัดสิน

ดัชนีการระคายเคืองเบื้องต้นต่อผิวหนัง

0 ถึง 1

มากกว่า 1 ถึง 2

มากกว่า 2 ถึง 5

มากกว่า 5 ถึง 8

ระดับความระคายเคือง

ไม่ระคายเคือง (negligible)

ระคายเคืองเล็กน้อย (slight)

ระคายเคืองปานกลาง (moderate)

ระคายเคืองรุนแรง (severe)

#### 4. การศึกษาความคงสภาพ (stability study) ของยาสมานแผลในรูปแบบ T-YaSP และ YaSP หลังการเก็บรักษาที่ 0, 3 และ 6 เดือน

ตำรับยาสมานแผลทั้งสองรูปแบบ คือ T-YaSP และ YaSP ได้รับการเตรียมไว้อย่างละ 3 ชุดทดสอบ ชุดทดสอบละ 3 ซ้ำ T-YaSP บรรจุในขวดสีชาปริมาตร 50 มิลลิลิตร และปิดฝา YaSP บรรจุในถุงฟรอยด์ที่ผ่านการซีลปิดถึงแบบสุญญากาศ นำไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้องปราศจากแสง เป็นเวลา 0, 3 และ 6 เดือน

4.1 วิเคราะห์รูปแบบสารองค์ประกอบทางเคมีเชิงคุณภาพด้วยเครื่อง Liquid chromatograph-mass spectrometer (LC-MS)

หลังจากการเก็บตัวอย่างยาสมานแผลทั้งสองรูปแบบที่เวลา 0, 3 และ 6 เดือน นำสารตัวอย่างละลายด้วยเมทานอล และส่งตัวอย่างทดสอบที่ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา โดยใช้เครื่อง liquid chromatography mass spectrometry LC-MS-MS, 6545 Accurate-Mass Q-TOF, Agilent Technologies, Germany สภาวะการทดสอบ คือ

Column	: Hypersil™ ODS (4.6×250 mm, 5 µm)	
Draw speed	: 100.0 µL/min	
Eject speed	: 400.0 µL/min	
Injection volume	: 5.00 µL	
Gas temperature	: 325 °C	
Gas flow	: 13 l/min	
Nebulizer	: 35 psig	
Mobile phase	: water (A), 0.1% formic acid (B), 100% acetonitrile (C)	
Time (min)	: %Solvent A	: %Solvent C
4.0	90.0	10.0
22.0	20.0	80.0
28.0	20.0	80.0
34.0	90.0	10.0

#### 4.2 การวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญของตำรับยาสมานแผลโดยใช้เครื่อง high performance liquid chromatography (HPLC)

การวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ alpha-mangostin, curcumin และ arecoline ด้วยเครื่อง HPLC หลังจากการเก็บตัวอย่างยาสมานแผลทั้งสองรูปแบบที่เวลา 0, 3 และ 6 เดือน นำสารตัวอย่างละลายด้วยเมทานอล และส่งตัวอย่างทดสอบที่ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา โดยใช้เครื่อง high-performance liquid chromatograph, 1200, Agilent Technologies, Germany (HPLC-Agro) โดยใช้เทคนิค reverse phase high-performance liquid chromatography

สภาวะการทดสอบ คือ

Column	: Hypersil™ ODS (4.6×250 mm, 5 μm)	
Injection volume	: 20 μl	
Flow rate	: 1.00 ml/min	
Column temperature	: 25 °C	
Run time	: 20 min	
Detector wavelength	: 320 nm for alpha-mangostin; 425 nm for curcumin; 254 nm for arecoline	
Mobile phase	: methanol (A), 2% formic acid (B), acetonitrile (C)	
Time (min)	%Solvent B	%Solvent C
0.0	20.0	0.0
5.0	20.0	0.0
6.0	20.0	80.0
15.0	10.0	90.0
20.0	20.0	0.0

#### 4.3 การประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี nitric oxide (NO) scavenging activity assay (Mandal *et al.*, 2011)

การเตรียมตัวอย่างเพื่อทดสอบ เมื่อครบกำหนดตามระยะเวลาการเก็บรักษา นำตัวอย่าง T-YaSP เจือจางด้วยอะซีโตไนไตรล์ให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 1.00, 0.10 และ 0.01% (v/v) และตัวอย่าง YaSP เจือจางด้วยอะซีโตไนไตรล์ให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 1.00, 0.10 และ 0.01% (w/v) จากนั้นผสมสารตัวอย่างแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 40 ไมโครลิตร กับ 100 มิลลิอาร์ sodium nitroprusside 20 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ในที่มืด เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นเติม 1% sulphanilamide 30 ไมโครลิตร บ่มเป็นเวลา 8 นาที ในที่มืด และเติม 0.1% naphthylethylenediamine dihydrochloride (NED) 30 ไมโครลิตร บ่มเป็นเวลา 8 นาที ในที่มืด จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 543 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader ทำการทดสอบตัวอย่างละ 3 ซ้ำ โดยใช้คาเทชิน เป็นสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน รายงานค่าที่วัดได้เป็นร้อยละการยับยั้งไนตริกออกไซด์ (% NO inhibition) ดังสูตร

$$\% \text{ NO inhibition} = \frac{(\text{Abs}_{\text{control}} - \text{Abs}_{\text{sample}})}{\text{Abs}_{\text{control}}} \times 100$$

Abs <sub>control</sub>	คือ	ค่าการดูดกลืนแสงของ PBS 40 ไมโครลิตร กับ sodium nitroprusside 20 ไมโครลิตร 1% sulphanilamide 30 ไมโครลิตร และ 0.1% NED 30 ไมโครลิตร
Abs <sub>sample</sub>	คือ	ค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่าง 40 ไมโครลิตร กับ sodium nitroprusside 20 ไมโครลิตร 1% sulphanilamide 30 ไมโครลิตร และ 0.1% NED 30 ไมโครลิตร

#### 4.4 การประเมินฤทธิ์ยับยั้งการเกิดปฏิกิริยา lipid peroxidation ด้วยวิธี thiobarbituric acid reactive substances (TBARs) (Nguyen *et al.*, 2017)

การเตรียมตัวอย่างที่ใช้ทดสอบ เมื่อครบกำหนดตามระยะเวลาการเก็บรักษา นำตัวอย่าง T-YaSP เจือจางด้วยอะซีโตไนไตรล์ให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 10.00, 1.00 และ 0.10% (v/v) และตัวอย่าง YaSP เจือจางด้วยอะซีโตไนไตรล์ให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 10.00, 1.00 และ 0.10% (w/v) จากนั้นผสมสารตัวอย่างแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 10 ไมโครลิตร กับ egg yolk 50 ไมโครลิตร acetic acid 150 ไมโครลิตร thiobarbituric acid 150 ไมโครลิตร และน้ำกลั่น 40 ไมโครลิตร นำไปอุ่นในอ่างอ่างไอน้ำที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 532 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader ทำการทดสอบตัวอย่าง



ละ 3 ชั่วโมง โดยใช้ butylatedhydroxytoluene (BHT) เป็นสารมาตรฐาน รายงานค่าที่วัดได้เป็นร้อยละการยับยั้งการเกิดมาลอนไดแอลดีไฮด์ (malondialdehyde; MDA) ดังสูตร

$$\% \text{ inhibition of MDA} = \frac{(\text{Abs}_{\text{control}} - \text{Abs}_{\text{sample}})}{\text{Abs}_{\text{control}}} \times 100$$

**Abs<sub>control</sub>** คือ ค่าการดูดกลืนแสงของอะซีโตไนไตรล์ 10 ไมโครลิตร กับ egg yolk 50 ไมโครลิตร acetic acid 150 ไมโครลิตร thiobarbituric acid 150 ไมโครลิตร และน้ำกลั่น 40 ไมโครลิตร

**Abs<sub>sample</sub>** คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่าง 10 ไมโครลิตร กับ egg yolk 50 ไมโครลิตร acetic acid 150 ไมโครลิตร thiobarbituric acid 150 ไมโครลิตร และน้ำกลั่น 40 ไมโครลิตร

## 5. การประเมินฤทธิ์ต้านการอักเสบและกลไกการออกฤทธิ์ของ T-YaSP และ YaSP ในสัตว์ทดลอง

### สัตว์ทดลอง

สัตว์ทดลองที่ใช้ คือ หนูขาวเพศผู้ สายพันธุ์ Wistar rats อายุ 2 เดือน น้ำหนัก 150-200 กรัม จากศูนย์สัตว์ทดลองมหาวิทยาลัย Yangzhou university, Yangzhou, Jiangsu, China การปฏิบัติกับสัตว์ทดลองได้รับการอนุมัติให้ทำการทดลองโดยคณะกรรมการจริยธรรมการใช้สัตว์ทดลอง ของศูนย์สัตว์ทดลองมหาวิทยาลัย Jiangsu university เลขที่ใบอนุญาต syxk-(su)-20130036 ก่อนการทดสอบนำหนูทดลองมาปรับตัวให้เข้ากับสภาพของห้องทดลองเป็นเวลา 1 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ 22±2 องศาเซลเซียส มีระดับความชื้นสัมพัทธ์ 70% มีการควบคุมการปิด-เปิดไฟ 12:12 ชั่วโมง

5.1 การศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบของยาสมานแผล โดยใช้วิธี carrageenan-induced rat paw edema (Ezzat *et al.*, 2018)

#### 5.1.1 ยาสมานแผลรูปแบบ T-YaSP

การเตรียมตัวอย่างทดสอบ เตรียมยาสมานแผลให้อยู่ในรูปแบบ T-YaSP และเตรียม 5% (w/v) phenylbutazone ใน virgin coconut oil ซึ่งเป็น oil-base solution ของ T-YaSP ใช้เป็นกลุ่มควบคุมบวกในการทดลองนี้

ก่อนการทดลองอดอาหารหนูเป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นแบ่งหนูออกเป็น 3 กลุ่มๆ ละ 15 ตัว ดังนี้

- กลุ่มควบคุมลบ ได้รับ oil-base solution ร่วมกับการฉีด carrageenan
- กลุ่มควบคุมบวก ได้รับ 5% (w/v) phenylbutazone oil-base solution ร่วมกับการฉีด carrageenan
- กลุ่มทดสอบ ได้รับ ยาสมานแผลในรูปแบบ T-YaSP ร่วมกับการฉีด carrageenan

วัดความหนาของอุ้งเท้าของหนูทุกตัวก่อนการทดสอบด้วยเครื่อง digital vernier caliper และจดบันทึกค่าที่ได้ (baseline) จากนั้นทาสารทดสอบบริเวณอุ้งเท้าหนู ตัวละ 0.2 กรัม หลังจากให้สารทดสอบ 1 ชั่วโมง ฉีด carrageenan 1% (w/v) ที่อุ้งเท้าด้านหลัง (hind paw) ของหนูทดลองทุกตัว

การวัดผล ทำโดยวัดความหนาของอุ้งเท้าหนู ที่เวลา 1, 2 และ 3 ชั่วโมง หลังจากฉีด carrageenan ด้วยเครื่อง vernier caliper digital นำค่าที่ได้ลบกับค่าความหนาของอุ้งเท้าเริ่มต้น ได้เป็นค่าความหนาของอุ้งเท้าที่เพิ่มขึ้นหลังจากฉีด carrageenan

การเก็บตัวอย่างอุ้งเท้าหนูเพื่อนำไปศึกษากลไกการต้านการอักเสบ เมื่อครบเวลา 3 ชั่วโมง หลังการฉีด carrageenan ทำการเก็บตัวอย่างอุ้งเท้าหนู โดยทำให้หนูสลบด้วยคาร์บอนไดออกไซด์ ก่อนตัดเนื้อเยื่อบริเวณอุ้งเท้าหนูข้างที่ได้รับสารทดสอบ เช่น ไนโตรเจนเหลว และเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ทันที เพื่อนำไปศึกษากลไกการต้านการอักเสบต่อไป

### 5.1.2 ยาสมานแผลรูปแบบ YaSP

การเตรียมสาร เตรียมยาสมานแผลให้อยู่ในรูปแบบ YaSP และ 5% (w/w) phenylbutazone ใน base ointment ซึ่งใช้เป็นกลุ่มควบคุมบวกในการทดลองนี้

การทดสอบ ก่อนการทดลองอดอาหารหนูเป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นแบ่งหนูออกเป็น 3 กลุ่มๆ ละ 15 ตัว ดังนี้

- กลุ่มควบคุมลบ ได้รับ base YaSP ร่วมกับการฉีด carrageenan
- กลุ่มควบคุมบวก ได้รับ 5% (w/w) phenylbutazone ใน base ointment ร่วมกับการฉีด carrageenan
- กลุ่มทดสอบ ได้รับ ยาสมานแผลในรูปแบบ YaSP ร่วมกับการฉีด carrageenan

หลังจากนั้น วัดความหนาของอุ้งเท้าของหนูทุกตัวก่อนการทดสอบด้วยเครื่อง digital vernier caliper และจดบันทึกค่าที่ได้ (baseline) จากนั้นหาสารทดสอบบริเวณอุ้งเท้าหนู ตัวละ 0.2 กรัม กับหนูในแต่ละกลุ่ม หลังจากให้สารทดสอบในแต่ละกลุ่ม 1 ชั่วโมง ฉีด carrageenan 1% (w/v) ที่อุ้งเท้าด้านหลัง (hind paw) ของหนูทดลองทุกตัว การวัดผล ทำโดยวัดความหนาของอุ้งเท้าหนู ที่เวลา 1, 2 และ 3 ชั่วโมงหลังจากฉีด carrageenan ด้วยเครื่อง vernier caliper digital จากนั้นนำค่าที่ได้ลบกับค่าความหนาของอุ้งเท้าเริ่มต้น ได้เป็นค่าความหนาของอุ้งเท้าที่เพิ่มขึ้นหลังจากฉีด carrageenan การเก็บตัวอย่างอุ้งเท้าหนูเพื่อนำไปศึกษา กลไกการต้านการอักเสบ เมื่อครบเวลา 3 ชั่วโมง หลังการฉีด carrageenan ทำการเก็บตัวอย่างอุ้งเท้าหนู โดยทำให้หนูสลบด้วยคาร์บอนไดออกไซด์ ก่อนตัดเนื้อเยื่อบริเวณอุ้งเท้าหนูข้างที่ ได้รับสารทดสอบ แซในไนโตรเจนเหลว และเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ทันที เพื่อนำไปศึกษา กลไกการต้านการอักเสบต่อไป

5.2 การตรวจวิเคราะห์ปริมาณของ malondialdehyde (MDA), nitric oxide (NO) และ myeloperoxidase (MPO) ในเนื้อเยื่ออักเสบ

5.2.1 การตรวจวิเคราะห์ปริมาณของ MDA ในเนื้อเยื่ออักเสบ โดยใช้ MDA assay kit (Zhang *et al.*, 2016)

เตรียมตัวอย่างโดยปั่นเนื้อเยื่ออุ้งเท้าใน 0.86% normal saline solution อัตราส่วน 1:9 (w/v) จนเป็นเนื้อเดียวกัน (tissue homogenate) จากนั้นนำไป centrifuge ที่ความเร็วรอบ 3,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที และดูส่วนของ supernatant เพื่อใช้ทำการทดลองต่อไป

วิธีการทดสอบ การทดสอบแต่ละตัวอย่างจะประกอบด้วย blank tube, standard tube และ sample tube โดย blank tube จะประกอบด้วย dehydrated alcohol 0.1 มิลลิลิตร standard tube ประกอบด้วย 10 นาโนโมลาร์ต่อมิลลิลิตร standard 0.1 มิลลิลิตร และ sample tube ประกอบด้วย tissue homogenate 0.1 มิลลิลิตร และเติม reagent A 0.1 มิลลิลิตร ในแต่ละ tube ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติม reagent B 1.5 มิลลิลิตร และ reagent C 1.5 มิลลิลิตร ในแต่ละ tube ผสมให้เข้ากัน วางบนอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 นาที นำไป centrifuge ที่ความเร็วรอบ 4,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที และดูส่วนของ supernatant ลงใน 96 well plate หลุมละ 200 ไมโครลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 นาโนเมตร

การคำนวณผลการทดลอง โดยใช้สูตร ดังนี้

Tissue MDA content (nmol/gprot) =

$(OD_{\text{sample}} - OD_{\text{blank}}) / (OD_{\text{standard}} - OD_{\text{blank}}) \times \text{Standard concentration (10 nmol/mL)} \div \text{Protein concentration in homogenate (gprot/L)}$

nmol/gprot คือ nanomole per gram protein

5.2.2 การตรวจวิเคราะห์ปริมาณของ NO ในเนื้อเยื่ออวัยวะ โดยใช้ NO assay kit (Zhang *et al.*, 2016)

เตรียมตัวอย่าง โดยปั่นเนื้อเยื่ออวัยวะใน 0.86% normal saline solution ในอัตราส่วน 1:9 (w/v) จนเป็นเนื้อเดียวกัน เพื่อให้ได้ตัวอย่างแบบ tissue homogenate จากนั้นนำไป centrifuge ที่ความเร็วรอบ 2,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที และดูส่วนของ supernatant เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

วิธีการทดสอบ การทดสอบแต่ละตัวอย่างจะประกอบด้วย blank tube, standard tube และ sample tube โดย blank tube จะประกอบด้วย double distilled water 0.25 มิลลิลิตร standard tube ประกอบด้วย double distilled water 0.2 มิลลิลิตร และ 100 ไมโครโมลาร์ต่อลิตร standard working solution 0.05 มิลลิลิตร sample tube ประกอบด้วย tissue homogenate 0.25 มิลลิลิตร จากนั้นเติม reagent A 0.2 มิลลิลิตร ในแต่ละ tube ผสมให้เข้ากัน วางบนอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที เติม reagent B 0.1 มิลลิลิตร และ reagent C 0.05 มิลลิลิตร ในแต่ละ tube ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex 30 วินาที จากนั้นวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง 40 นาที นำไป centrifuge ที่ความเร็วรอบ 4,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที และดูส่วนของ supernatant ของแต่ละ tube 0.4 มิลลิลิตร ผสมกับ chromogenic agent 0.3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที จากนั้นดูสารผสมลงใน 96 well plate หลุมละ 200 ไมโครลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร การคำนวณผลการทดลอง โดยใช้สูตร ดังนี้

$\text{NO content } (\mu\text{mol/gprot}) = (OD_{\text{sample}} - OD_{\text{blank}}) / (OD_{\text{standard}} - OD_{\text{blank}}) \times \text{Standard concentration (20 } \mu\text{mol/L)} \div \text{Protein concentration in homogenate (gprot/L)}$

$\mu\text{mol/gprot}$  คือ micromole per gram protein

5.2.3 การตรวจวิเคราะห์ปริมาณของ MPO ในเนื้อเยื่ออั๊กเสบ โดยใช้ NO assay kit (Zhang *et al.*, 2016)

เตรียมตัวอย่าง โดยปั่นเนื้อเยื่ออุ้งเท่ากับ 0.86% normal saline solution ในอัตราส่วน 1:9 (w/v) ให้เป็นเนื้อเดียวกัน เพื่อให้ได้ตัวอย่างแบบ tissue homogenate ซึ่งจะมี ความเข้มข้นเท่ากับ 10% tissue homogenate จากนั้นเจือจางให้ได้ความเข้มข้น เท่ากับ 5% tissue homogenate (sample) ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่จะใช้ทำการทดลองต่อไป

วิธีการทดสอบ การทดสอบแต่ละตัวอย่างจะประกอบด้วย sample tube และ contrast tube โดย sample tube จะประกอบด้วย sample, reagent A และ chromogenic agent เท่ากับ 0.1, 0.1, และ 1.5 มิลลิลิตร ตามลำดับ ในส่วนของ contrast tube จะประกอบด้วย distilled water, sample และ reagent A เท่ากับ 1.5, 0.1 และ 0.1 มิลลิลิตร ตามลำดับ ผสมให้ เข้ากัน และวางบนอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติม reagent B 0.025 มิลลิลิตร ทั้ง sample tube และ contrast tube ผสมให้เข้ากัน วางบนอ่าง ควบคุมอุณหภูมิที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นดูดสารผสมใส่ลงใน 96 well plate หลุมละ 200 ไมโครลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 460 นาโนเมตร

การคำนวณผลการทดลอง โดยใช้สูตร ดังนี้

$$\text{MPO activity (U/g wet tissue)} = (\text{OD}_{\text{sample}} - \text{OD}_{\text{contrast}}) / 11.3 \times \text{sample weight (g)}$$

$$\text{MPO activity (U/g wet tissue)} = (\text{OD}_{\text{sample}} - \text{OD}_{\text{contrast}}) / (11.3 \times 0.05 \text{ g/ml} \times 0.1 \text{ ml})$$

โดยที่

11.3 คือ อินเวอร์สการคูณหรือตัวผกผันการคูณของอัตราความชัน (multiplicative inverse of slope rate)

$$\text{sample weight (g)} = 0.05 \text{ g/ml} \times 0.1 \text{ ml}$$

0.05 g/ml คือ 5% tissue homogenate (5 g tissue/100 ml homogenate)

0.1 ml คือ ปริมาตรของตัวอย่างที่เติมลงใน sample tube และ contrast tube

5.3 การตรวจวิเคราะห์ปริมาณของ tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha), Interleukin-1beta (IL-1beta), prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), inducible nitric oxide synthase (iNOS) และ cyclooxygenase-2 (COX-2) ในเนื้อเยื่ออักเสบ

5.3.1 การตรวจวิเคราะห์ปริมาณของ TNF-alpha ในเนื้อเยื่ออักเสบ โดยใช้ enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (Oliveira *et al.*, 2014)

เตรียมตัวอย่างโดยปั่นเนื้อเยื่ออุ้งเท้ากับ phosphate buffered saline (PBS) pH 7.4 ในอัตราส่วน 1:9 (w/v) ให้เป็นเนื้อเดียวกัน เพื่อให้ได้ตัวอย่างแบบ tissue homogenate จากนั้นนำไป centrifuge ที่ความเร็วรอบ 3,000 rpm เป็นเวลา 20 นาที และดูดส่วนของ supernatant เพื่อใช้ทำการทดลองต่อไป

การเตรียม reagent

เตรียม rat TNF-alpha standard จากความเข้มข้นแรก 1,280 นาโนกรัมต่อลิตร จากนั้นเจือจางแบบลำดับสองด้วย standard diluent ให้ได้ความเข้มข้นในช่วง 40-1,280 นาโนกรัมต่อลิตร

เตรียม biotinylated Ab detection diluent โดยผสม biotinylated Ab เข้ากับ biotinylated diluent

เตรียม HRP conjugate diluent โดยใช้ concentrated HRP conjugate ผสมกับ HRP conjugate diluent

เตรียม wash buffer โดยใช้ double distilled water 450 มิลลิลิตร ผสมกับ concentrated wash solution 20 มิลลิลิตร

การทดสอบ ดูด standard และ sample 50 ไมโครลิตร ลงใน 96-well plate และเติม biotinylated Ab detection diluent 50 ไมโครลิตร จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ล้าง plate ด้วย wash buffer จำนวน 5 ครั้ง และเติม HRP conjugate diluent 50 ไมโครลิตร ในแต่ละ well และบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ล้าง plate ด้วย wash buffer จำนวน 5 ครั้ง เติม chromogenic solution A 50 ไมโครลิตร และ chromogenic solution B 50 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ในที่มีด หลังจากนั้นเติม stop solution 50 ไมโครลิตร และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (optical density; OD) ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ภายใน 10 นาทีหลังจากการเติม stop solution นำค่า OD ที่ได้สร้าง standard curve แบบ logistic curve (4 parameters) จากนั้นคำนวณหาปริมาณของ TNF-alpha ในตัวอย่างจากสมการของ standard curve

5.3.2 การตรวจวิเคราะห์ปริมาณของ IL-1beta ในเนื้อเยื่ออวัยวะ โดยใช้ enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (Oliveira *et al.*, 2014)

เตรียมตัวอย่างโดยปั่นเนื้อเยื่ออวัยวะเข้ากับ phosphate buffered saline (PBS) pH 7.4 ในอัตราส่วน 1:9 w/v ให้เป็นเนื้อเดียวกัน เพื่อให้ได้ตัวอย่างแบบ tissue homogenate จากนั้นนำไป centrifuge ที่ความเร็วรอบ 3,000 rpm เป็นเวลา 20 นาที และดูส่วนของ supernatant เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

การเตรียม reagent

เตรียม rat IL-1beta standard จากความเข้มข้นแรก 240 นาโนกรัมต่อลิตร จากนั้นเจือจางแบบลำดับสองด้วย standard diluent ให้ได้ความเข้มข้นในช่วง 7.5-240 นาโนกรัมต่อลิตร

เตรียม biotinylated Ab detection diluent โดยผสม biotinylated Ab เข้ากับ biotinylated diluent

เตรียม HRP conjugate diluent โดยใช้ concentrated HRP conjugate ผสมกับ HRP conjugate diluent

เตรียม wash buffer โดยใช้ double distilled water 450 มิลลิลิตร ผสมกับ concentrated wash solution 20 มิลลิลิตร

การทดสอบ จุด standard และ sample 50 ไมโครลิตร ลงใน 96-well plate และเติม biotinylated Ab detection diluent 50 ไมโครลิตร จากนั้นปิด well plate และบ่มที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ล้าง plate ด้วย wash buffer จำนวน 5 ครั้ง และเติม HRP conjugate diluent 50 ไมโครลิตร ในแต่ละ well และบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ล้าง plate ด้วย wash buffer จำนวน 5 ครั้ง เติม chromogenic solution A 50 ไมโครลิตร และ chromogenic solution B 50 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ในที่มืด หลังจากนั้นเติม stop solution 50 ไมโครลิตร และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (optical density; OD) ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ภายใน 10 นาทีหลังจากการเติม stop solution นำค่า OD ที่ได้สร้าง standard curve แบบ logistic curve (4 parameters) จากนั้นคำนวณหาปริมาณของ IL-1beta ในตัวอย่างจากสมการของ standard curve

5.3.3 การตรวจวิเคราะห์ปริมาณของ PGE<sub>2</sub> ในเนื้อเยื่ออักเสบ โดยใช้ enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (Oliveira *et al.*, 2014)

เตรียมตัวอย่างโดยปั่นเนื้อเยื่ออุ้งเท้ากับ phosphate buffered saline (PBS) pH 7.4 ในอัตราส่วน 1:9 w/v ให้เป็นเนื้อเดียวกัน เพื่อให้ได้ตัวอย่างแบบ tissue homogenate จากนั้นนำไป centrifuge ที่ความเร็วรอบ 3,000 rpm เป็นเวลา 20 นาที และดูส่วนของ supernatant เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

การเตรียม reagent

เตรียม rat PGE<sub>2</sub> standard จากความเข้มข้นแรก 200 นาโนกรัมต่อลิตร จากนั้นเจือจางแบบลำดับสองด้วย standard diluent ให้ได้ความเข้มข้นในช่วง 6.25-200 นาโนกรัมต่อลิตร

เตรียม biotinylated Ab detection diluent โดยผสม biotinylated Ab เข้ากับ biotinylated diluent

เตรียม HRP conjugate diluent โดยใช้ concentrated HRP conjugate ผสมกับ HRP conjugate diluent

เตรียม wash buffer โดยใช้ double distilled water 450 มิลลิลิตร ผสมกับ concentrated wash solution 20 มิลลิลิตร

การทดสอบ ดูด standard และ sample 50 ไมโครลิตร ลงใน well และเติม biotinylated Ab detection diluent 50 ไมโครลิตร จากนั้นปิด well plate และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ล้าง plate ด้วย wash buffer จำนวน 5 ครั้ง และเติม HRP conjugate diluent 50 ไมโครลิตร ในแต่ละ well และบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ล้าง plate ด้วย wash buffer จำนวน 5 ครั้ง เติม chromogenic solution A 50 ไมโครลิตร และ chromogenic solution B 50 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ในที่มีด หลังจากนั้นเติม stop solution 50 ไมโครลิตร และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (optical density; OD) ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ภายใน 10 นาทีหลังจากการเติม stop solution นำค่า OD ที่ได้สร้าง standard curve แบบ logistic curve (4 parameters) จากนั้นคำนวณหาปริมาณของ PGE<sub>2</sub> ในตัวอย่างจากสมการของ standard curve



5.3.4 การตรวจวิเคราะห์ปริมาณของ iNOS ในเนื้อเยื่ออักเสบ โดยใช้ enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (Oliveira *et al.*, 2014)

เตรียมตัวอย่างโดยปั่นเนื้อเยื่อเข้ากับ phosphate buffered saline (PBS) pH 7.4 ในอัตราส่วน 1:9 w/v ให้เป็นเนื้อเดียวกัน เพื่อให้ได้ตัวอย่างแบบ tissue homogenate จากนั้นนำไป centrifuge ที่ความเร็วรอบ 3,000 rpm เป็นเวลา 20 นาที และดูส่วนของ supernatant เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

การเตรียม reagent

เตรียม rat iNOS standard จากความเข้มข้นแรก 24 นาโนกรัมต่อลิตร จากนั้นเจือจางแบบลำดับสองด้วย standard diluent ให้ได้ความเข้มข้นในช่วง 0.75-24 นาโนกรัมต่อลิตรเตรียม biotinylated Ab detection diluent โดยผสม biotinylated Ab เข้ากับ biotinylated diluent

เตรียม HRP conjugate diluent โดยใช้ concentrated HRP conjugate ผสมกับ HRP conjugate diluent

เตรียม wash buffer โดยใช้ double distilled water 450 มิลลิลิตร ผสมกับ concentrated wash solution 20 มิลลิลิตร

การทดสอบ ดูด standard และ sample 50 ไมโครลิตร ลงใน well และเติม biotinylated Ab detection diluent 50 ไมโครลิตร จากนั้นปิด well plate และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ล้าง plate ด้วย wash buffer จำนวน 5 ครั้ง และเติม HRP conjugate diluent 50 ไมโครลิตร ในแต่ละ well และบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ล้าง plate ด้วย wash buffer จำนวน 5 ครั้ง เติม chromogenic solution A 50 ไมโครลิตร และ chromogenic solution B 50 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ในที่มีด หลังจากนั้นเติม stop solution 50 ไมโครลิตร และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (optical density; OD) ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ภายใน 10 นาทีหลังจากการเติม stop solution นำค่า OD ที่ได้สร้าง standard curve แบบ logistic curve (4 parameters) จากนั้นคำนวณหาปริมาณของ iNOS ในตัวอย่างจากสมการของ standard curve

5.3.5 การตรวจวิเคราะห์ปริมาณของ COX-2 ในเนื้อเยื่ออักเสบ โดยใช้ enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (Oliveira *et al.*, 2014)

เตรียมตัวอย่างโดยปั่นเนื้อเยื่อเข้ากับ phosphate buffered saline (PBS) pH 7.4 ในอัตราส่วน 1:9 w/v ให้เป็นเนื้อเดียวกัน เพื่อให้ได้ตัวอย่างแบบ tissue homogenate จากนั้นนำไป centrifuge ที่ความเร็วรอบ 3,000 rpm เป็นเวลา 20 นาที และดูส่วนของ supernatant เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

การเตรียม reagent

เตรียม rat COX-2 standard จากความเข้มข้นแรก 64 นาโนกรัมต่อลิตร จากนั้นเจือจางแบบลำดับสอง ด้วย standard diluent ให้ได้ความเข้มข้นในช่วง 2-64 นาโนกรัมต่อลิตร เตรียม biotinylated Ab detection diluent โดยผสม biotinylated Ab เข้ากับ biotinylated diluent

เตรียม HRP conjugate diluent โดยใช้ concentrated HRP conjugate ผสมกับ HRP conjugate diluent

เตรียม wash buffer โดยใช้ double distilled water 450 มิลลิลิตร ผสมกับ concentrated wash solution 20 มิลลิลิตร

การทดสอบ ดูด standard และ sample 50 ไมโครลิตร ลงใน well และเติม biotinylated Ab detection diluent 50 ไมโครลิตร จากนั้นปิด well plate และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ล้าง plate ด้วย wash buffer จำนวน 5 ครั้ง และเติม HRP conjugate diluent 50 ไมโครลิตร ในแต่ละ well และบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ล้าง plate ด้วย wash buffer จำนวน 5 ครั้ง เติม chromogenic solution A 50 ไมโครลิตร และ chromogenic solution B 50 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ในที่มีด หลังจากนั้นเติม stop solution 50 ไมโครลิตร และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (optical density; OD) ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ภายใน 10 นาทีหลังจากการเติม stop solution นำค่า OD ที่ได้สร้าง standard curve แบบ logistic curve (4 parameters) จากนั้นคำนวณหาปริมาณของ COX-2 ในตัวอย่างจากสมการของ standard curve

#### 5.4 การศึกษาจุลกายวิภาคของเนื้อเยื่ออักเสบ (Histological study) (Cadirci *et al.*, 2016)

การเตรียมตัวอย่าง เก็บตัวอย่างเนื้อเยื่ออักเสบใน 10% neutral buffered formalin เพื่อคงสภาพของเนื้อเยื่อ จากนั้น dehydration ด้วย alcohol จากความเข้มข้นต่ำไปหาความเข้มข้นสูง และตรึงเนื้อเยื่อใน paraffin จากนั้นตัดเนื้อเยื่อให้มีความหนา 5 ไมโครเมตร ย้อมด้วย hematoxylin และ eosin (H&E) นำตัวอย่างที่ได้ไปส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง ที่กำลังขยาย 10X และ 40X เพื่อดูลักษณะของเนื้อเยื่อ ความหนาแน่นของเซลล์เม็ดเลือดขาว หรือสารน้ำที่คั่งอยู่ในเนื้อเยื่ออักเสบเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

### 6. การประเมินฤทธิ์ต่อการหายของแผลและกลไกการออกฤทธิ์ของ T-YaSP และ YaSP ในสัตว์ทดลอง

#### สัตว์ทดลอง

หนูปกติ ใช้ หนูขาวเพศผู้ สายพันธุ์ Wistar rats อายุ 2 เดือน น้ำหนัก 180-200 กรัม จากศูนย์สัตว์ทดลองมหาวิทยาลัย Yangzhou university, Yangzhou, Jiangsu, China การปฏิบัติกับสัตว์ทดลองได้รับการอนุมัติให้ทำการทดลองโดยคณะกรรมการจริยธรรมการใช้สัตว์ทดลอง ของศูนย์สัตว์ทดลองมหาวิทยาลัย Jiangsu university เลขที่ใบอนุญาต syxk-(su)-20130036 ก่อนการทดลองนำหนูทดลองปรับตัวให้เข้ากับสภาพของห้องทดลองเป็นเวลา 1 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ 22±2 องศาเซลเซียส มีระดับความชื้นสัมพัทธ์ 70% มีการควบคุมการปิด-เปิดไฟ 12:12 ชั่วโมง

หนูเบาหวานชนิดที่ 2 ใช้ หนูขาวเพศผู้ สายพันธุ์ Goto-Kakizaki (GK) rats อายุ 2 เดือน น้ำหนัก 180-200 กรัม จาก SHANGHAI SLAC LABORATORY ANIMAL CO. LTD การปฏิบัติกับสัตว์ทดลองได้รับการอนุมัติให้ทำการทดลองโดยคณะกรรมการจริยธรรมการใช้สัตว์ทดลอง ของศูนย์สัตว์ทดลองมหาวิทยาลัย Jiangsu university เลขที่ใบอนุญาต syxk-(su)-20130036 ก่อนการทดลองนำหนูทดลองปรับตัวให้เข้ากับสภาพของห้องทดลองเป็นเวลา 1 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ 22±2 องศาเซลเซียส มีระดับความชื้นสัมพัทธ์ 70% มีการควบคุมการปิด-เปิดไฟ 12:12 ชั่วโมง

6.1 การประเมินฤทธิ์ต่อการหายของแผลและกลไกการออกฤทธิ์ของ T-YaSP และ YaSP ในหนูปกติ (wistar rat)

6.1.1 การศึกษาฤทธิ์ต่อการหายของแผลของยาสมานแผลในรูปแบบ T-YaSP และ YaSP โดยใช้วิธี excision wound model ในหนูปกติ (Freitas *et al.*, 2017)

#### 6.1.1.1 ยาสมานแผลรูปแบบ T-YaSP

การเตรียมสาร เตรียมยาสมานแผลให้อยู่ในรูปแบบ T-YaSP

ก่อนการทดสอบ 1 วัน โคนขนบริเวณหลังของหนูทุกตัวขนาดพื้นที่ประมาณ 4×4 ตารางเซนติเมตร จากนั้นแบ่งหนูออกเป็น 3 กลุ่มๆ ละ 10 ตัว ดังนี้

- กลุ่มควบคุมลบ ได้รับการรักษาแผลด้วย oil-base solution
- กลุ่มควบคุมบวก ได้รับการรักษาแผลด้วยยาน้ำมันทงของนพคุณ
- กลุ่มทดสอบ ได้รับการรักษาแผลด้วยยาสมานแผลในรูปแบบ

#### T-YaSP

การทำให้เกิดแผลเปิด (excision wound) หนูทุกกลุ่มถูกทำให้สลบโดยฉีด pentobarbital เข้าทางช่องท้องขนาด 45 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของน้ำหนักตัว จากนั้นทำให้เกิดแผลเปิดแบบ full-thickness excision wound โดยใช้ biopsy punch บริเวณหลังของหนู (thoracolumbar region) ซึ่งเป็นการสร้างบาดแผลในระดับชั้นผิวหนังชนิด epidermal, dermal, hypodermal และ panniculus carnosus layers โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 6 มิลลิเมตร และแผลลึก 1 มิลลิเมตร ซึ่งหนูหนึ่งตัวจะมีแผล 2 แผล ล้างแผลด้วยน้ำเกลือ จากนั้นทาสารทดสอบบริเวณแผล 50 ไมโครลิตร หลังจากนั้นทำแผลและทาสารทดสอบใหม่วันเว้นวัน จนแผลหายสนิท

การวัดผล ทำโดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของแผลโดยใช้ digital vernier caliper บันทึกผลวันเว้นวัน จนแผลหายสนิท จากนั้นนำค่าที่ได้มาคำนวณเป็นพื้นที่ของแผล และคิดเป็นร้อยละการปิดของแผล (% wound closure) เมื่อเปรียบเทียบกับขนาดของแผลเริ่มต้น

เก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อปกติและเนื้อเยื่อแผลในวันที่ 7 และ 11 หลังการรักษา โดยทำให้หนูสลบด้วยคาร์บอนไดออกไซด์ ก่อนตัดชิ้นผิวหนังบริเวณที่ทำให้เกิดแผลและผิวหนังปกติ ล้างเนื้อเยื่อด้วย PBS แช่ตัวอย่างชิ้นเนื้อในไนโตรเจนเหลว และเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อศึกษากลไกต่อการหายของแผลต่อไป

### 6.1.1.2 ยาสมานแผลรูปแบบ YaSP

การเตรียมสาร เตรียมยาสมานแผลให้อยู่ในรูปแบบ YaSP

ก่อนการทดสอบ 1 วัน โคนขนบริเวณหลังของหนูทุกตัวขนาดพื้นที่ประมาณ 4x4 ตารางเซนติเมตร จากนั้นแบ่งหนุออกเป็น 3 กลุ่มๆ ละ 10 ตัว ดังนี้

- กลุ่มควบคุมลบ ได้รับการรักษาแผลด้วย base ointment
- กลุ่มควบคุมบวก ได้รับการรักษาแผลด้วย solcoseryl ointment
- กลุ่มทดสอบ ได้รับการรักษาแผลด้วยยาสมานแผลในรูปแบบ YaSP

การทำให้เกิดแผลเปิด (excision wound) หนูทุกกลุ่มถูกทำให้สลบโดยฉีด pentobarbital เข้าทางช่องท้องขนาด 45 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของน้ำหนักตัว จากนั้นทำให้เกิดแผลเปิดแบบ full-thickness excision wound โดยใช้ biopsy punch บริเวณหลังของหนู (thoracolumbar region) ซึ่งเป็นการสร้างบาดแผลในระดับชั้นผิวหนังชนิด epidermal, dermal, hypodermal และ panniculus carnosus layers โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 6 มิลลิเมตร และแผลลึก 1 มิลลิเมตร ซึ่งหนูหนึ่งตัวจะมีแผล 2 แผล ล้างแผลด้วยน้ำเกลือ จากนั้นทาสารทดสอบบริเวณแผล 50 ไมโครลิตร หลังจากนั้นทำแผลและทาสารทดสอบใหม่วันเว้นวัน จนแผลหายสนิท

การวัดผล ทำโดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของแผลโดยใช้ digital vernier caliper บันทึกผลวันเว้นวัน จนแผลหายสนิท จากนั้นนำค่าที่ได้มาคำนวณเป็นพื้นที่ของแผล และคิดเป็นร้อยละการปิดของแผล (% wound closure) เมื่อเปรียบเทียบกับขนาดของแผลเริ่มต้น

เก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อปกติและเนื้อเยื่อแผลในวันที่ 7 และ 11 หลังการรักษา โดยทำให้หนูทดลองจากไปอย่างสงบด้วยคาร์บอนไดออกไซด์ จากนั้น ตัดชั้นผิวหนังบริเวณที่ทำให้เกิดแผลและผิวหนังปกติออกจากตัวหนู ล้างเนื้อเยื่อด้วย PBS แช่ตัวอย่างชิ้นเนื้อในไนโตรเจนเหลว และเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อศึกษากลไกต่อการหายของแผลต่อไป

เตรียมตัวอย่างโดยปั่นเนื้อเยื่ออู้ง่เท่ากับ PBS pH 7.4 ในอัตราส่วน 1:9 (w/v) ให้เป็นเนื้อเดียวกัน เพื่อให้ได้ตัวอย่างแบบ tissue homogenate จากนั้นนำไป centrifuge ที่ความเร็วรอบ 3,000 rpm เป็นเวลา 20 นาที และดูดส่วนของ supernatant เพื่อใช้ทำการทดลองต่อไป

6.1.2 การตรวจวิเคราะห์ปริมาณของ transforming growth factor beta1 (TGF-beta1), vascular endothelial growth factor (VEGF), collagen type I และ collagen type III ในเนื้อเยื่อแผล

6.1.2.1 โดยใช้การตรวจวิเคราะห์ปริมาณของ TGF-beta1 โดยใช้ enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit

การเตรียม reagent

เตรียม rat TGF-beta1 standard จากความเข้มข้นแรก 3,200 นาโนกรัมต่อลิตร จากนั้นเจือจางแบบลำดับสอง ด้วย standard diluent ให้ได้ความเข้มข้นในช่วง 200-3,200 นาโนกรัมต่อลิตร เตรียม biotinylated Ab detection diluent โดยผสม biotinylated Ab เข้ากับ biotinylated diluent

เตรียม HRP conjugate diluent โดยใช้ concentrated HRP conjugate ผสมกับ HRP conjugate diluent

เตรียม wash buffer โดยใช้ double distilled water 480 มิลลิลิตร ผสมกับ concentrated wash solution 20 มิลลิลิตร

การทดสอบ ดูด standard และ sample 50 ไมโครลิตร ลงใน well และเติม biotinylated Ab detection diluent 50 ไมโครลิตร จากนั้นปิด well plate และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ล้าง plate ด้วย wash buffer จำนวน 5 ครั้ง และเติม HRP conjugate diluent 50 ไมโครลิตร ในแต่ละ well และบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ล้าง plate ด้วย wash buffer จำนวน 5 ครั้ง เติม chromogenic solution A 50 ไมโครลิตร และ chromogenic solution B 50 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ในที่มีด หลังจากนั้นเติม stop solution 50 ไมโครลิตร และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (optical density; OD) ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ภายใน 10 นาทีหลังจากการเติม stop solution นำค่า OD ที่ได้สร้าง standard curve แบบ logistic curve (4 parameters) จากนั้นคำนวณหาปริมาณของ TGF-beta1 ในตัวอย่างจากสมการของ standard curve

6.1.2.2 การตรวจวิเคราะห์ปริมาณของ VEGF ในเนื้อเยื่อแผล โดยใช้ enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit

การเตรียม reagent

เตรียม rat VEGF standard จากความเข้มข้นแรก 1,600 นาโนกรัมต่อลิตร จากนั้นเจือจางแบบลำดับสอง ด้วย standard diluent ให้ได้ความเข้มข้นในช่วง 50-1,600 นาโนกรัมต่อลิตร

เตรียม biotinylated Ab detection diluent โดยผสม biotinylated Ab เข้ากับ biotinylated diluent

เตรียม HRP conjugate diluent โดยใช้ concentrated HRP conjugate ผสมกับ HRP conjugate diluent

เตรียม wash buffer โดยใช้ double distilled water 480 มิลลิลิตร ผสมกับ concentrated wash solution 20 มิลลิลิตร

การทดสอบ ตูต standard และ sample 50 ไมโครลิตร ลงใน well และเติม biotinylated Ab detection diluent 50 ไมโครลิตร จากนั้นปิด well plate และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ล้าง plate ด้วย wash buffer จำนวน 5 ครั้ง และเติม HRP conjugate diluent 50 ไมโครลิตร ในแต่ละ well และบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ล้าง plate ด้วย wash buffer จำนวน 5 ครั้ง เติม chromogenic solution A 50 ไมโครลิตร และ chromogenic solution B 50 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ในที่มีด หลังจากนั้นเติม stop solution 50 ไมโครลิตร และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (optical density; OD) ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ภายใน 10 นาทีหลังจากการเติม stop solution นำค่า OD ที่ได้สร้าง standard curve แบบ logistic curve (4 parameters) จากนั้นคำนวณหาปริมาณของ VEGF ในตัวอย่างจากสมการของ standard curve

6.1.2.3 การตรวจวิเคราะห์ปริมาณของ collagen type I ในเนื้อเยื่อแผล  
โดยใช้ enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit

การเตรียม reagent

เตรียม rat collagen type I standard จากความเข้มข้นแรก 960 นาโน  
กรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นเจือจางแบบลำดับสอง ด้วย standard diluent ให้ได้ความเข้มข้นในช่วง  
30-960 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เตรียม biotinylated Ab detection diluent โดยผสม biotinylated  
Ab เข้ากับ biotinylated diluent

เตรียม HRP conjugate diluent โดยใช้ concentrated HRP conjugate  
ผสมกับ HRP conjugate diluent

เตรียม wash buffer โดยใช้ double distilled water 480 มิลลิลิตร ผสม  
กับ concentrated wash solution 20 มิลลิลิตร

การทดสอบ ดูด standard และ sample 50 ไมโครลิตร ลงใน well และ  
เติม biotinylated Ab detection diluent 50 ไมโครลิตร จากนั้นปิด well plate และบ่มที่อุณหภูมิ  
37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ล้าง plate ด้วย wash buffer จำนวน 5 ครั้ง และเติม HRP  
conjugate diluent 50 ไมโครลิตร ในแต่ละ well และบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที  
ล้าง plate ด้วย wash buffer จำนวน 5 ครั้ง เติม chromogenic solution A 50 ไมโครลิตร และ  
chromogenic solution B 50 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ในที่มีด  
หลังจากนั้นเติม stop solution 50 ไมโครลิตร และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (optical density;  
OD) ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ภายใน 10 นาทีหลังจากการเติม stop solution นำค่า  
OD ที่ได้สร้าง standard curve แบบ logistic curve (4 parameters) จากนั้นคำนวณหาปริมาณ  
ของ collagen type I ในตัวอย่างจากสมการของ standard curve



6.1.2.4 การตรวจวิเคราะห์ปริมาณของ collagen type III ในเนื้อเยื่อ  
 อักเสบ โดยใช้ enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit

การเตรียม reagent

เตรียม rat collagen type III standard จากความเข้มข้นแรก 800 นา  
 โนกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นเจือจางแบบลำดับสองด้วย standard diluent ให้ได้ความเข้มข้น  
 ในช่วง 25-800 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

เตรียม biotinylated Ab detection diluent โดยผสม biotinylated Ab  
 เข้ากับ biotinylated diluent

เตรียม HRP conjugate diluent โดยใช้ concentrated HRP conjugate  
 ผสมกับ HRP conjugate diluent

เตรียม wash buffer โดยใช้ double distilled water 480 มิลลิลิตร ผสม  
 กับ concentrated wash solution 20 มิลลิลิตร

การทดสอบ ตูต standard และ sample 50 ไมโครลิตร ลงใน well และ  
 เติม biotinylated Ab detection diluent 50 ไมโครลิตร จากนั้นปิด well plate และบ่มที่อุณหภูมิ  
 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ล้าง plate ด้วย wash buffer จำนวน 5 ครั้ง และเติม HRP  
 conjugate diluent 50 ไมโครลิตร ในแต่ละ well และบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที  
 ล้าง plate ด้วย wash buffer จำนวน 5 ครั้ง เติม chromogenic solution A 50 ไมโครลิตร และ  
 chromogenic solution B 50 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ในที่มีด  
 หลังจากนั้นเติม stop solution 50 ไมโครลิตร และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (optical density;  
 OD) ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ภายใน 10 นาทีหลังจากการเติม stop solution นำค่า  
 OD ที่ได้สร้าง standard curve แบบ logistic curve (4 parameters) จากนั้นคำนวณหาปริมาณ  
 ของ collagen type III ในตัวอย่างจากสมการของ standard curve

6.1.2.5 การศึกษาจุลกายวิภาคของเนื้อเยื่อแผล (Histological study)  
(Greenhalgh *et al.*, 1990)

การเตรียมตัวอย่าง เก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อแผลหลังจากการทดลองในวันที่ 7 และ 11 ใน 10% neutral buffered formalin เพื่อคงสภาพของเนื้อเยื่อ จากนั้น dehydration ด้วย alcohol จากความเข้มข้นต่ำไปหาความเข้มข้นสูง และตรึงเนื้อเยื่อใน paraffin จากนั้นตัดเนื้อเยื่อให้มีความหนา 5 ไมโครเมตร ย้อมด้วย hematoxylin, eosin (H&E stain) และ Masson's trichrome staining นำตัวอย่างไปส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยาย 40X เพื่อดูลักษณะของเนื้อเยื่อผิวหนังบริเวณแผล ความหนาแน่นของเซลล์อักเสบ เซลล์ fibroblast หรือลักษณะการสร้าง collagen บริเวณแผล เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

6.2 การศึกษาฤทธิ์ต่อการหายของแผลและกลไกการออกฤทธิ์ของ T-YaSP และ YaSP ในหนูเบาหวาน (GK rat)

6.2.1 การศึกษาฤทธิ์ต่อการหายของแผลของยาสมานแผลในรูปแบบ T-YaSP และ YaSP โดยใช้วิธี excision wound model ในหนูปกติ (Freitas *et al.*, 2017)

#### 6.2.1.1 ยาสมานแผลรูปแบบ T-YaSP

การเตรียมสาร เตรียมยาสมานแผลให้อยู่ในรูปแบบ T-YaSP

การทดสอบ ก่อนการทดสอบ 1 วัน โคนขนบริเวณหลังของหนูทุกตัว ขนาดพื้นที่ประมาณ 4x4 ตารางเซนติเมตร จากนั้นแบ่งหนูออกเป็น 3 กลุ่มๆ ละ 10 ตัว ดังนี้

- กลุ่มควบคุมลบ ได้รับการรักษาแผลด้วย oil-base solution
- กลุ่มควบคุมบวก ได้รับการรักษาแผลด้วยยาน้ำมันทงหนพคุณ
- กลุ่มทดสอบ ได้รับการรักษาแผลด้วยยาสมานแผลในรูปแบบ T-YaSP

การทำให้เกิดแผลเปิด (excision wound) หนูทุกกลุ่มถูกทำให้สลบโดยฉีด pentobarbital เข้าทางช่องท้องขนาด 45 มิลลิกรัม/กิโลกรัมของน้ำหนักตัว จากนั้นทำให้เกิดแผลเปิดแบบ full-thickness excision wound โดยใช้ biopsy punch บริเวณหลังของหนู (thoracolumbar region) ซึ่งเป็นการสร้างบาดแผลในระดับชั้นผิวหนังชนิด epidermal, dermal, hypodermal และ panniculus carnosus layers โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 6 มิลลิเมตร และแผลลึก 1 มิลลิเมตร ซึ่งหนูหนึ่งตัวจะมีแผล 2 แผล ล้างแผลด้วยน้ำเกลือ จากนั้นทาสารทดสอบบริเวณแผล 50 ไมโครลิตร ตามกลุ่มที่แบ่งไว้ หลังจากนั้นทำแผลและทาสารทดสอบใหม่วันเว้นวันจนแผลหายสนิท

การตรวจวัดค่าระดับน้ำตาลในเลือดหลังการอดอาหาร ก่อนการทำให้เกิดแผล ทำการเก็บเลือดบริเวณปลายหางของหนูทดลองทุกตัว และตรวจด้วยเครื่อง glucometer บันทึกข้อมูลระดับน้ำตาลในเลือดเริ่มต้น และตรวจซ้ำระหว่างทำการทดลองในวันที่ 7 และ 11

การวัดผล ทำโดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของแผลโดยใช้ digital vernier caliper บันทึกผลวันเว้นวัน จนแผลหายสนิท จากนั้นนำค่าที่ได้มาคำนวณเป็นพื้นที่ของแผล และคิดเป็นร้อยละการปิดของแผล (% wound closure) เมื่อเปรียบเทียบกับขนาดของแผลเริ่มต้น

เก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อปกติและเนื้อเยื่อแผลในวันที่ 11 หลังการรักษา โดยทำให้หนูทดลองจากไปอย่างสงบด้วยคาร์บอนไดออกไซด์ จากนั้น ตัดชั้นผิวหนังบริเวณที่ทำให้เกิดแผลและผิวหนังปกติออกจากตัวหนู ล้างเนื้อเยื่อด้วย PBS แช่ตัวอย่างเนื้อเยื่อในไนโตรเจนเหลว และเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อศึกษากลไกต่อการหายของแผลต่อไป

### 6.2.1.2 ยาสมานแผลรูปแบบ YaSP

การเตรียมสาร เตรียมยาสมานแผลให้อยู่ในรูปแบบ YaSP

ก่อนการทดสอบ 1 วัน โคนขนบริเวณหลังของหนูทุกตัวขนาดพื้นที่ประมาณ 4x4 ตารางเซนติเมตร จากนั้นแบ่งหนุออกเป็น 3 กลุ่มๆ ละ 10 ตัว ดังนี้

- กลุ่มควบคุมลบ ได้รับการรักษาแผลด้วย base ointment
- กลุ่มควบคุมบวก ได้รับการรักษาแผลด้วย solcoseryl ointment
- กลุ่มทดสอบ ได้รับการรักษาแผลด้วยยาสมานแผลในรูปแบบ YaSP

การทำให้เกิดแผลเปิด (excision wound) หนูทุกกลุ่มถูกทำให้สลบโดยฉีด pentobarbital เข้าทางช่องท้องขนาด 45 มิลลิกรัม/กิโลกรัมของน้ำหนักตัว จากนั้นทำให้เกิดแผลเปิดแบบ full-thickness excision wound โดยใช้ biopsy punch บริเวณหลังของหนู (thoracolumbar region) ซึ่งเป็นการสร้างบาดแผลในระดับชั้นผิวหนังชนิด epidermal, dermal, hypodermal และ panniculus carnosus layers โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 6 มิลลิเมตร และแผลลึก 1 มิลลิเมตร ซึ่งหนูหนึ่งตัวจะมีแผล 2 แผล ล้างแผลด้วยน้ำเกลือ จากนั้นทาสารทดสอบบริเวณแผล 50 ไมโครลิตร ตามกลุ่มที่แบ่งไว้ หลังจากนั้นทำแผลและทาสารทดสอบใหม่วันเว้นวันจนแผลหายสนิท

การตรวจวัดค่าระดับน้ำตาลในเลือดหลังการอดอาหาร ก่อนการทำให้เกิดแผล ทำการเก็บเลือดบริเวณปลายหางของหนูทดลองทุกตัว และตรวจด้วยเครื่อง glucometer บันทึกข้อมูลระดับน้ำตาลในเลือดเริ่มต้น และตรวจซ้ำระหว่างทำการทดลองในวันที่ 7 และ 11

การวัดผล ทำโดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของแผลโดยใช้ digital vernier caliper บันทึกผลวันเว้นวัน จนแผลหายสนิท จากนั้นนำค่าที่ได้มาคำนวณเป็นพื้นที่ของแผล และคิดเป็นร้อยละการปิดของแผล (% wound closure) เมื่อเปรียบเทียบกับขนาดของแผลเริ่มต้น

เก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อปกติและเนื้อเยื่อแผลในวันที่ 11 หลังการรักษา โดยทำให้หนูทดลองจากไปอย่างสงบด้วยคาร์บอนไดออกไซด์ จากนั้น ตัดชั้นผิวหนังบริเวณที่ทำให้เกิดแผลและผิวหนังปกติออกจากตัวหนู ล้างเนื้อเยื่อด้วย PBS แช่ตัวอย่างเนื้อเยื่อในไนโตรเจนเหลว และเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อศึกษาการหายของแผลต่อไป

เตรียมตัวอย่างโดยปั่นเนื้อเยื่ออู้ง่เท่ากับ PBS pH 7.4 ในอัตราส่วน 1:9 (w/v) ให้เป็นเนื้อเดียวกัน เพื่อให้ได้ตัวอย่างแบบ tissue homogenate จากนั้นนำไป centrifuge ที่ความเร็วรอบ 3,000 rpm เป็นเวลา 20 นาที และดูส่วนของ supernatant เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

6.2.2 การตรวจวิเคราะห์ปริมาณของ transforming growth factor beta1 (TGF-beta1), vascular endothelial growth factor (VEGF), collagen type I และ collagen type III ในเนื้อเยื่อแผล

6.2.2.1 โดยใช้การตรวจวิเคราะห์ปริมาณของ TGF-beta1 โดยใช้ enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit

การเตรียม reagent

เตรียม rat TGF-beta1 standard จากความเข้มข้นแรก 3,200 นาโนกรัมต่อลิตร จากนั้นเจือจางแบบลำดับสอง ด้วย standard diluent ให้ได้ความเข้มข้นในช่วง 200-3,200 นาโนกรัมต่อลิตร เตรียม biotinylated Ab detection diluent โดยผสม biotinylated Ab เข้ากับ biotinylated diluent

เตรียม HRP conjugate diluent โดยใช้ concentrated HRP conjugate ผสมกับ HRP conjugate diluent

เตรียม wash buffer โดยใช้ double distilled water 480 มิลลิลิตร ผสมกับ concentrated wash solution 20 มิลลิลิตร

การทดสอบ ดูด standard และ sample 50 ไมโครลิตร ลงใน well และเติม biotinylated Ab detection diluent 50 ไมโครลิตร จากนั้นปิด well plate และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ล้าง plate ด้วย wash buffer จำนวน 5 ครั้ง และเติม HRP conjugate diluent 50 ไมโครลิตร ในแต่ละ well และบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ล้าง plate ด้วย wash buffer จำนวน 5 ครั้ง เติม chromogenic solution A 50 ไมโครลิตร และ chromogenic solution B 50 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ในที่มีด หลังจากนั้นเติม stop solution 50 ไมโครลิตร และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (optical density; OD) ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ภายใน 10 นาทีหลังจากการเติม stop solution นำค่า OD ที่ได้สร้าง standard curve แบบ logistic curve (4 parameters) จากนั้นคำนวณหาปริมาณของ TGF-beta1 ในตัวอย่างจากสมการของ standard curve

6.2.2.2 การตรวจวิเคราะห์ปริมาณของ VEGF ในเนื้อเยื่อแผล โดยใช้ enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit

การเตรียม reagent

เตรียม rat VEGF standard จากความเข้มข้นแรก 1,600 นาโนกรัมต่อลิตร จากนั้นเจือจางแบบลำดับสอง ด้วย standard diluent ให้ได้ความเข้มข้นในช่วง 50-1,600 นาโนกรัมต่อลิตร

เตรียม biotinylated Ab detection diluent โดยผสม biotinylated Ab เข้ากับ biotinylated diluent

เตรียม HRP conjugate diluent โดยใช้ concentrated HRP conjugate ผสมกับ HRP conjugate diluent

เตรียม wash buffer โดยใช้ double distilled water 480 มิลลิลิตร ผสมกับ concentrated wash solution 20 มิลลิลิตร

การทดสอบ ดูด standard และ sample 50 ไมโครลิตร ลงใน well และเติม biotinylated Ab detection diluent 50 ไมโครลิตร จากนั้นปิด well plate และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ล้าง plate ด้วย wash buffer จำนวน 5 ครั้ง และเติม HRP conjugate diluent 50 ไมโครลิตร ในแต่ละ well และบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ล้าง plate ด้วย wash buffer จำนวน 5 ครั้ง เติม chromogenic solution A 50 ไมโครลิตร และ chromogenic solution B 50 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ในที่มีด หลังจากนั้นเติม stop solution 50 ไมโครลิตร และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (optical density; OD) ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ภายใน 10 นาทีหลังจากการเติม stop solution นำค่า OD ที่ได้สร้าง standard curve แบบ logistic curve (4 parameters) จากนั้นคำนวณหาปริมาณของ VEGF ในตัวอย่างจากสมการของ standard curve

6.2.2.3 การตรวจวิเคราะห์ปริมาณของ collagen type I ในเนื้อเยื่อแผล  
โดยใช้ enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit

การเตรียม reagent

เตรียม rat collagen type I standard จากความเข้มข้นแรก 960 นาโน  
กรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นเจือจางแบบลำดับสอง ด้วย standard diluent ให้ได้ความเข้มข้นในช่วง  
30-960 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เตรียม biotinylated Ab detection diluent โดยผสม biotinylated  
Ab เข้ากับ biotinylated diluent

เตรียม HRP conjugate diluent โดยใช้ concentrated HRP conjugate  
ผสมกับ HRP conjugate diluent

เตรียม wash buffer โดยใช้ double distilled water 480 มิลลิลิตร ผสม  
กับ concentrated wash solution 20 มิลลิลิตร

การทดสอบ ดูด standard และ sample 50 ไมโครลิตร ลงใน well และ  
เติม biotinylated Ab detection diluent 50 ไมโครลิตร จากนั้นปิด well plate และบ่มที่อุณหภูมิ  
37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ล้าง plate ด้วย wash buffer จำนวน 5 ครั้ง และเติม HRP  
conjugate diluent 50 ไมโครลิตร ในแต่ละ well และบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที  
ล้าง plate ด้วย wash buffer จำนวน 5 ครั้ง เติม chromogenic solution A 50 ไมโครลิตร และ  
chromogenic solution B 50 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ในที่มีด  
หลังจากนั้นเติม stop solution 50 ไมโครลิตร และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (optical density;  
OD) ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ภายใน 10 นาทีหลังจากการเติม stop solution นำค่า  
OD ที่ได้สร้าง standard curve แบบ logistic curve (4 parameters) จากนั้นคำนวณหาปริมาณ  
ของ collagen type I ในตัวอย่างจากสมการของ standard curve

6.2.2.4 การตรวจวิเคราะห์ปริมาณของ collagen type III ในเนื้อเยื่อ  
อวัยวะ โดยใช้ enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit

การเตรียม reagent

เตรียม rat collagen type III standard จากความเข้มข้นแรก 800 นา  
โนกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นเจือจางแบบลำดับสองด้วย standard diluent ให้ได้ความเข้มข้น  
ในช่วง 25-800 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

เตรียม biotinylated Ab detection diluent โดยผสม biotinylated Ab  
เข้ากับ biotinylated diluent

เตรียม HRP conjugate diluent โดยใช้ concentrated HRP conjugate  
ผสมกับ HRP conjugate diluent

เตรียม wash buffer โดยใช้ double distilled water 480 มิลลิลิตร ผสม  
กับ concentrated wash solution 20 มิลลิลิตร

การทดสอบ ตูต standard และ sample 50 ไมโครลิตร ลงใน well และ  
เติม biotinylated Ab detection diluent 50 ไมโครลิตร จากนั้นปิด well plate และบ่มที่อุณหภูมิ  
37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ล้าง plate ด้วย wash buffer จำนวน 5 ครั้ง และเติม HRP  
conjugate diluent 50 ไมโครลิตร ในแต่ละ well และบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที  
ล้าง plate ด้วย wash buffer จำนวน 5 ครั้ง เติม chromogenic solution A 50 ไมโครลิตร และ  
chromogenic solution B 50 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ในที่มีด  
หลังจากนั้นเติม stop solution 50 ไมโครลิตร และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (optical density;  
OD) ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ภายใน 10 นาทีหลังจากการเติม stop solution นำค่า  
OD ที่ได้สร้าง standard curve แบบ logistic curve (4 parameters) จากนั้นคำนวณหาปริมาณ  
ของ collagen type III ในตัวอย่างจากสมการของ standard curve



#### 6.2.2.5 การศึกษาทางจุลกายวิภาคของเนื้อเยื่อแผล (Histological study) (Greenhalgh *et al.*, 1990)

การเตรียมตัวอย่าง เก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อแผลหลังจากการทดลองในหนูที่ 11 ใน 10% neutral buffered formalin เพื่อคงสภาพของเนื้อเยื่อ จากนั้น dehydration ด้วย alcohol จากความเข้มข้นต่ำไปหาความเข้มข้นสูง และตรึงเนื้อเยื่อใน paraffin จากนั้นตัดเนื้อเยื่อให้มีความหนา 5 ไมโครเมตร ย้อมด้วย hematoxylin, eosin (H&E stain) และ Masson's trichrome staining ดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง ที่กำลังขยาย 40X เพื่อดูลักษณะของเนื้อเยื่อผิวหนังบริเวณแผล ความหนาแน่นของเซลล์อักเสบ เซลล์ fibroblast หรือลักษณะการสร้าง collagen บริเวณแผล เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

### 7. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การวิเคราะห์ข้อมูลฤทธิ์ต้านการอักเสบ และฤทธิ์ส่งเสริมกระบวนการหายของแผลทั้งในระดับหลอดทดลองและสัตว์ทดลองของตำรับยาสมานแผล โดยใช้การวิเคราะห์ ความแปรปรวนด้วยวิธี One- Way (Analysis of Variance, ANOVA) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's post hoc test ( $p$  value < 0.05 or 0.001) โดยใช้ SPSS for Window Version 19

การวิเคราะห์ข้อมูลเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านการอักเสบ และฤทธิ์ส่งเสริมกระบวนการหายของแผลทั้งในสัตว์ทดลองของตำรับยาสมานแผลทั้ง 2 รูปแบบ โดยใช้การวิเคราะห์ ความแปรปรวนด้วยวิธี Independent samples T-Test ( $p$  value < 0.05) โดยใช้ SPSS for Window Version 19

## บทที่ 3

### ผลการทดลอง

#### 1. การตรวจสอบคุณภาพสมุนไพรองค์ประกอบในตำรับยาสมานแผลตามแนวทางขององค์การอนามัยโลก

##### 1.1 การตรวจลักษณะทางกายภาพของสมุนไพร

###### 1.1.1 การตรวจลักษณะทางมหภาคของสมุนไพร

จากการศึกษาลักษณะทางมหภาคของสมุนไพรองค์ประกอบในตำรับยาสมานแผล ซึ่งประกอบด้วย เหง้าขมิ้นชัน เปลือกมังคุด เมล็ดข้าวสาร และเมล็ดหมากสง พบว่า

เหง้าขมิ้นชัน มีลักษณะเป็นรูปไข่ โค้งเล็กน้อย ยาวประมาณ 10-13 เซนติเมตร หนาประมาณ 1-2 เซนติเมตร และมีแงแตกแขนงทรงกระบอกออกด้านข้างทั้งสองด้านเป็นปุ่มเล็ก ๆ ลักษณะภายนอกมีสีเหลืองอมน้ำตาล ภายในสีเหลืองเข้มหรือสีส้ม เมื่อบดเป็นผงมีสีเหลืองทอง มีกลิ่นหอมเฉพาะตัว และมีรสฝาด เผ็ดเล็กน้อย

เปลือกมังคุด มีลักษณะเปลือกผลกลมและแข็ง หนาประมาณ 0.5-1 เซนติเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 5-6 เซนติเมตร ผิวภายนอกเปลือกสีม่วงเข้ม และภายในเปลือกมีสีม่วงอมแดง เมื่อบดเป็นผงมีสีน้ำตาลอ่อน มีกลิ่นหอม และมีรสฝาด

เมล็ดหมากสง มีลักษณะรูปร่างค่อนข้างกลมหรือรี เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2-2.5 เซนติเมตร ผิวของเมล็ดมีลายเส้นสีเหลืองถึงสีน้ำตาล ลักษณะลายเส้นเป็นร่องเชื่อมต่อกันเป็นร่างแหรอบ ๆ เมล็ด เนื้อในเมล็ดแข็ง เมื่อบดเป็นผงมีสีน้ำตาลเข้ม มีกลิ่นหอมฉุน และมีรสฝาด

เมล็ดข้าวสาร (สายพันธุ์ สังข์หยดพัทลุง) เมล็ดยาวประมาณ 0.5-0.7 เซนติเมตร และกว้างประมาณ 0.1 เซนติเมตร มีสีน้ำตาล เมื่อบดเป็นผงมีสีขาวอมน้ำตาล มีกลิ่นหอม และมีรสหวาน

### 1.1.2 การตรวจลักษณะทางจุลภาคของผงยาสมุนไพร

จากการศึกษารูปร่าง ลักษณะของเซลล์ และโครงสร้างของเนื้อเยื่อผงยาสมุนไพรภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า ผงยาจากเหง้าขมิ้นชันพบเนื้อเยื่อและเซลล์ชนิดต่าง ๆ เรียงลำดับจากมากไปน้อยดังนี้ starch granules, parenchyma cell, spiral vessel, scalariform vessel, bordered pit vessel, cork cell, trichome, fiber และ oil drop ดังแสดงในรูปที่ 7

ผงยาจากเปลือกมังคุด พบเซลล์ชนิดต่าง ๆ เรียงลำดับจากมากไปน้อยดังนี้ sclerenchyma cell, aleurone grains, epidermis cell, vessels, sclereids cell, bordered pitted vessel และ fiber ดังแสดงในรูปที่ 7

ผงยาจากเมล็ดข้าวสาร พบเซลล์ชนิดต่าง ๆ เรียงลำดับจากมากไปน้อยดังนี้ starch granules, endosperm cell, aleurone grains, epidermis cell, bordered pitted vessel, sclerenchyma cell และ trichome ดังแสดงในรูปที่ 7

ผงยาจากเมล็ดหมากสง พบเซลล์ชนิดต่าง ๆ เรียงลำดับจากมากไปน้อยดังนี้ endosperm cell, aleurone grains, cell containing brown pigment, testa rumination, stone cell, sclereid cell, fiber, bordered pitted vessel, pitted tracheidal vessel และ oil drop ดังแสดงในรูปที่ 7

### 1.2 การตรวจสอบวัตถุเจือปนในผงสมุนไพร

จากการตรวจสอบคุณภาพของสมุนไพรตามแนวทางขององค์การอนามัยโลก ในด้านของความปลอดภัยของสมุนไพรองค์ประกอบในตำรับยาสมุนไพร พบว่า ขมิ้นชัน และมังคุด มีปริมาณสิ่งแปลกปลอม ร้อยละ 0.06 และ 0.03 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ ส่วนข้าวสาร และหมากสง มีปริมาณสิ่งแปลกปลอมร้อยละ 0.01 โดยน้ำหนัก ปริมาณความชื้น ของขมิ้นชัน มังคุด และหมากสง มีร้อยละ 7.10, 3.49 และ 3.86 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ ปริมาณเถ้ารวมของขมิ้นชัน มังคุด ข้าวสาร และหมากสง มีร้อยละ 5.69, 2.90, 2.26 และ 1.73 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ ปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรด ของขมิ้นชัน และมังคุด มีร้อยละ 0.19 และ 0.22 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ ส่วนข้าวสาร และหมากสง มีปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรด ร้อยละ 0.14 โดยน้ำหนัก ดังแสดงในตารางที่ 7

### 1.3 การตรวจสอบปริมาณสารสำคัญในสมุนไพร

การตรวจหาปริมาณสารสกัดด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ ของสมุนไพรองค์ประกอบในตำรับยาสมุนไพร พบว่า ร้อยละของสารสกัดด้วยเอทานอล จากขมิ้นชัน มังคุด ข้าวสาร และหมากสง เท่ากับร้อยละ 24.09, 11.97, 4.08 และ 26.28 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ ร้อยละของสารสกัดด้วยน้ำ จากขมิ้นชัน มังคุด ข้าวสาร และหมากสง เท่ากับร้อยละ 27.99, 20.01, 3.38 และ 24.75 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ ร้อยละของสารสกัดด้วยเฮกเซนจากขมิ้นชัน เท่ากับร้อยละ 11.74

โดยน้ำหนัก และจากการตรวจหาปริมาณสารสำคัญของสมุนไพรประกอบในตำรับยาสมานแผลพบว่า หนามเสี้ยวมีปริมาณแทนนิน ร้อยละ 49.91 โดยน้ำหนัก ขมิ้นชัน มีปริมาณของน้ำมันหอมระเหย ร้อยละ 7.33 โดยปริมาตรต่อมวล และมีปริมาณเคอร์คูมินอยด์ ร้อยละ 6.69 โดยน้ำหนัก ดังแสดงในตารางที่ 7

## 2. การประเมินคุณสมบัติทางเคมีด้วย liquid chromatograph-mass spectrometer (LC-MS) และ การทดสอบหาปริมาณสารสำคัญ ด้วย high performance liquid chromatography (HPLC)








2.1 การประเมินคุณสมบัติทางเคมีด้วย LC-MS จากการประเมินคุณสมบัติทางเคมีพบว่า สารสกัดด้วยเอทานอลจากขมิ้นชัน (E-CL) มีสารองค์ประกอบที่ตรวจพบทั้งหมด 24 ชนิด สารสกัดด้วยเอทานอลจากมังคุด (E-GM) มีสารองค์ประกอบที่ตรวจพบทั้งหมด 39 ชนิด สารสกัดด้วยเอทานอลจากข้าวสาร (E-OS) มีสารองค์ประกอบที่ตรวจพบทั้งหมด 32 ชนิด สารสกัดด้วยเอทานอลจากหนามเสี้ยว (E-AC) มีสารองค์ประกอบที่ตรวจพบทั้งหมด 11 ชนิด และจากการประเมินคุณสมบัติทางเคมีด้วย LC-MS ของตำรับยาสมานแผลทั้ง 3 รูปแบบ ได้แก่ สารสกัดด้วยเอทานอลจากตำรับยาสมานแผล (E-YaSP) พบว่ามีสารองค์ประกอบที่ตรวจพบทั้งหมด 37 ชนิด โดยพบว่าเป็นสารสำคัญของขมิ้นชัน 8 ชนิด มังคุด 15 ชนิด และหนามเสี้ยว 1 ชนิด ยาสมานแผลในรูปแบบ T-YaSP มีสารองค์ประกอบที่ตรวจพบทั้งหมด 30 ชนิด โดยพบว่าเป็นสารสำคัญของขมิ้นชัน 1 ชนิด และมังคุด 3 ชนิด และยาสมานแผลในรูปแบบ YaSP มีสารองค์ประกอบที่ตรวจพบทั้งหมด 19 ชนิด โดยพบว่าเป็นสารสำคัญของขมิ้นชัน 4 ชนิด และมังคุด 1 ชนิด นอกจากนี้พบว่าตำรับยาสมานแผลทั้ง 3 รูปแบบ มีสารสำคัญ 2 ชนิดที่ตรวจพบเหมือนกัน คือ alpha-mangostin และ curcumin ดังแสดงในรูปที่ 8 และตารางที่ 8

2.2 การทดสอบหาปริมาณสาร alpha-mangostin, curcumin และ arecoline ในยาสมานแผลรูปแบบ T-YaSP และ YaSP โดยใช้เครื่อง HPLC

จากการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญโดยใช้ alpha-mangostin curcumin และ arecoline เป็นสารมาตรฐาน พบว่า T-YaSP มีปริมาณ alpha-mangostin สูงสุด เท่ากับ  $2.472 \pm 0.002$  มิลลิกรัมต่อกรัม รองลงมา คือ curcumin เท่ากับ  $2.399 \pm 0.005$  มิลลิกรัมต่อกรัม และ arecoline เท่ากับ  $0.017 \pm 0.000$  มิลลิกรัมต่อกรัม ตามลำดับ ตำรับยาสมานแผลในรูปแบบ YaSP เมื่อนำไปตรวจวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ พบว่า มีปริมาณของ alpha-mangostin สูงสุด เท่ากับ  $0.415 \pm 0.000$  มิลลิกรัมต่อกรัม รองลงมาคือ curcumin เท่ากับ  $0.366 \pm 0.001$  มิลลิกรัมต่อกรัม และ arecoline น้อยกว่า 0.001 มิลลิกรัมต่อกรัม ตามลำดับ แสดงดังตารางที่ 9

	CL	GM	OS	AC
Bordered pitted vessels				
Aleurone grains	NF			
Fiber			NF	
Oil drop		NF	NF	
Starch granules		NF		NF
Trichome		NF		NF
Epidermis cell	NF			NF
Sclerenchyma cell	NF			NF
Endosperm cell	NF	NF		
Scalariform vessel			NF	NF
Sclereids cell	NF		NF	

រូបភាព 7 Powder microscopy of *Curcuma longa* (CL), *Garcinia mangostana* (GM), *Oryza sativa* (OS) and *Areca catechu* (AC). NF; Not found.

	<b>CL</b>	<b>GM</b>	<b>OS</b>	<b>AC</b>
Cork cell		NF	NF	NF
Spiral vessel		NF	NF	NF
Parenchyma cell		NF	NF	NF
Pitted tracheidal vessel	NF	NF	NF	
Stone cell	NF	NF	NF	
Testa rumination	NF	NF	NF	
Cell containing brown pigment	NF	NF	NF	

រូបទី 7 (Continued)

ตารางที่ 7 Physicochemical parameters and phytochemical screening of herbal components of Ya-Samarn-Phlae (YaSP).

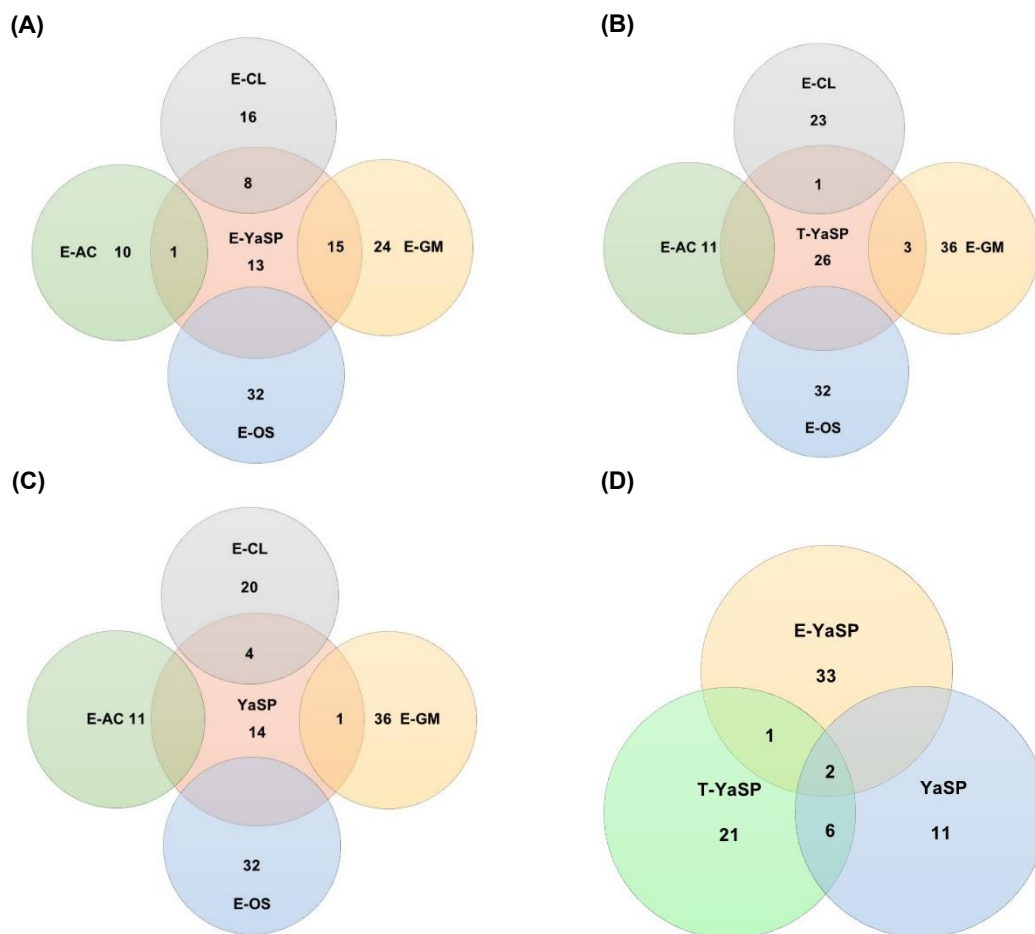
Parameters**	<i>C. longa</i>	<i>G. mangostana</i>	<i>O. sativ a</i>	<i>A. catechu</i>
Foreign matter	0.06±0.03 (≤2.00)*	0.03±0.01	0.01±0.01 (≤2.00)#	0.01±0.02 (≤1.00)*
Loss on drying	7.10±0.16 (≤10.00)	3.49±0.04	NA	3.86±0.64 (≤12.00)
Total ash content	5.69±0.74 (≤8.00)	2.90±0.66	2.26±0.12 (≤6.00)	1.73±0.02 (≤2.00)
Acid-insoluble ash	0.19±0.01 (≤1.00)	0.22±0.03	0.14±0.03 (≤5.00)	0.14±0.01 (≤1.00)
Ethanol-soluble extractive	24.09±0.54 (≥10.00)	11.97±0.41	4.08±0.47 (≥1.00)	26.28±1.71 (≥25.00)
Water-soluble extractive	27.99±1.08 (≥9.00)	20.01±0.28	3.38±0.05 (≥1.00)	24.75±0.09 (≥10.00)
Hexane-soluble extractive	11.74±0.91 (≥5.00)	NA	NA	NA
Tannin content	NA	NA	NA	49.91±0.93 (≥24.00)
Volatile oil content	7.33±0.58 (≥6.00)	NA	NA	NA
Curcuminoid content	6.69±0.43 (≥5.00)	NA	NA	NA

NA; Not applicable

\* Standard parameters described in Thai Herbal Pharmacopoeia; # Standard parameters described in Ayurvedic pharmacopoeia of India.

\*\* With exception of the volatile oil content expressed as %v/w, all parameters were presented as %w/w.

NA; Not applicable



รูปที่ 8 The pie chart showing a number of phytochemical constituents of E-YaSP (A), T-YaSP (B) and YaSP (C) analyzed by liquid chromatograph-mass spectrometer (LC-MS).



ตารางที่ 8 The phytochemical constituents of E-YaSP, T-YaSP and YaSP analyzed by liquid chromatograph-mass spectrometer (LC-MS).

Compound identification	E-YaSP		T-YaSP		YaSP	
	Math score	High	Math score	High	Math score	High
(+)-Arnicenone	99.47	1991062	-	-	-	-
Curcumenol	99.24	12821731	-	-	-	-
Beta-dihydrorotenone	98.12	2063657	98.97	3119201	-	-
4-Hydroxy-3,5,4'- trimethoxystilbene	-	-	98.92	2007513	-	-
Dehydrodihydrorotenone	98.9	1380424	-	-	-	-
6,8-Dihydroxy-1,7-diprenyl xanthone-2-carboxylic acid	-	-	98.30	469352	48.59	161122
Garcinone E	-	-	98.25	477847	-	-
Curcumin	98.22	4630446	96.75	6177038	95.93	3012554

-; Not detected.

ตารางที่ 8 (Continued)

Compound identification	E-YaSP		T-YaSP		YaSP	
	Math score	High	Math score	High	Math score	High
Alpha-mangostin	98.21	7408722	88.98	630322	96.29	6324476
Aurmillone	98.01	5002346	-	-	-	-
Chavicol	97.95	2339888	-	-	-	-
Archangelicin	97.81	8812175	-	-	-	-
Demethoxycurcumin	97.77	4658778	-	-	-	-
Mallotochromene	-	-	92.91	159316	-	-
Bisdemethoxycurcumin	-	-	-	-	96.21	348742
Genistein	-	-	95.96	172264	-	-
Mangostenol	-	-	95.58	377445	-	-
Ponganone VIII	-	-	92.79	1237961	-	-

-; Not detected.

ตารางที่ 8 (Continued)

Compound identification	E-YaSP		T-YaSP		YaSP	
	Math score	High	Math score	High	Math score	High
Dihydroisoalantolactone	-	-	-	-	49.72	459717
Dihydrorotenone	-	-	-	-	49.40	596486
Methuyl tanshinonate	-	-	-	-	48.99	295871
2,3-Dihydroabscisic alcohol	-	-	-	-	48.29	149497
Glyinflarin H	-	-	-	-	48.20	197925
Verimol C	-	-	-	-	48.04	496008

-; Not detected.

ตารางที่ 9 Contents of alpha-mangostin and curcumin in Ya-Samarn-Phlae by high performance liquid chromatography (HPLC) method.

Active constituents	Content of active constituent (mg/g)		Calibration equation ( $r^2$ )	RT (mins)
	T-YaSP	YaSP		
Alpha-mangostin	2.472±0.002	0.415±0.000	y=54.542x-3.743 (0.999)	11.041
Curcumin	2.399±0.005	0.366±0.001	y=255.51x+38.76 (0.999)	4.690

Each value represents as the mean±SD of three repeated.

### 3. การวิเคราะห์ฤทธิ์ทางชีวภาพที่เกี่ยวข้องกับการสมานแผลของตำรับยาสมานแผลในหลอดทดลองและความปลอดภัยของยาสมานแผล

**3.1 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ nitric oxide (NO) ของตำรับยาสมานแผล**  
จากการวิเคราะห์การเข้าจับโดยตรงกับอนุมูลอิสระ NO ของ E-YaSP, T-YaSP และ YaSP พบว่า E-YaSP ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าร้อยละในการเข้าจับโดยตรงกับอนุมูลอิสระ NO เท่ากับ 34.56 T-YaSP ที่ความเข้มข้น 1% (v/v) มีค่าร้อยละ 52.88 และ YaSP ความเข้มข้น 1% (w/v) มีค่าร้อยละ 41.14 ตามลำดับ แสดงดังรูปที่ **9A**

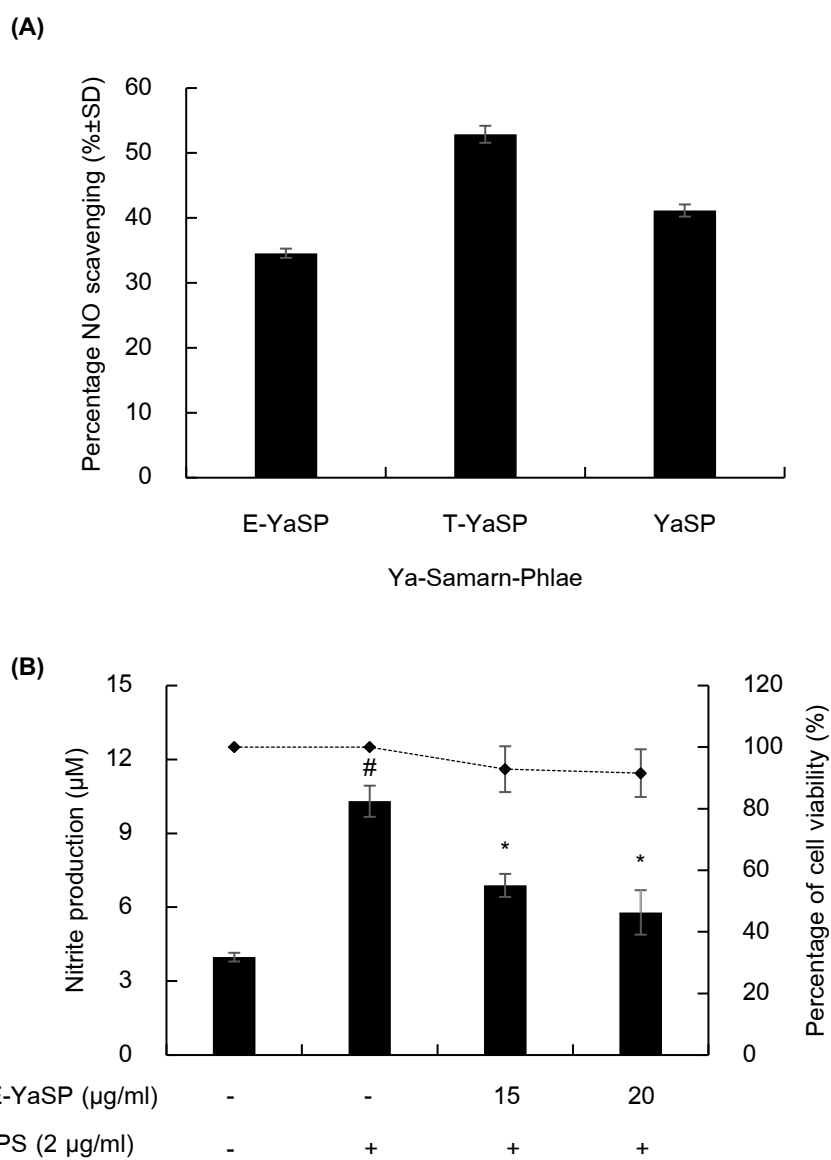
**3.2 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดด้วยเอทานอลจากสมุนไพรองค์ประกอบของตำรับยาสมานแผลและตำรับยาสมานแผลในเซลล์ macrophage**  
จากการศึกษาด้วยวิธียับยั้งการหลั่ง NO ในเซลล์ macrophage RAW 264.7 ที่ได้รับการกระตุ้นการอักเสบด้วย lipopolysaccharide (LPS) ความเข้มข้น 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่ากลุ่มควบคุมซึ่งได้รับการกระตุ้นด้วย LPS มีปริมาณการสร้างไนไตรท์มากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับการกระตุ้นด้วย LPS แต่กลุ่มที่ได้รับ LPS ร่วมกับ E-YaSP ที่ความเข้มข้น 15 และ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการสร้าง NO โดยมีปริมาณการสร้างไนไตรท์ เท่ากับ 6.89 และ 5.79 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ ซึ่งน้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับ LPS ( $p < 0.05$ ) ดังแสดงในรูปที่ **9B** และจากการศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดด้วยเอทานอลจากสมุนไพรองค์ประกอบของตำรับยาทั้ง 4 ชนิด พบว่า E-CL ที่ความเข้มข้น 15 และ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีปริมาณการสร้างไนไตรท์ เท่ากับ 6.42 และ 5.33 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ ซึ่งน้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับ LPS ( $p < 0.05$ ) ดังแสดงในรูปที่ **10A** E-GM ที่ความเข้มข้น 12.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีปริมาณการสร้างไนไตรท์ เท่ากับ 9.59 ไมโครโมลาร์ ซึ่งน้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับ LPS ( $p < 0.05$ ) ดังแสดงในรูปที่ **10B** E-OS ที่ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีปริมาณการสร้างไนไตรท์ เท่ากับ 8.19 ไมโครโมลาร์ ซึ่งน้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับ LPS ( $p < 0.05$ ) ดังแสดงในรูปที่ **10C** และ E-AC ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีปริมาณการสร้างไนไตรท์ เท่ากับ 10.01 ไมโครโมลาร์ ซึ่งน้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับ LPS ( $p < 0.05$ ) ดังแสดงในรูปที่ **10D**

จากการศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบ พบว่า E-YaSP และ E-CL สามารถยับยั้งการสร้าง NO ได้ดีที่สุด โดยที่ความเข้มข้น 15 และ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการสร้าง NO ได้ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ( $p < 0.05$ ) รองลงมาคือ E-GM, E-AC และ E-OS ที่ความเข้มข้น 12.5, 100 และ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

**3.3 วิเคราะห์ฤทธิ์กระตุ้นการหายของแผล ด้วยวิธี wound scratch assay ในเซลล์ผิวหนังของมนุษย์ (human dermal fibroblast; HDF)** จากการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดด้วยเอทานอลจากตำรับยาสมานแผล และสมุนไพรประกอบในตำรับ พบว่า สารสกัดด้วยเอทานอลจากขมิ้นชัน มังคุด ข่าวสาร และตำรับยาสมานแผล ที่ความเข้มข้น 0.0001-1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ HDF โดยมีร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์อยู่ระหว่าง 73.37-97.31 ในส่วนของสารสกัดด้วยเอทานอลจากหมากสง และวิตามินซี ซึ่งใช้เป็นสารมาตรฐานในการทดลอง ที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ HDF ซึ่งมีร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์อยู่ระหว่าง 76.80-77.64 และพบว่า สารสกัดด้วยเอทานอลจากหมากสง และวิตามินซี ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีผลต่อการลดร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์ HDF โดยมีร้อยละการรอดชีวิตอยู่ระหว่าง 21.48-65.11 แสดงดังตารางที่ 10 หลังจากนั้น เลือกความเข้มข้นสูงสุดที่ไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ HDF เพื่อทดสอบฤทธิ์กระตุ้นการหายของแผล ด้วยวิธี wound scratch assay พบว่า หลังจากการทดสอบด้วยสารสกัดจากเอทานอลจากสมุนไพรประกอบของตำรับยาสมานแผล ขมิ้นชัน และข่าวสาร ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เซลล์ HDF เริ่มมีการเคลื่อนที่เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง และเคลื่อนที่ชิดติดกันเมื่อเวลาผ่านไป 48 ชั่วโมง ซึ่งใกล้เคียงกับเซลล์ HDF ที่ได้รับวิตามินซี 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนเซลล์ HDF ที่ได้รับการทดสอบด้วยสารสกัดจาก เอทานอลของมังคุด ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีการเคลื่อนที่เข้าหากัน แต่ไม่ชิดติดกันเมื่อเวลาผ่านไป 48 ชั่วโมง ส่วนเซลล์ HDF ที่ได้รับการทดสอบด้วยสารสกัดจากเอทานอลของหมากสง มีการเคลื่อนที่เข้าหากันเพียงเล็กน้อย แต่ไม่ชิดติดกันเมื่อเวลาผ่านไป 48 ชั่วโมง ซึ่งใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับการทดสอบด้วย 10% DMSO (รูปที่ 11)

**3.4 การทดสอบความระคายเคืองของยาสมานแผลในสัตว์ทดลอง (primary skin irritation test)** จากการศึกษาความปลอดภัยของการประยุกต์ใช้ตำรับยาสมานแผล ด้วยการทดสอบความระคายเคืองของยาสมานแผลรูปแบบ T-YaSP และ YaSP ในกระต่าย พบว่า ตำรับยาสมานแผลรูปแบบ T-YaSP เมื่อทาลงบนผิวหนังกระต่าย ก่อให้เกิดอาการแดงเล็กน้อย

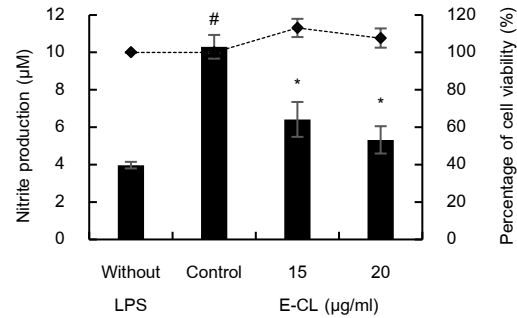
ที่เวลา 1 และ 24 ชั่วโมง แต่อาการแดงดังกล่าวกลับสู่สภาวะปกติที่เวลา 48 ชั่วโมง หลังการทำ T-YaSP โดยมีค่าดัชนีการระคายเคืองเบื้องต้นต่อผิวหนัง (primary dermal irritation index; PDII) เท่ากับ 0.42 ซึ่งแปลผลได้ว่า T-YaSP ไม่ก่อให้เกิดความระคายเคืองต่อผิวหนัง แสดงดัง **ตารางที่ 11** และจากการทดสอบความระคายเคืองของยาสมานแผลรูปแบบ YaSP พบว่าเมื่อบทาลงบนผิวหนังกระต่าย ก่อให้เกิดอาการแดงเล็กน้อยที่เวลา 1 และ 24 ชั่วโมง แต่อาการแดงดังกล่าวกลับสู่สภาวะปกติที่เวลา 48 ชั่วโมง หลังการทำ T-YaSP โดยมีค่าดัชนีการระคายเคืองเบื้องต้นต่อผิวหนัง เท่ากับ 0.17 ซึ่งแปลผลได้ว่า T-YaSP ไม่ก่อให้เกิดความระคายเคืองต่อผิวหนัง แสดงดัง **ตารางที่ 12**



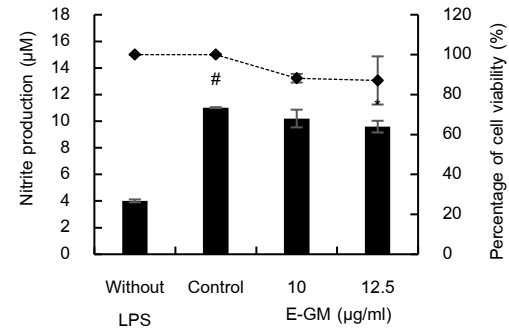
รูปที่ 9 Anti-inflammatory activity of Ya-Samarn-Phlae (E-YaSP; 0.1 mg/ml, T-YaSP 0.1 %v/v, YaSP 0.1 %w/v) on nitric oxide scavenging activity (A) and nitrite production in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages (B).



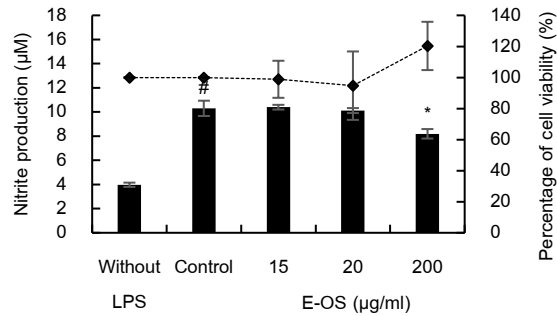
(A)



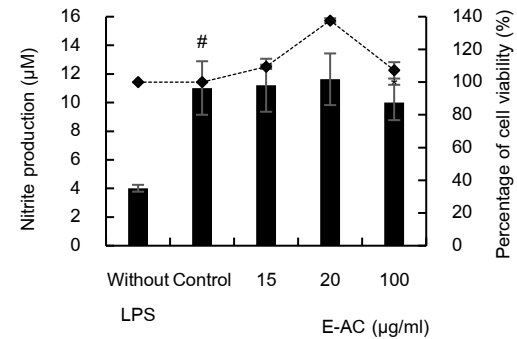
(B)



(C)



(D)

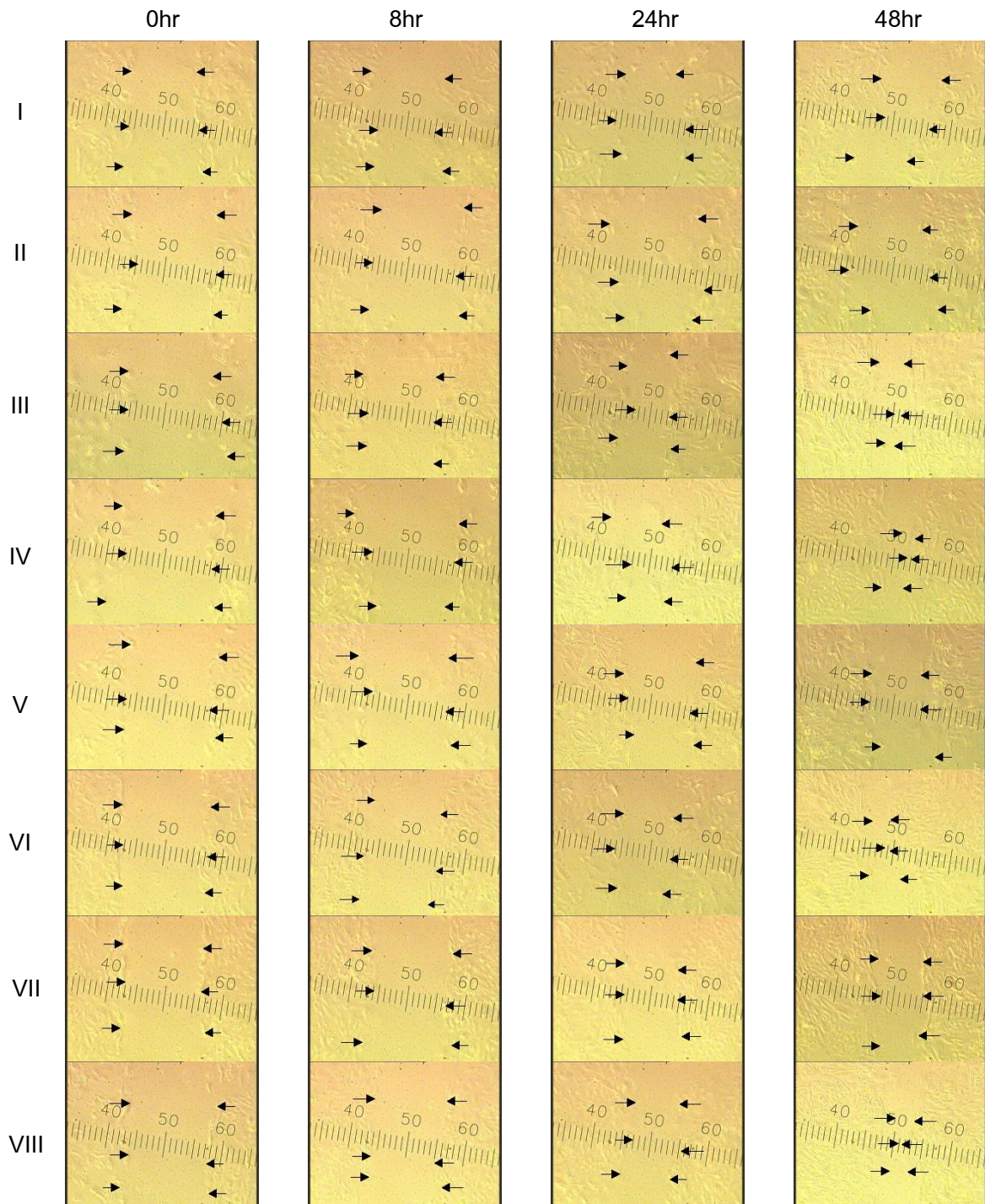


รูปที่ 10 The effect of ethanol extracts from *Curcuma longa* (A), *Garcinia mangostana* (B), *Oryza sativa* (C) and *Areca catechu* (D) on cell viability and nitric oxide production in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. \*,  $p < 0.05$  is indicated significant difference between LPS stimulation (control) and treatment. #,  $p < 0.05$  is indicated significant difference between normal conditions (without LPS) and treatment.

ตารางที่ 10 Effects of ethanol extracts from Ya-Samarn-Phlae (E-YaSP) formula and its herbal components on cell viability of human dermal fibroblasts (HDF).

Concentration (mg/ml)	Cell viability of human dermal fibroblast cell (Percentage; %)					
	<i>C. longa</i>	<i>G. mangostana</i>	<i>O. zativa</i>	<i>A. catechu</i>	E-YaSP	Vitamin C
1.0000	75.03±5.43	97.31±9.74	73.37±2.69	21.48±4.97	84.58±1.79	65.11±3.81
0.1000	77.74±6.27	89.02±5.90	83.53±2.69	76.80±4.55	81.16±2.30	77.64±3.71
0.0100	83.48±7.92	87.21±1.09	88.06±1.87	80.22±5.70	78.29±4.16	87.02±1.48
0.0010	95.73±3.01	77.35±5.99	96.78±5.00	86.13±5.36	80.55±5.51	84.41±4.95
0.0001	96.51±3.48	77.07±7.31	94.69±5.65	96.34±3.01	90.99±1.39	97.75±2.32

Each value represents as the mean±SD of three repeated.



រូបភាព 11 Digital image showing the effect of ethanol extracts from Ya-Samarn-Phlae (E-YaSP) formula and its herbal components on human dermal fibroblast migration in a wound scratch test assay. I: control (10% dimethyl sulfoxide); II: control (dulbecco's modified eagle medium; DMEM); III: E-YaSP; IV: 1 mg/ml *C. longa*; V: 0.1 mg/ml *A. catechu*; VI: 1 mg/ml *O. zativa*; VII: 1 mg/ml *G. mangostana*; VIII: 0.1 mg/ml vitamin C.

ตารางที่ 11 Dermal irritation study of traditionally prepared-Ya-Samarn-Phlae (T-YaSP) at different time interval in rabbit.

Rabbit No.	Time after removal of patches (h)			
	1	24	48	72
1	1/0	0/0	0/0	0/0
2	1/0	1/0	0/0	0/0
3	1/0	1/0	0/0	0/0
Total	3/0	2/0	0/0	0/0
Mean	1/0	0.7/0	0/0	0/0

Primary Dermal Irritation Index (PDII) =  $5 / (4 \times 3) = 0.42$ ; Toxicity Category IV (non-to slightly irritating)

Values are expressed as scores of erythema/edema.

ตารางที่ 12 Dermal irritation study of ointment base for Ya-Samarn-Phlae tulle-gras dressings (YaSP) at different time interval in rabbit.

Rabbit No.	Time after removal of patches (h)			
	1	24	48	72
1	1/0	0/0	0/0	0/0
2	0/0	1/0	0/0	0/0
3	0/0	0/0	0/0	0/0
Total	1/0	1/0	0/0	0/0
Mean	0.3/0	0.3/0	0/0	0/0

Primary Dermal Irritation Index (PDII) =  $2 / (4 \times 3) = 0.17$ ; Toxicity Category IV (non-to slightly irritating)

Values are expressed as scores of erythema/edema.

#### 4. ความคงตัวของตำรับยาสมานแผลรูปแบบ T-YaSP และ YaSP (stability test) หลังการเก็บรักษาเป็นเวลา 0, 3 และ 6 เดือน

##### 4.1 วิเคราะห์รูปแบบสารองค์ประกอบทางเคมีเชิงคุณภาพด้วยเครื่อง Liquid chromatograph-mass spectrometer (LC-MS)

จากการตรวจวิเคราะห์หาสารองค์ประกอบทางเคมีด้วยเครื่อง LC-MS ของตำรับยาสมานแผลทั้ง 2 รูปแบบ พบว่ายาสมานแผลในรูปแบบ T-YaSP เมื่อเก็บรักษาที่ 0, 3 และ 6 เดือน สามารถตรวจพบสารองค์ประกอบทางเคมีได้ทั้งหมด 21, 14 และ 11 ชนิด ตามลำดับ โดยพบว่ามีสารองค์ประกอบ 7 ชนิด ที่สามารถตรวจพบได้ทั้ง 0, 3 และ 6 เดือน หลังการเก็บรักษา และพบว่ามีสารองค์ประกอบ 3 ชนิด ซึ่งตรวจพบเมื่อเริ่มต้นของการเก็บรักษาจนกระทั่ง 3 เดือนหลังการเก็บรักษา แต่เมื่อเวลาผ่านไป 6 เดือนหลังการเก็บรักษาไม่สามารถตรวจพบได้นอกจากนี้ พบว่ามีสารองค์ประกอบ 6 ชนิด ซึ่งตรวจพบเมื่อเริ่มต้นของการเก็บรักษา แต่เมื่อเวลาผ่านไป 3 และ 6 เดือนหลังการเก็บรักษา ไม่สามารถตรวจพบ ดังแสดงในตารางที่ 13 ยาสมานแผลในรูปแบบ YaSP เมื่อเก็บรักษาที่ 0, 3 และ 6 เดือน สามารถตรวจพบสารองค์ประกอบทางเคมีได้ทั้งหมด 13, 7 และ 5 ชนิด ตามลำดับ โดยพบว่ามีสารองค์ประกอบ 5 ชนิด ที่สามารถตรวจพบได้ทั้ง 0, 3 และ 6 เดือน หลังการเก็บรักษา และพบว่ามีสารองค์ประกอบ 2 ชนิด ซึ่งตรวจพบเมื่อเริ่มต้นของการเก็บรักษาจนกระทั่ง 3 เดือนหลังการเก็บรักษา แต่เมื่อเวลาผ่านไป 6 เดือนหลังการเก็บรักษาไม่สามารถตรวจพบได้นอกจากนี้ พบว่ามีสารองค์ประกอบ 7 ชนิด ซึ่งตรวจพบเมื่อเริ่มต้นของการเก็บรักษา แต่เมื่อเวลาผ่านไป 3 และ 6 เดือนหลังการเก็บรักษา ไม่สามารถตรวจพบ ดังแสดงในตารางที่ 14 จากการวิเคราะห์เปรียบเทียบยาสมานแผลทั้งสองรูปแบบเมื่อผ่านการเก็บรักษาเป็นเวลา 6 เดือน ทั้ง T-YaSP และ YaSP มีสารองค์ประกอบสำคัญที่เหมือนกัน 3 ชนิด คือ curcumin, alpha-mangostin และ dihydroisoalantolactone

##### 4.2 วิเคราะห์รูปแบบสารสำคัญทางเคมีเชิงปริมาณด้วยเครื่อง High performance liquid chromatography (HPLC)

สารสำคัญทางเคมีที่ได้รับการวิเคราะห์เชิงปริมาณในตำรับยาสมานแผลรูปแบบ T-YaSP และ YaSP เมื่อผ่านการเก็บรักษาที่ 0, 3 และ 6 เดือน ได้แก่ alpha-mangostin, curcumin และ arecoline จากการตรวจวิเคราะห์ยาสมานแผลในรูปแบบ T-YaSP พบว่ามีปริมาณของ alpha-mangostin และ curcumin ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติตามระยะเวลาที่เก็บรักษา โดยมีค่าอยู่ในช่วง 1.831-2.472 และ 1.616-2.399 มิลลิกรัมต่อกรัม ตามลำดับ และหลังการเก็บรักษาที่ 3 และ 6 เดือน พบว่ามีปริมาณของ alpha-mangostin และ curcumin

น้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับค่าเริ่มต้น นอกจากนี้พบว่า arecoline มีปริมาณน้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับค่าเริ่มต้น หลังการเก็บรักษาที่ 3 เดือนและหลังการเก็บรักษาที่ 6 เดือน ตรวจไม่พบ arecoline จากการตรวจวิเคราะห์ ยาสมานแผลในรูปแบบ YaSP เมื่อผ่านการเก็บรักษาที่ 0, 3 และ 6 เดือน พบว่า มีปริมาณ curcumin ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติตามระยะเวลาที่เก็บรักษา โดยมีค่าอยู่ในช่วง 0.175-0.366 มิลลิกรัมต่อกรัม และปริมาณของ curcumin หลังการเก็บรักษาที่ 3 และ 6 เดือน มีปริมาณน้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับค่าเริ่มต้น ปริมาณของ alpha-mangostin ที่ตรวจพบในช่วงเริ่มต้นของการเก็บรักษา และหลังการเก็บรักษาเป็นเวลา 3 และ 6 เดือน เท่ากับ 0.415, 0.491 และ 0.458 มิลลิกรัมต่อกรัม ตามลำดับ ในส่วนของ arecoline ไม่สามารถตรวจสอบในยาสมานแผลรูปแบบ YaSP (ตารางที่ 15)

#### 4.3 วิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี nitric oxide (NO) scavenging activity assay ของตำรับยาสมานแผลรูปแบบ T-YaSP และ YaSP เมื่อผ่านการเก็บรักษาที่ 0, 3 และ 6 เดือน

จากการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการสร้าง NO ของยาสมานแผลรูปแบบ T-YaSP พบว่า ที่ระยะเวลาเริ่มต้น T-YaSP ความเข้มข้นร้อยละ 0.01 0.10 และ 1.00 ปริมาตรต่อปริมาตร มีร้อยละของการยับยั้งการสร้าง NO เท่ากับ 32.24, 37.75 และ 52.88 ตามลำดับ โดยพบว่า T-YaSP ที่ความเข้มข้นสูงขึ้น มีร้อยละของการยับยั้งการสร้าง NO เพิ่มขึ้นแบบ dose dependent manner แต่เมื่อผ่านการเก็บรักษาที่ 3 และ 6 เดือน พบว่า ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.01-1.00 ปริมาตรต่อปริมาตร มีร้อยละของการยับยั้งการสร้าง NO ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับค่าเริ่มต้น ( $p < 0.05$ ) แสดงดังตารางที่ 16

จากการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการสร้าง NO ของยาสมานแผลรูปแบบ YaSP พบว่า ที่ระยะเวลาเริ่มต้น YaSP ความเข้มข้นร้อยละ 0.01 0.10 และ 1.00 มวลต่อปริมาตร มีร้อยละของการยับยั้งการสร้าง NO เท่ากับ 30.52, 32.15 และ 41.14 ตามลำดับ โดยพบว่า YaSP ที่ความเข้มข้นสูงขึ้น มีร้อยละของการยับยั้งการสร้าง NO เพิ่มขึ้นแบบ dose dependent manner แต่เมื่อผ่านการเก็บรักษาที่ 3 และ 6 เดือน พบว่า ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.01-1.00 มวลต่อปริมาตร มีร้อยละของการยับยั้งการสร้าง NO ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับค่าเริ่มต้น ( $p < 0.05$ ) แสดงดังตารางที่ 16

จากการวิเคราะห์ผลการทดสอบเปรียบเทียบตำรับยาสมานแผลทั้ง 2 รูปแบบ พบว่า ตำรับยาสมานแผลแบบ T-YaSP ที่ความเข้มข้นร้อยละ 1.00 ปริมาตรต่อปริมาตร ตั้งแต่ช่วงเริ่มต้นของการเก็บรักษา และเมื่อผ่านการเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 3 และ 6 เดือน มีร้อยละ

ในการยับยั้งการสร้าง NO มากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับตำรับยาสมานแผลรูปแบบ YaSP ที่ความเข้มข้นร้อยละ 1.00 มวลต่อปริมาตร (รูปที่ 12A)

#### 4.4 วิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี TBARs assay ของตำรับยาสมานแผลรูปแบบ T-YaSP และ YaSP เมื่อผ่านการเก็บรักษาที่ 0, 3 และ 6 เดือน

จากการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการสร้าง MDA ของยาสมานแผลรูปแบบ T-YaSP พบว่าที่ระยะเวลาเริ่มต้น T-YaSP ความเข้มข้นร้อยละ 0.10, 1.00 และ 10.00 ปริมาตรต่อปริมาตร มีร้อยละของการยับยั้งการสร้าง MDA เท่ากับ 10.98, 20.54 และ 30.43 ตามลำดับ โดยพบว่า T-YaSP ที่ความเข้มข้นสูงขึ้น มีร้อยละของการยับยั้งการสร้าง NO เพิ่มขึ้นแบบ dose dependent manner แต่เมื่อผ่านการเก็บรักษาที่ 3 และ 6 เดือน พบว่า ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.10-10.00 ปริมาตรต่อปริมาตร มีร้อยละของการยับยั้งการสร้าง MDA ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับค่าเริ่มต้น ( $p < 0.05$ ) แสดงดังตารางที่ 16

จากการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการสร้าง MDA ของยาสมานแผลรูปแบบ YaSP พบว่าที่ระยะเวลาเริ่มต้น YaSP ความเข้มข้นร้อยละ 0.10, 1.00 และ 10.00 มวลต่อปริมาตร มีร้อยละของการยับยั้งการสร้าง MDA เท่ากับ 7.08, 14.59 และ 23.10 ตามลำดับ โดยพบว่า YaSP ที่ความเข้มข้นสูงขึ้น มีร้อยละของการยับยั้งการสร้าง MDA เพิ่มขึ้นแบบ dose dependent manner แต่เมื่อผ่านการเก็บรักษาที่ 3 และ 6 เดือน พบว่า ที่ความเข้มข้นร้อยละ 1.00 และ 10.00 มวลต่อปริมาตร มีร้อยละของการยับยั้งการสร้าง MDA ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับค่าเริ่มต้น ( $p < 0.05$ ) แสดงดังตารางที่ 16

จากการวิเคราะห์ผลการทดสอบเปรียบเทียบตำรับยาสมานแผลทั้ง 2 รูปแบบ พบว่าตำรับยาสมานแผลแบบ T-YaSP ที่ความเข้มข้นร้อยละ 1.00 ปริมาตรต่อปริมาตร ตั้งแต่ช่วงเริ่มต้นของการเก็บรักษา และเมื่อผ่านการเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 3 และ 6 เดือน มีร้อยละในการยับยั้งการสร้าง MDA มากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับตำรับยาสมานแผลรูปแบบ YaSP ที่ความเข้มข้นร้อยละ 1.00 มวลต่อปริมาตร (รูปที่ 12B)

ตารางที่ 13 Chemical profiles of traditionally prepared-Ya-Samarn-Phlae (T-YaSP) measured by Liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) method in long-trem stability study.

No.	Identification compounds	Math score*	Storage time (months)		
			Initial	3	6
1	Beta-dihydrorotenone	98.97	+	+	+
2	4-Hydroxy-3,5,4'-trimethoxystilbene	98.92	+	-	-
3	6,8-Dihydroxy-1,7-diprenylxanthone -2-carboxylic acid	98.30	+	+	+
4	Curcumin	96.75	+	+	+
5	Genistein	95.96	+	+	-
6	Mangostenol	95.58	+	+	+
7	Ponganone VIII	92.79	+	+	+
8	Alpha-mangostin	88.98	+	+	+
9	Amoritin	87.83	+	-	-
10	5,7-Dihydroxy-3,6,8,4'-tetramethoxy flavone7-glucosyl-(1->3)-galactoside	86.92	+	+	-
11	1,7-Dihydroxy-3,6-dimethoxy-2, 8-diprenylxanthone	86.22	+	-	-
12	Artonin V	83.40	+	+	-
13	Reserpine	81.87	+	-	-
14	3-Isomangostin hydrate	81.67	+	-	+
15	3,5-Pyridinedicarboxylic acid, 1,4- dihydro-2,6-dimethyl-4-(3-nitrophenyl)-, carboxymethyl methyl est	80.77	+	-	-
16	Methuyl tanshinonate	80.28	+	+	+

\* Math score at initial.

+; Present

-; Absent



ตารางที่ 13 (Continued)

No.	Identification compounds	Math score*	Storage time (months)		
			Initial	3	6
17	Limonen-6-ol-pivalate	80.23	+	-	-
18	Verimol C	79.68	+	+	-
19	Dihydroisoalantolactone	79.53	+	+	+
20	(3beta,8beta)-3-Hydroxy-7(11)- eremophilen-12,8-olide	78.32	+	+	+
21	Mangostinone	70.26	+	+	+

\* Math score at initial.

++; Present

-; Absent

ตารางที่ 14 Chemical profiles of ointment base for Ya-Samarn-Phlae tulle-gras dressings (YaSP) measured by Liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) method in long-term stability study.

No.	Identification compounds	Math score*	Storage time (months)		
			Initial	3	6
1	Alpha-mangostin	96.29	+	+	+
2	Bisdemethoxycurcumin	96.21	+	+	-
3	Curcumin	95.93	+	+	+
4	Dihydrorotenone	49.40	+	+	+
5	3,5-Pyridinedicarboxylic acid, 1,4-dihydro-2,6-dimethyl-4-(3-nitrophenyl)-, carboxymethyl methyl est	49.10	+	-	-
6	Methuyl tanshinonate	48.99	+	+	+
7	Stigmatellin Y	48.66	+	-	-
8	6,8-Dihydroxy-1,7-diprenylxanthone-2-carboxylic acid	48.59	+	+	-
9	2,3-Dihydroabscisic alcohol	48.29	+	-	-
10	Glyinflanin H	48.20	+	-	-
11	Verimol C	48.04	+	-	-
12	Myristicanol B	47.93	+	-	-
13	Demethoxycurcumin	46.73	+	+	+

\* Math score at initial.

+; Present

-; Absent

ตารางที่ 15 The content reduction of active constituents in traditionally prepared-Ya-Samarn-Phlae (T-YaSP) and Ya-Samarn-Phlae tulle-gras dressings (YaSP) by high performance liquid chromatography (HPLC) method after extended storage.

Active constituents	Content of active constituent (mg/g±SD)		
	Storage time (months)		
	Initial	3	6
T-YaSP			
Alpha-mangostin	2.472±0.002 <sup>a</sup>	2.099±0.002 <sup>*,b</sup>	1.831±0.003 <sup>*,c</sup>
Curcumin	2.399±0.005 <sup>a</sup>	1.616±0.006 <sup>*,b</sup>	1.476±0.007 <sup>*,c</sup>
-----			
YaSP			
Alpha-mangostin	0.415±0.000 <sup>c</sup>	0.491±0.000 <sup>*,a</sup>	0.458±0.0008 <sup>*,b</sup>
Curcumin	0.366±0.001 <sup>a</sup>	0.308±0.000 <sup>*,b</sup>	0.175±0.000 <sup>*,c</sup>

$p < 0.05$  significantly different from Initial. (Independent samples T-Test)

<sup>(a-c)</sup> Values in the same row followed by a different letter are significantly different ( $p < 0.05$ ) (One-way ANOVA followed by Duncan)

ตารางที่ 16 Nitric oxide scavenging and lipid peroxidation inhibition capabilities of traditionally prepared-Ya-Samarn-Phlae (T-YaSP) and Ya-Samarn-Phlae tulle-gras dressings (YaSP).

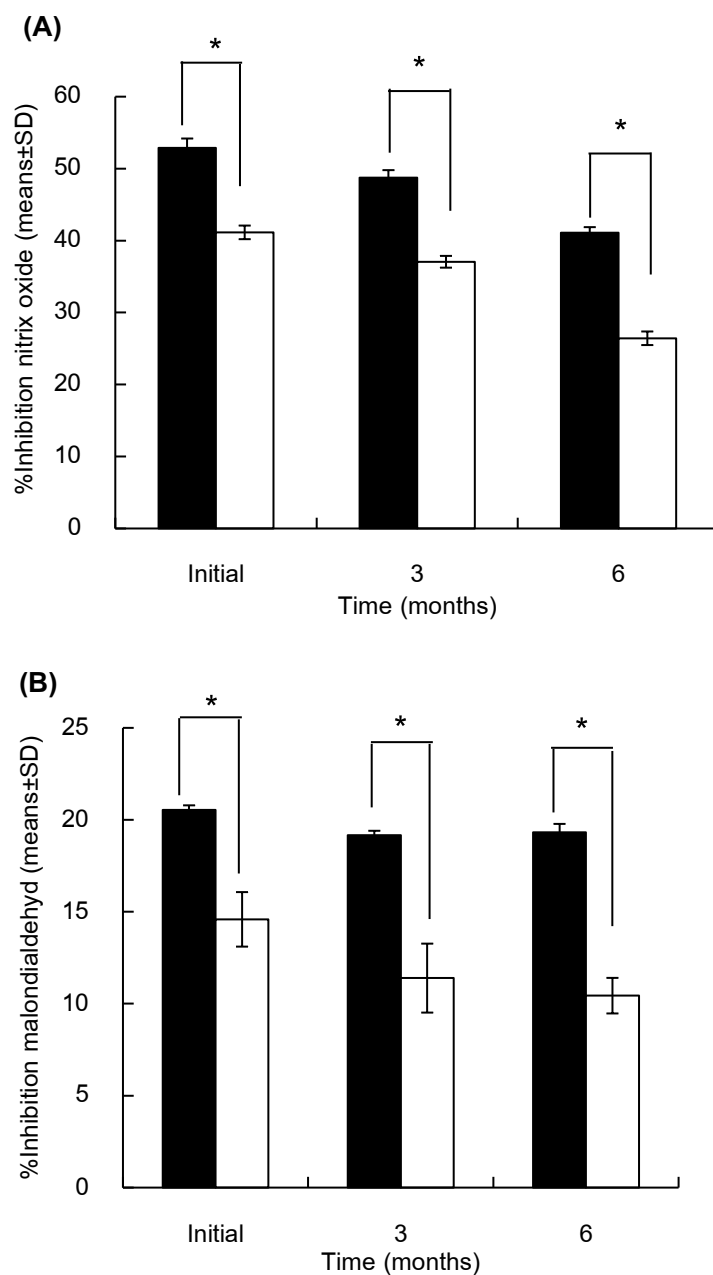
Concentration	%inhibition of NO/MDA production; (means±SD)		
	Storage time (months)		
	Initial	3	6
T-YaSP (% v/v)	Nitric oxide scavenging property		
1.00	52.88±1.31	48.77±1.03*	41.12±0.75*
0.10	37.75±1.59	37.09±0.49	25.49±0.49*
0.01	32.24±1.24	28.87±1.03*	16.45±0.75*
	Lipid peroxidation inhibition		
10.00	30.43±0.38	26.47±0.54*	26.53±0.46*
1.00	20.54±0.25	19.17±0.24*	19.32±0.46*
0.10	10.98±0.50	9.35±0.27*	9.01±0.17*
YaSP (% w/v)	Nitric oxide scavenging property		
1.00	41.14±0.94	37.06±0.82*	26.43±0.94*
0.10	32.15±0.82	28.34±1.70*	18.80±1.25*
0.01	30.52±0.47	23.16±0.82*	11.17±0.94*
	Lipid peroxidation inhibition		
10.00	23.10±0.76	17.05±0.51*	11.05±1.79*
1.00	14.59±1.48	11.39±1.88*	10.44±0.97*
0.10	7.08±0.77	6.68±1.23	7.64±0.72

\*  $p < 0.05$  was considered as significant were compared to the initial content.

Positive control of NO scavenging property (catechin 0.63 mg/ml; % Inhibition NO = 52.95±3.19)

Positive control of Lipid peroxidation inhibition (BHT 10% v/v; 89.06±1.00%)

Negative control (10% v/v vehicle T-YaSP)



รูปที่ 12 Inhibition of nitric oxide radicals (A) and malondialdehyde (B) by prepared-Ya-Samarn-Phlae (T-YaSP; 1% v/v; black bars) in comparison with ointment base for Ya-Samarn-Phlae tulle-gras dressings (YaSP; 1% w/v; white bars). \*,  $p < 0.05$  is indicated significant difference between T-YaSP and YaSP.

## 5. การประเมินฤทธิ์ต้านการอักเสบและกลไกการออกฤทธิ์ของ T-YaSP และ YaSP ในสัตว์ทดลอง

**5.1 การศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบของ T-YaSP ในอุ้งเท้าหนูที่เกิดการอักเสบจากการได้รับสาร carrageenan (carrageenan induced rat paw edema)** โดยประเมินผลจากความหนาของอุ้งเท้าหนูทดลอง หลังการเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบด้วย carrageenan พบว่า หลังการฉีด carrageenan หนูทดลองกลุ่มควบคุม (vehicle) มีความหนาของอุ้งเท้าเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่นานขึ้น โดยมีค่าความหนาของอุ้งเท้าสูงสุดที่เวลา 3 ชั่วโมงหลังการฉีด carrageenan แต่หนูทดลองกลุ่มที่ได้รับการทดสอบด้วยตำรับยาสมาน T-YaSP มีความหนาของอุ้งเท้าน้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ( $p < 0.001$ ) ที่เวลา 1, 2 และ 3 ชั่วโมง หลังการฉีด carrageenan ซึ่งให้ผลการทดสอบใกล้เคียงกับกลุ่มที่ได้รับการรักษาด้วย phenylbutazone (PBZ) ซึ่งใช้เป็นสารควบคุมบวก (รูปที่ 13A) การศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบของ YaSP พบว่า หลังการฉีด carrageenan หนูทดลองกลุ่มควบคุม (vehicle) มีความหนาของอุ้งเท้าเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่นานขึ้น แต่หนูทดลองกลุ่มที่ได้รับการทดสอบด้วยตำรับยาสมานแผลรูปแบบ YaSP มีความหนาของอุ้งเท้าน้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ( $p < 0.001$ ) ที่เวลา 1, 2 และ 3 ชั่วโมง หลังการฉีด carrageenan โดยให้ผลการทดสอบใกล้เคียงกับกลุ่มที่ได้รับการรักษาด้วย PBZ ซึ่งใช้เป็นสารควบคุมบวก (รูปที่ 13B)

**5.2 การศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของยาสมานแผลรูปแบบ T-YaSP และ YaSP ด้วยการตรวจวิเคราะห์ปริมาณ MDA, NO และ MPO** โดยการนำเนื้อเยื่ออักเสบหลังจากได้รับการเหนี่ยวนำด้วย carrageenan เป็นเวลา 3 ชั่วโมง มาตรวจวิเคราะห์หาปริมาณของ MDA, NO และ MPO

MDA หรือ malondialdehyde ถือได้ว่าเป็นตัวบ่งชี้ของการเกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) ในกระบวนการอักเสบ NO หรือ nitric oxide จัดเป็นสารสื่ออักเสบชนิดหนึ่ง ที่สร้างมาจาก inducible nitric oxide synthase (iNOS) มีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการอักเสบ โดยในสภาวะปกติ จะมี NO ในปริมาณที่น้อย ทำหน้าที่ยับยั้งการอักเสบ แต่หากมีการสร้าง NO ที่มากเกินไป จะส่งผลให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ได้ ซึ่งการยับยั้งการหลั่ง NO จะส่งผลให้การอักเสบได้ MPO หรือ myeloperoxidase เป็นเอนไซม์ที่สร้างและหลั่งมาจากเซลล์เม็ดเลือดขาว ซึ่งถ้ามี MPO ในปริมาณมาก จะบ่งชี้ถึงสภาวะของการอักเสบที่รุนแรง จากการศึกษาในครั้งนี้ หนูทดลองกลุ่มควบคุมที่ได้รับการเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบด้วย carrageenan พบว่ามีระดับของ MDA, NO และ MPO ในเนื้อเยื่ออักเสบเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เมื่อเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อปกติ (intact) ( $p < 0.001$ ) แต่ระดับของ MDA, NO และ MPO ในเนื้อเยื่ออักเสบที่ได้รับการทดสอบด้วย T-YaSP และ YaSP ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (  $p < 0.001$ ) นอกจากนี้ พบว่าผลของยาสมานแผล ทั้ง 2 รูปแบบ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับ PBZ ( $p < 0.001$ ) แสดงดังตารางที่ 17 และ ตารางที่ 18

**5.3 การศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของยาสมานแผลรูปแบบ T-YaSP และ YaSP ด้วยการตรวจวิเคราะห์ปริมาณ pro-inflammatory cytokines และ inflammatory enzymes** โดยการนำเนื้อเยื่ออักเสบหลังจากได้รับการเหนี่ยวนำด้วย carrageenan เป็นเวลา 3 ชั่วโมง มาตรวจวิเคราะห์หาปริมาณของ pro-inflammatory cytokines ได้แก่ TNF-alpha, IL-1beta และ PGE<sub>2</sub> และ inflammatory enzymes ได้แก่ iNOS และ COX-2 จากการศึกษานี้ หนูทดลองกลุ่มควบคุมที่ได้รับการเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบด้วย carrageenan พบว่ามีระดับของ TNF-alpha, IL-1beta, PGE<sub>2</sub>, iNOS และ COX-2 ในเนื้อเยื่ออักเสบเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อปกติ ( $p < 0.001$ ) ระดับของ TNF-alpha, IL-1beta, PGE<sub>2</sub>, iNOS และ COX-2 ในเนื้อเยื่ออักเสบลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับการทดสอบด้วย PBZ, T-YaSP และ YaSP เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ( $p < 0.001$ ) (รูปที่ 4 และ รูปที่ 15) นอกจากนี้ พบว่าเนื้อเยื่ออักเสบที่ได้รับการทดสอบด้วย PBZ และ YaSP มีปริมาณของ PGE<sub>2</sub>, iNOS และ COX-2 ไม่แตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อปกติ ( $p < 0.001$ ) (รูปที่ 15C-รูปที่ 15E)

**5.4 การศึกษาจุลกายวิภาคของเนื้อเยื่ออักเสบ (histological study) โดยวิธีการย้อมด้วย hematoxylin และ eosin (H&E)** พบว่า ในเนื้อเยื่อปกติ ไม่มีเซลล์เม็ดเลือดขาวที่บ่งชี้ถึงสภาวะการอักเสบ แต่เนื้อเยื่ออักเสบในกลุ่มควบคุม พบเซลล์เม็ดเลือดขาวจำนวนมาก ในทางตรงกันข้าม เนื้อเยื่ออักเสบที่ได้รับการทดสอบด้วย PBZ, T-YaSP และ YaSP มีความหนาแน่นของเซลล์เม็ดเลือดขาวน้อยกว่ากลุ่มควบคุมอย่างเห็นได้ชัด (รูปที่ 16 และ รูปที่ 17)

จากการวิเคราะห์ผลการทดสอบเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านการอักเสบ โดยประเมินผลจากความหนาของอุ้งเท้า ที่เกิดจากการบวมเนื่องจากการอักเสบ ของยาสมานแผลรูปแบบ T-YaSP และ YaSP พบว่า หลังการฉีด carrageenan ที่เวลา 3 ชั่วโมง ความหนาของอุ้งเท้าหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับการทดสอบด้วย YaSP มีความหนาของอุ้งเท้าน้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับการรักษาด้วย T-YaSP ( $p < 0.05$ ) ซึ่งบ่งชี้ได้ว่า

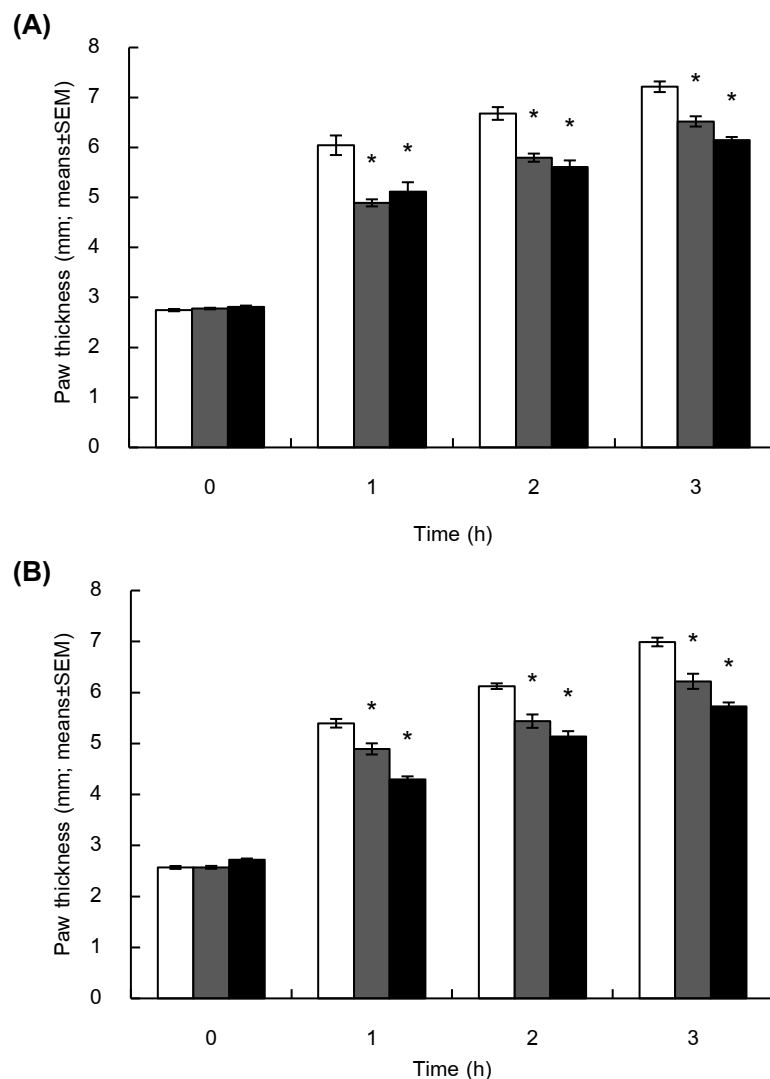
ยาสมานแผลในรูปแบบ YaSP มีประสิทธิภาพดีกว่าในการต้านการอักเสบ โดยลดอาการบวมของอวัยวะเนื่องจากการอักเสบที่ได้รับการเหนี่ยวนำด้วย carrageenan (ตารางที่ 19)

จากการวิเคราะห์ผลการทดสอบเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านการอักเสบของยาสมานแผลรูปแบบ T-YaSP และ YaSP โดยประเมินจากฤทธิ์การยับยั้งการหลั่งปัจจัยที่มีผลต่อการอักเสบ ได้แก่ MDA, NO และ MPO พบว่า T-YaSP และ YaSP มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการหลั่ง MDA และ NO ได้ไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่ YaSP มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการหลั่ง MPO ได้ดีกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับ T-YaSP ( $p < 0.05$ ) (ตารางที่ 19)

จากการวิเคราะห์ผลการทดสอบเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านการอักเสบของยาสมานแผลรูปแบบ T-YaSP และ YaSP โดยประเมินผลจากฤทธิ์การยับยั้งการหลั่ง pro-inflammatory cytokines พบว่า T-YaSP และ YaSP มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการหลั่ง TNF-alpha และ IL-1beta ได้ไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่ YaSP มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการหลั่ง PGE<sub>2</sub> ได้ดีกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับ T-YaSP ( $p < 0.05$ ) (ตารางที่ 19)

จากการวิเคราะห์ผลการทดสอบเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านการอักเสบของยาสมานแผลรูปแบบ T-YaSP และ YaSP โดยประเมินผลจากฤทธิ์การยับยั้งการหลั่ง inflammatory enzymes พบว่า T-YaSP และ YaSP มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการหลั่ง iNOS ได้ไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่ YaSP มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการหลั่ง COX-2 ได้ดีกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับ T-YaSP ( $p < 0.05$ ) (ตารางที่ 19)





รูปที่ 13 Paw thickness in rats treated with traditionally prepared-Ya-Samarn-Phlae (T-YaSP; black bars) (A) or ointment base for Ya-Samarn-Phlae tulle-gras dressings (YaSP; black bars) (B), 5% (w/v) of phenylbutazone (grey bars) in comparison with vehicle-treated group (white bars) on carrageenan-induced paw edema model. Paw thickness degree was presented as the mean±SEM of 15 rats per group, \* $p < 0.001$  vs. vehicle.

**ตารางที่ 17** Effect of traditionally prepared-Ya-Samarn-Phlae (T-YaSP) on the production of malondialdehyde (MDA), nitric oxide (NO), and myeloperoxidase (MPO) in carrageenan-induced paw edema in rats.

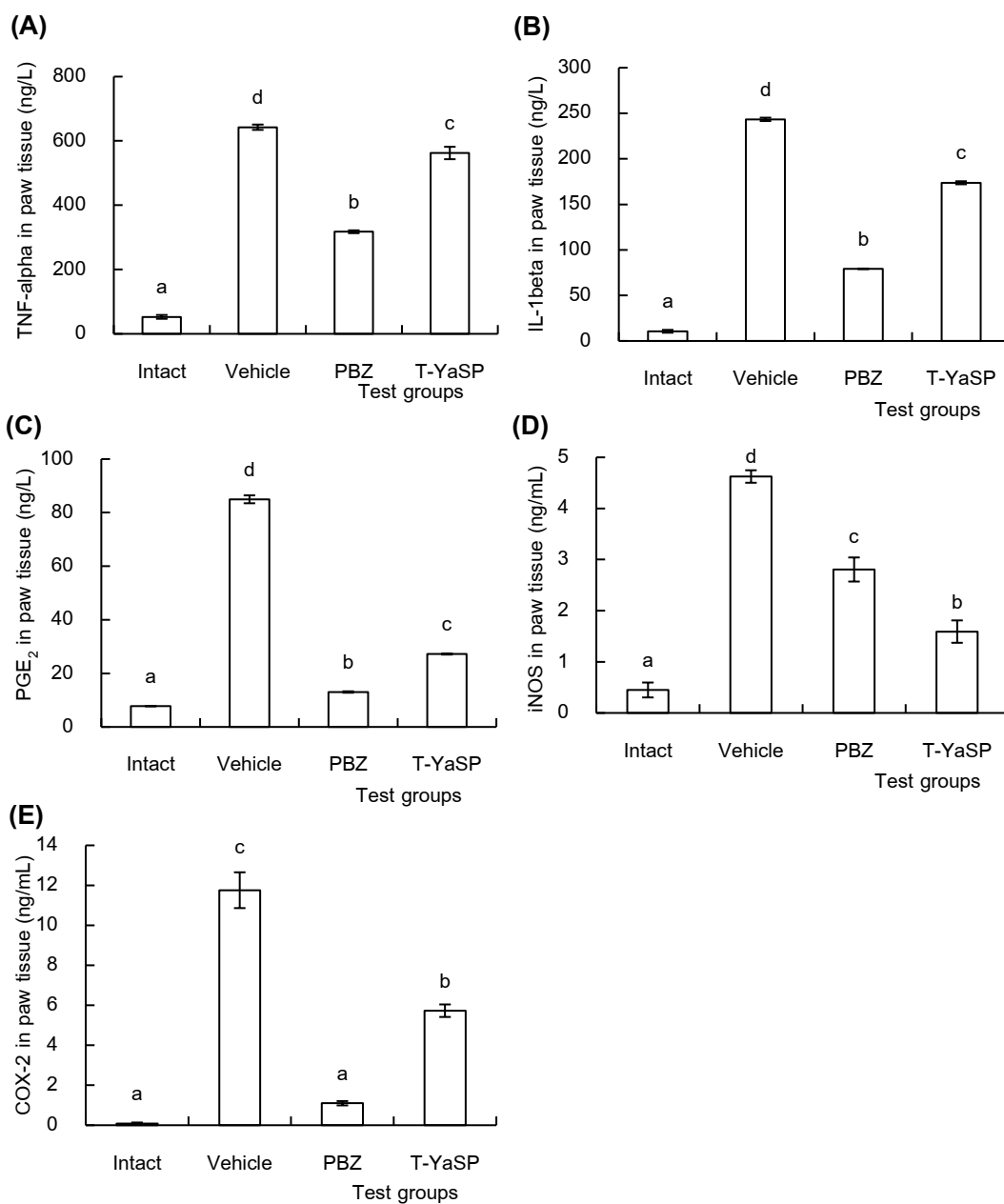
Test groups	malondialdehyde (nmol/mg protein)	nitric oxide ( $\mu$ mol/g protein)	myeloperoxidase (U/g tissue)
intact	1.43 $\pm$ 0.15 <sup>a</sup>	11.19 $\pm$ 1.15 <sup>a</sup>	0.11 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>
vehicle	5.57 $\pm$ 0.23 <sup>c</sup>	105.91 $\pm$ 2.93 <sup>c</sup>	0.40 $\pm$ 0.02 <sup>c</sup>
phenylbutazone (5%; w/v)	3.06 $\pm$ 0.21 <sup>b</sup>	20.98 $\pm$ 0.35 <sup>ab</sup>	0.30 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>
T-YaSP	3.67 $\pm$ 0.20 <sup>b</sup>	29.78 $\pm$ 2.04 <sup>b</sup>	0.33 $\pm$ 0.00 <sup>b</sup>

Data are presented as the mean $\pm$ SEM of five rats per group. <sup>(a-c)</sup> Values in the same column followed by a different letter are significantly different ( $p < 0.001$ ). (One-way ANOVA followed by Duncan)

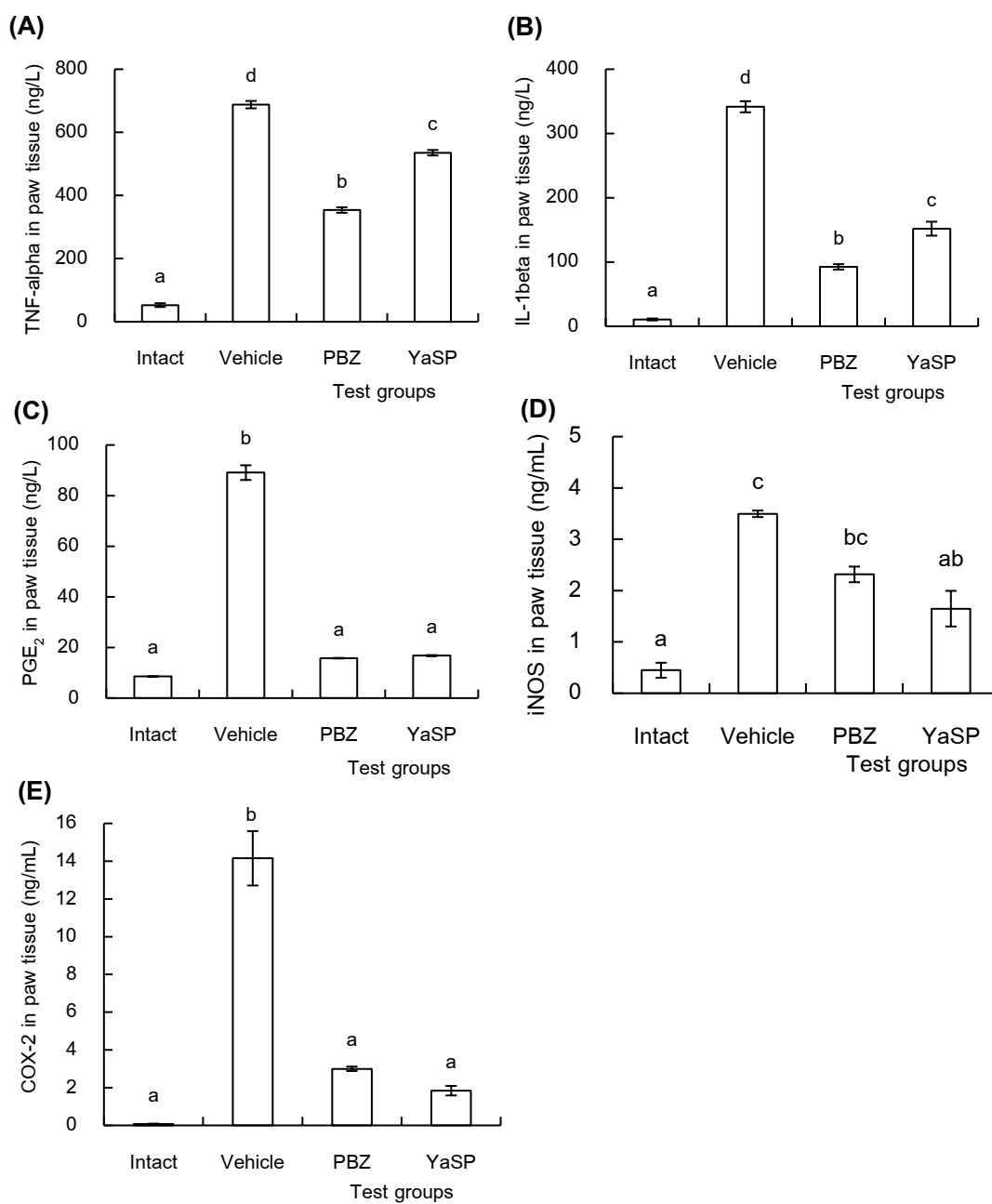
**ตารางที่ 18** Effect of ointment base for Ya-Samarn-Phlae tulle-gras dressings (YaSP) on the production of malondialdehyde (MDA), nitric oxide (NO), and myeloperoxidase (MPO) in carrageenan-induced paw edema in rats.

Test groups	malondialdehyde (nmol/mg protein)	nitric oxide ( $\mu$ mol/g protein)	myeloperoxidase (U/g tissue)
intact	1.70 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	22.56 $\pm$ 1.19 <sup>a</sup>	0.07 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>
vehicle	6.05 $\pm$ 0.16 <sup>c</sup>	118.66 $\pm$ 2.06 <sup>c</sup>	0.33 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>
phenylbutazone (5%; w/w)	3.36 $\pm$ 0.12 <sup>b</sup>	39.63 $\pm$ 0.81 <sup>b</sup>	0.25 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>
YaSP	3.37 $\pm$ 0.16 <sup>b</sup>	32.10 $\pm$ 1.03 <sup>b</sup>	0.21 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>

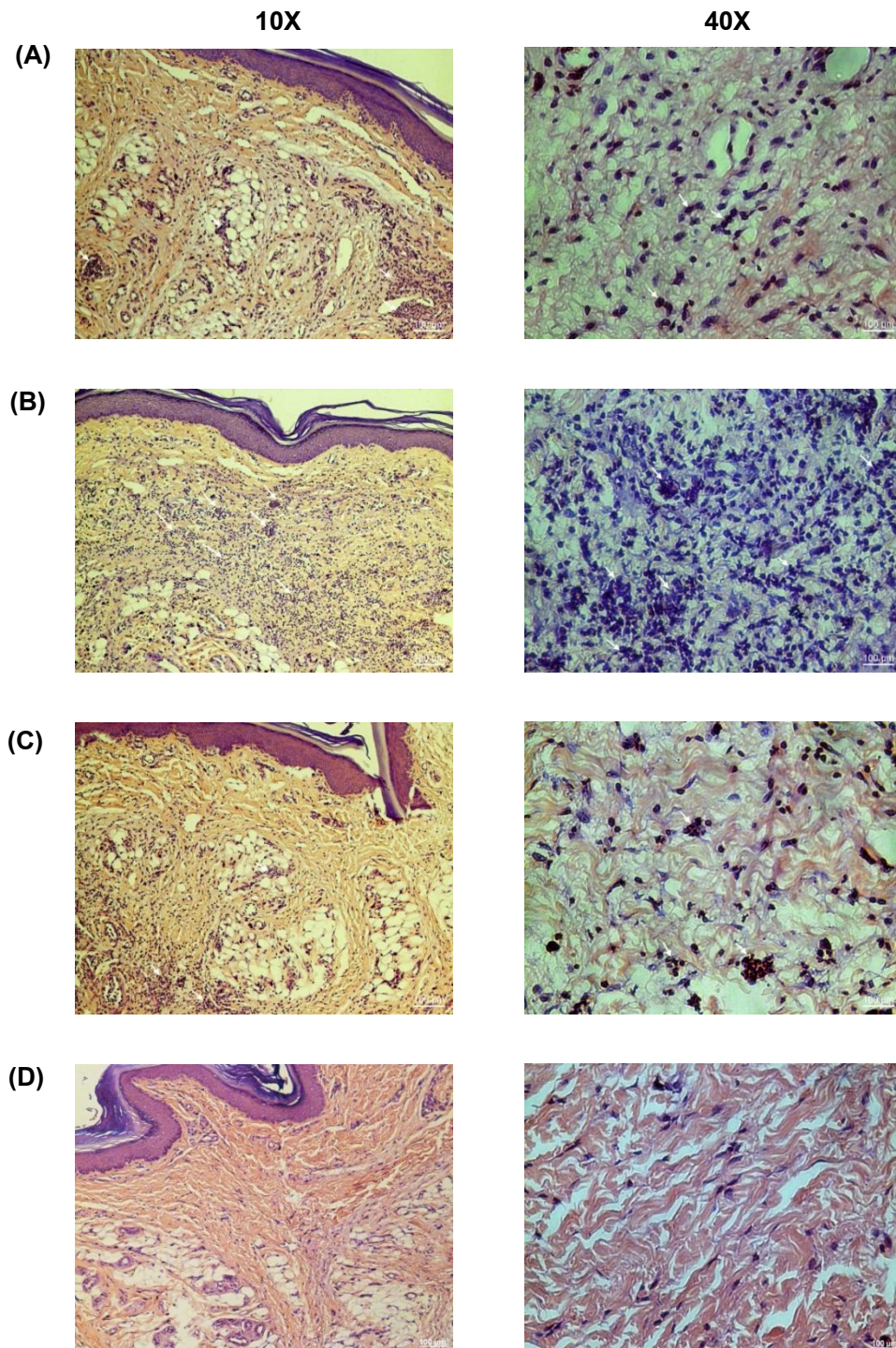
Data are presented as mean $\pm$ SEM of five rats per group. <sup>(a-c)</sup> Values in the same column followed by a different letter are significantly different ( $p < 0.001$ ). (One-way ANOVA followed by Duncan)



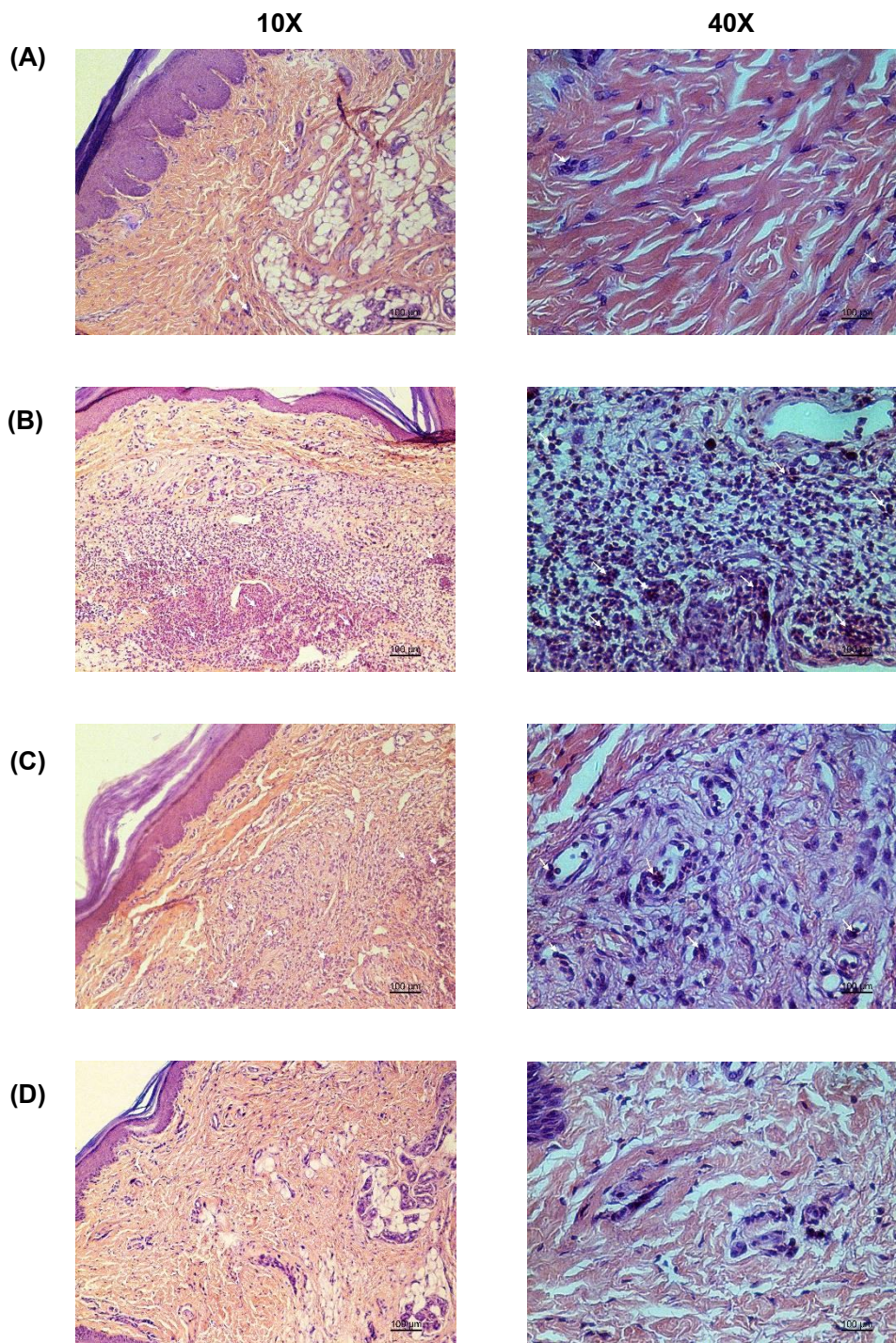
**รูปที่ 14** Effect of traditionally prepared-Ya-Samarn-Phlae (T-YaSP) on the production of inflammatory cytokines, TNF-alpha (A), IL-1beta (B) and PGE<sub>2</sub> (C) and inducible enzymes, iNOS (D) and COX-2 (E) in the rat paws treated with carrageenan. Data are presented as mean±SEM of five rats. <sup>(a-d)</sup> Values in the same factor followed by a different letter are significantly different ( $p < 0.001$ ). Phenylbutazone (PBZ, 5%; w/v) was used as a positive control.



**Figure 15** Effect of ointment base for Ya-Samarn-Phlae tulle-gras dressings (YaSP) on the production of inflammatory cytokines, TNF-alpha (A), IL-1beta (B) and PGE<sub>2</sub> (C) and inducible enzymes, iNOS (D) and COX-2 (E) in the rat paws treated with carrageenan. Data are presented as mean±SEM of five rats. <sup>(a-d)</sup> Values in the same factor followed by a different letter are significantly different ( $p < 0.001$ ). Phenylbutazone (PBZ, 5%; w/w) was used as a positive control.



រូបភាព 16 Histological evaluation of carrageenan induced paw edema in rat. Representative photomicrographs of paw tissue showing the protective effect of traditionally prepared-Ya-Samarn-Phlao (T-YaSP; A) compared with the intact group (D), vehicle (B) and phenylbutazone-treatment as a positive control (C). White arrows: neutrophils. Magnification, 10X and 40X; scale bars, 100  $\mu$ m.



รูปที่ 17 Representative photomicrographs of the histopathological analysis from paw tissue of rats showing the protective effect of ointment base for Ya-Samarn-Phlae tulle-gras dressings (YaSP; A) compared with the intact group (D), vehicle (B) and phenylbutazone-treatment as a positive control (C). White arrows: neutrophils. Magnification, 10X and 40X; scale bars, 100 µm.

ตารางที่ 19 The comparison of anti-inflammatory activity between T-YaSP and YaSP in carrageenan induced rat paw edema model.

Parameters	T-YaSP	YaSP	<i>p</i> value
Paw thickness (mm)	3.33±0.07	3.01±0.09	0.01
MDA (nmol/mgprot)	3.67±0.20	3.37±0.16	0.30
NO (µmol/mgprot)	29.78±2.04	32.10±1.03	0.34
MPO (U/g tissue)	0.33±0.00	0.21±0.00	0.00
TNF-alpha (ng/L)	562.42±19.28	535.51±8.72	0.24
IL-1beta (ng/L)	173.70±1.66	151.91±10.85	0.12
PGE <sub>2</sub> (ng/L)	27.21±0.20	16.77±0.22	0.00
iNOS (ng/L)	1.59±0.22	1.65±0.36	0.90
COX-2 (ng/L)	5.73±0.31	1.84±0.25	0.00

The difference between T-YaSP and YaSP treatment was statistically significant when *p* value < 0.05 (Independent samples T-Test).

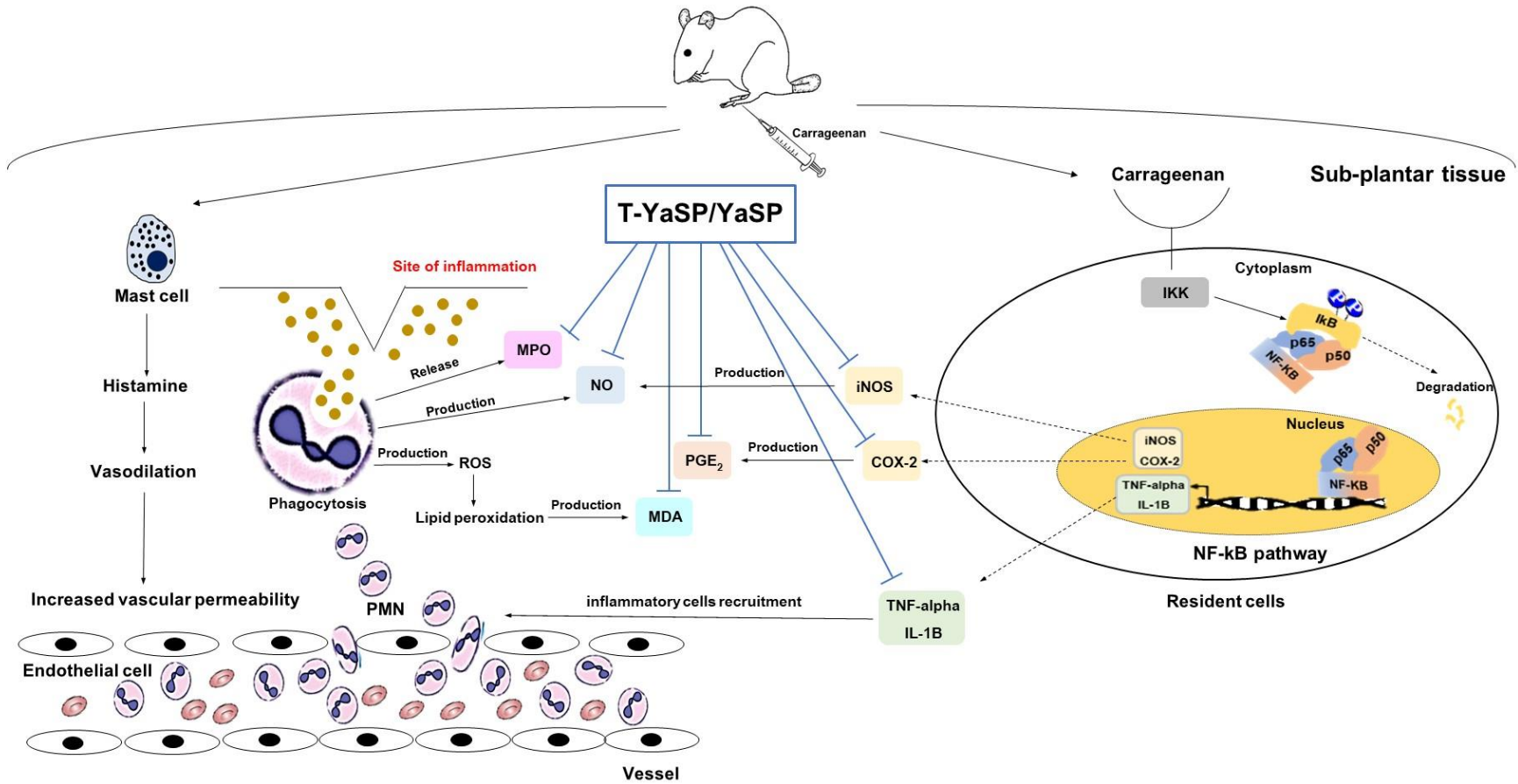
การศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบของยาสมานแผลโดยใช้วิธี carrageenan-induced rat paw edema ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้กันอย่างแพร่หลายเพื่อประเมินฤทธิ์ต้านการอักเสบของยาหรือสารต่าง ๆ จากธรรมชาติ ซึ่ง carrageenan จัดเป็นสารที่ก่อให้เกิดการอักเสบ (phlogistic agent) จะถูกฉีดเข้าทางชั้นใต้ผิวหนังบริเวณอุ้งเท้าของหนูทดลอง ทำให้เกิดการอักเสบและบวม โดยแบ่งการทำงานออกเป็น 2 ระยะ คือ ระยะที่ 1 (0-1 ชั่วโมง) จะมีผลกระตุ้น mast cells ที่อยู่ในเนื้อเยื่อ ทำให้เกิดการหลั่ง histamine และ serotonin ส่งผลกระตุ้นให้เกิดการขยายตัวของหลอดเลือด และเพิ่มการซึมผ่านของผนังหลอดเลือด ในระยะที่ 2 (มากกว่า 1 ชั่วโมง) จะส่งผลต่อการแทรกซึมของสารน้ำและเซลล์เม็ดเลือดขาว ต่าง ๆ (polymorphonuclear cells; PMNs) จากหลอดเลือดเข้าสู่บริเวณที่เกิดการอักเสบ โดยเฉพาะ neutrophil ซึ่งเป็นเม็ดเลือดขาวชนิดแรกที่เข้าสู่บริเวณอักเสบ การวัดปริมาณการแทรกซึมของ neutrophil เข้าสู่เซลล์ นิยมวัดจากปริมาณของ myeloperoxidase (MPO) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่หลั่งออกมาจาก azurophilic granule ของ neutrophil ในระหว่างที่เกิดการ phagocytosis เพื่อกำจัดสิ่งแปลกปลอมบริเวณเนื้อเยื่อ รวมทั้งทำหน้าที่ในการสร้างอนุมูลอิสระออกซิเจน หรือ reactive oxygen species (ROS) ที่มีความไวต่อการเกิดปฏิกิริยาสูง ได้แก่ hypochlorous acid (HOCl) หากเกิดการอักเสบเป็นระยะเวลานาน มีการสร้าง ROS ออกมาจำนวนมากจะทำให้เกิดการทำลายเนื้อเยื่อได้ โดยการเกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน หรือ oxidative stress ซึ่งจะกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยา lipid peroxidation การวัดปริมาณของการเกิด lipid peroxidation นิยมวัดจากปริมาณของ malondialdehyde (MDA) ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการออกซิเดชันของกรดไขมันไม่อิ่มตัว นอกจากนี้ในระยะที่ 2 ยังมีผลต่อการกระตุ้นการหลั่งสารสื่ออักเสบต่าง ๆ ได้แก่ prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), interleukin-1beta (IL-1B), tumor necrotic factor-alpha (TNF-alpha) และ nitric oxide (NO) การเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบด้วยการฉีด carrageenan และการหลั่ง TNF-alpha และ IL-1B ของ neutrophil ยังมีผลต่อการกระตุ้นการทำงานของ nuclear factor-kappaB (NF-kB) pathway ใน resident cells ของเนื้อเยื่อ โดย NF-kB เป็น transcription factor ที่สำคัญในการควบคุมการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการก่ออักเสบ โปรตีนของ NF-kB ได้แก่ p65 และ p50 ซึ่งสามารถพบได้ทั่วไปใน cytoplasm โดยอยู่ในระยะพัก (inactive) และจับอยู่กับ inhibitors ของ kB (IkB) ในสภาวะที่มีสิ่งกระตุ้นซึ่งก่อให้เกิดการอักเสบ เซลล์จะสามารถรับรู้การกระตุ้น และทำการส่งทอดสัญญาณนั้นเข้าสู่เซลล์ โดยผ่านการกระตุ้นการทำงานของ IkB kinase (IKK) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เติมหมู่ฟอสเฟตให้กับโปรตีน IkB นำไปสู่การสลายของ



IKB ทำให้ p65 และ p50 อยู่อย่างอิสระใน cytoplasm ซึ่งเป็นระยะที่พร้อมทำปฏิกิริยา (active) โดยจะเคลื่อนที่จาก cytoplasm เข้าสู่ nucleus และกระตุ้นการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ ได้แก่ TNF-alpha และ IL-1B ทำให้มีการหลั่งสารสื่ออักเสบมากขึ้น ซึ่ง TNF-alpha และ IL-1B ที่หลั่งออกมา ยังมีผลต่อการชักนำเซลล์เม็ดเลือดขาวให้เข้าสู่บริเวณเนื้อเยื่อที่ได้รับบาดเจ็บมากขึ้นด้วย ซึ่งอาจจะทำให้เกิดการอักเสบที่เรื้อรังได้ นอกจากนี้ p65 และ p50 ยังกระตุ้นการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการแสดงออกของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบที่สำคัญ 2 ชนิด ได้แก่ cyclooxygenase-2 (COX-2) และ inducible nitric oxide synthase (iNOS) โดยในสภาวะที่เนื้อเยื่อได้รับบาดเจ็บเกิดการอักเสบนั้น เยื่อหุ้มเซลล์ชั้นไขมันจะถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์ phospholipase A2 ได้เป็น arachidonic acid จากนั้นเอนไซม์ COX-2 จะทำหน้าที่ย่อย arachidonic acid ให้ได้เป็น PGE<sub>2</sub> ซึ่งกระตุ้นให้เกิดการอักเสบ อาการปวดและมีไข้ ในส่วนของ iNOS ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการสร้าง NO หากมีการกระตุ้นการแสดงออกของ iNOS อย่างต่อเนื่องเป็นระยะเวลานาน จะทำให้มีการสร้าง NO ออกมาเป็นจำนวนมาก ซึ่งทำให้เกิดการอักเสบที่รุนแรงได้ ดังนั้นการยับยั้งปัจจัยต่าง ๆ ที่จะส่งผลให้เกิดการอักเสบที่รุนแรง จึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจในการศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารชนิดต่าง ๆ

ยาสมานแผลที่ได้ทำการศึกษาในครั้งนี้ พบว่า มีความสามารถในการยับยั้งปริมาณของ MPO ซึ่งบ่งชี้ถึงการลดลงของจำนวน neutrophil ในเนื้อเยื่ออักเสบได้ มีความสามารถในการดักจับ NO ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระและสารสื่ออักเสบที่หลั่งออกมาระหว่างกระบวนการ phagocytosis เพื่อไม่ให้เกิดการทำปฏิกิริยาต่อไปได้ อีกทั้งยังยับยั้งปริมาณการหลั่งของ iNOS ส่งผลให้ลดการสร้าง NO ได้อีกทางหนึ่งด้วย นอกจากนี้ยังสามารถยับยั้งการหลั่ง COX-2 ส่งผลให้ลดการสร้าง PGE<sub>2</sub> ได้เช่นกัน ยาสมานแผลยังมีความสามารถในการลดการสร้าง MDA ซึ่งบ่งชี้ถึงการเกิดปฏิกิริยา lipid peroxidation ที่ลดลง นอกจากนี้ยังมีผลต่อการยับยั้งการหลั่งของ TNF-alpha และ IL-1B ซึ่งเป็นสารสื่ออักเสบที่สำคัญ ส่งผลต่อการลดการแทรกซึมของเซลล์เม็ดเลือดขาวที่เข้าสู่เนื้อเยื่อที่ได้รับบาดเจ็บได้ ด้วยคุณสมบัติเหล่านี้ทำให้ยาสมานแผลมีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบแบบเฉียบพลันในระยะที่ 2 ของการเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบด้วย carrageenan ได้ ดังแสดงในรูปที่ 18

## Graphical conclusion



รูปที่ 18 The graphical conclusion on anti-inflammatory partial mechanism of Ya-Samarn-Phlae.

## 6. การประเมินฤทธิ์ต่อการหายของแผลและกลไกการออกฤทธิ์ของตำรับยาสมานแผลรูปแบบ T-YaSP และ YaSP ในสัตว์ทดลอง

### 6.1 การประเมินฤทธิ์ต่อการหายของแผลและกลไกการออกฤทธิ์ของ T-YaSP และ YaSP ในหนูปกติ (Wistar rats)

จากการทดสอบฤทธิ์ต่อการหายของแผลโดยใช้วิธี excisional wound model ของ T-YaSP แสดงดังรูปที่ 19A พบว่า ในวันที่ 5, 7, 9 และ 11 หลังการทดสอบ หนูกลุ่มที่ได้รับการรักษาแผลด้วย T-YaSP มีขนาดของพื้นที่แผลลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมลบ ( $p < 0.05$ ) เช่นเดียวกับกับหนูกลุ่มที่ได้รับการรักษาแผลด้วยยาน้ำมันทองนพคุณ (Thongnoppakkun<sup>®</sup>) ซึ่งใช้เป็นกลุ่มควบคุมบวก (รูปที่ 19B) และพบว่าในวันที่ 11 หลังการทดสอบ หนูกลุ่มที่ได้รับการรักษาด้วย T-YaSP มีการหดตัวของแผลเท่ากับร้อยละ 96.19 ซึ่งมากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมบวก ที่มีการหดตัวของแผลในวันที่ 11 เท่ากับร้อยละ 83.58 (รูปที่ 19C) ผลการทดสอบฤทธิ์ต่อการหายของแผลของตำรับยาสมานแผลในรูปแบบ YaSP แสดงดังรูปที่ 20A พบว่า ในวันที่ 3, 5, 7, 9 และ 11 หลังการทดสอบ หนูกลุ่มที่ได้รับการรักษาแผลด้วย YaSP มีขนาดของพื้นที่แผลลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมลบ ( $p < 0.05$ ) เช่นเดียวกับกับหนูกลุ่มที่ได้รับการรักษาแผลด้วยยาขี้ผึ้งซอคโคเซอร์ล (Solcoseryl ointment<sup>®</sup>) ซึ่งใช้เป็นกลุ่มควบคุมบวก (รูปที่ 20B) และพบว่าในวันที่ 7, 9 และ 11 หลังการทดสอบ หนูกลุ่มที่ได้รับการรักษาด้วย YaSP มีร้อยละการหดตัวของแผลไม่แตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมบวก ( $p < 0.05$ ) (รูปที่ 20C)

กระบวนการหายของแผลแบ่งออกได้เป็น 4 ระยะ คือ ระยะการห้ามเลือด ระยะการอักเสบ ระยะการแบ่งเซลล์ และระยะการปรับรูปร่าง ซึ่งมีหลายปัจจัยที่มีผลส่งเสริมการหายของแผล เช่น ปริมาณของปัจจัยการเจริญเติบโต หรือ growth factor ที่สำคัญได้แก่ transforming growth factor-beta1 หรือ TGF-beta1 ซึ่งมีบทบาทสำคัญในระยะการอักเสบและระยะการแบ่งเซลล์ ในระยะเริ่มต้นของการอักเสบ TGF-beta1 ทำหน้าที่ชักนำเซลล์เม็ดเลือดขาวเข้าสู่บริเวณแผลเพื่อกำจัดสิ่งแปลกปลอมหรือเนื้อตายบริเวณแผล และในระยะหลังของกระบวนการอักเสบ TGF-beta1 ทำหน้าที่ยับยั้งกระบวนการอักเสบ และกระตุ้นการแบ่งเซลล์บริเวณแผลเพื่อสร้างเนื้อเยื่อใหม่ vascular endothelial growth factor หรือ VEGF เป็นอีกหนึ่งปัจจัยการเจริญเติบโตที่มีความสำคัญในระยะการแบ่งเซลล์ของกระบวนการหายของแผล โดยทำหน้าที่ในการกระตุ้นการสร้างหลอดเลือดใหม่เพื่อนำสารอาหารและออกซิเจนมาหล่อเลี้ยงเนื้อเยื่อบริเวณแผล การศึกษาในครั้งนี้ ได้ตรวจวิเคราะห์ปริมาณของ TGF-beta1 และ VEGF ในเนื้อเยื่อแผล พบว่าหนูที่ทำให้เกิดแผลมีระดับของ TGF-beta1 และ VEGF ในเนื้อเยื่อสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญ

ทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อปกติก่อนการเกิดแผล (day 0) ( $p < 0.001$ ) ในวันที่ 7 หลังการทดสอบ หนูที่ได้รับการรักษาด้วยยาน้ำมันทองนพคุณ และ T-YaSP มีระดับของ TGF-beta1 และ VEGF ในเนื้อเยื่อมากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมลบ ( $p < 0.001$ ) แต่ในวันที่ 11 หลังการทดสอบ หนูที่ได้รับการรักษาด้วยยาน้ำมันทองนพคุณ และ T-YaSP มีระดับของ TGF-beta1 และ VEGF ในเนื้อเยื่อน้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมลบ ( $p < 0.001$ ) แสดงดังในตารางที่ 20 และจากการวิเคราะห์ปริมาณของ TGF-beta1 และ VEGF ในเนื้อเยื่อแผลที่ได้รับการรักษาด้วย YaSP พบว่า ในวันที่ 7 หลังการทดสอบ ที่ได้รับการรักษาด้วยยาซีผังซอคโคเซอร์ลีล และ YaSP มีระดับของ TGF-beta1 และ VEGF ในเนื้อเยื่อมากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมลบ ( $p < 0.001$ ) แต่ในวันที่ 11 หลังการทดสอบ หนูที่ได้รับการรักษาด้วยยาซีผังซอคโคเซอร์ลีล และ YaSP มีระดับของ TGF-beta1 และ VEGF ในเนื้อเยื่อน้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมลบ ( $p < 0.001$ ) แสดงดังตารางที่ 21

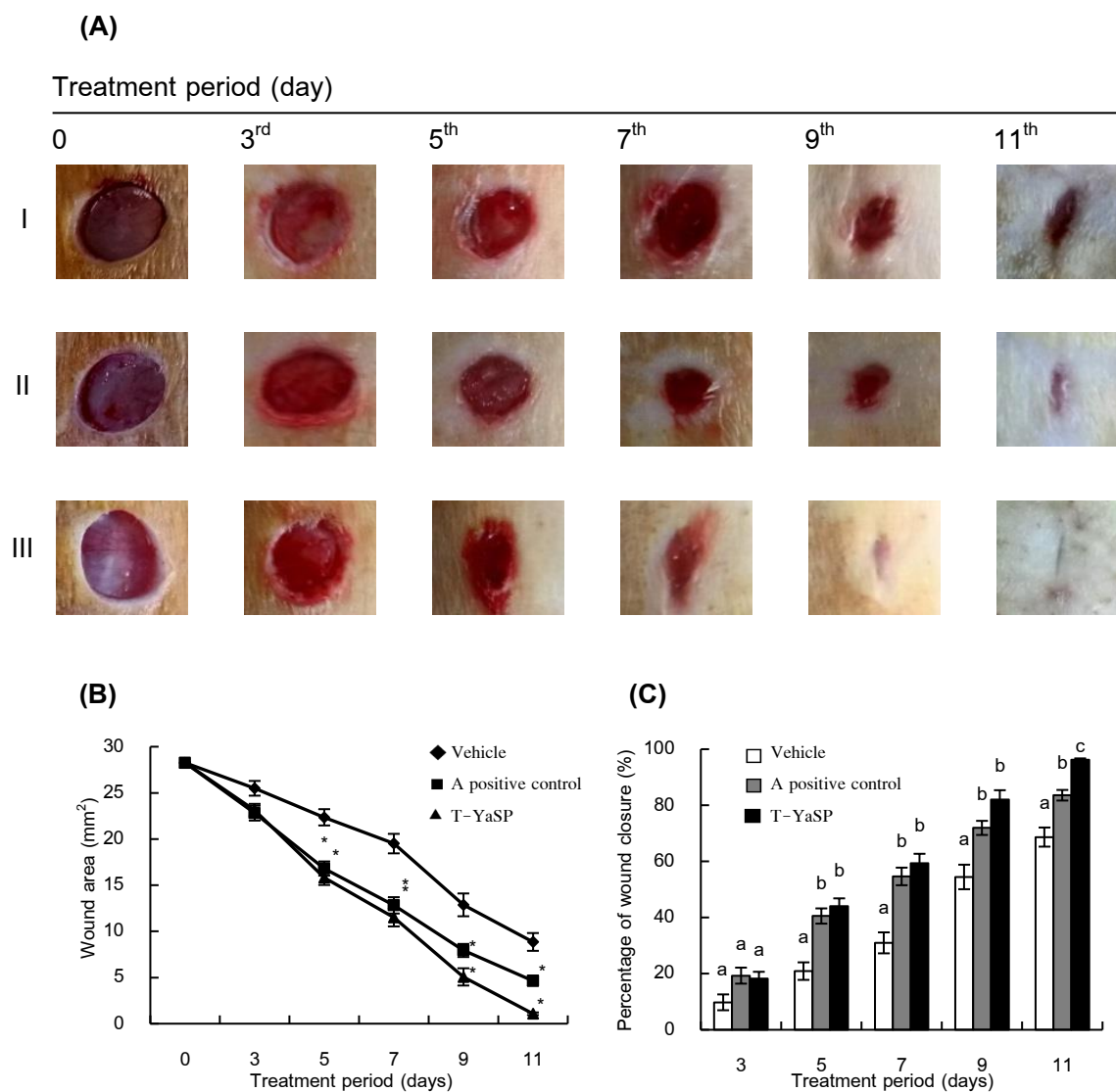
นอกเหนือจาก TGF-beta1 และ VEGF จะมีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการหายของแผล ในระยะการอักเสบ และระยะการแบ่งเซลล์แล้ว ยังเป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่มีความสำคัญต่อการสร้างเนื้อเยื่อใหม่ คือ กระบวนการสร้างคอลลาเจน ชนิดที่ 3 หรือ collagen III นอกจากนี้ในระยะการปรับรูปร่างก็มีอีกหนึ่งปัจจัยที่มีความสำคัญ และสามารถบ่งชี้ถึงการสร้างเนื้อเยื่อใหม่ที่สมบูรณ์ได้ คือ กระบวนการสร้างคอลลาเจน ชนิดที่ 1 หรือ collagen I ซึ่งทำหน้าที่สร้างความแข็งแรงให้กับเนื้อเยื่อที่สร้างใหม่บริเวณแผล และยังเป็นองค์ประกอบหลักที่พบในผิวหนังปกติ การศึกษาในครั้งนี้ มีการตรวจวิเคราะห์ปริมาณของ collagen I ในเนื้อเยื่อแผลที่ได้รับการรักษาด้วยยาสมานแผลในรูปแบบ T-YaSP และ YaSP พบว่า หนูที่ทำให้เกิดแผลมีระดับของ collagen I ในเนื้อเยื่อลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อปกติก่อนการเกิดแผล (day 0) ( $p < 0.001$ ) ในวันที่ 7 และ 11 หลังการทดสอบ หนูที่ได้รับการรักษาด้วยยาซีผังซอคโคเซอร์ลีล, ยาน้ำมันทองนพคุณ, T-YaSP และ YaSP มีระดับของ collagen I ในเนื้อเยื่อมากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมลบ ( $p < 0.001$ ) จากการตรวจวิเคราะห์ปริมาณของ collagen III พบว่า หนูที่ทำให้เกิดแผลมีระดับของ collagen III เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อปกติก่อนการเกิดแผล (day 0) ( $p < 0.001$ ) ในวันที่ 7 หลังการทดสอบ หนูที่ได้รับการรักษาด้วยยาซีผังซอคโคเซอร์ลีล, ยาน้ำมันทองนพคุณ, T-YaSP และ YaSP มีระดับของ collagen III ในเนื้อเยื่อแผลมากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมลบ ( $p < 0.001$ ) แต่ในวันที่ 11 หลังการรักษา พบว่าระดับของ collagen III ในเนื้อเยื่อแผลลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในหนูกลุ่มที่ได้รับการรักษาด้วยยาซีผังซอคโคเซอร์ลีล, ยาน้ำมันทองนพคุณ, T-YaSP และ YaSP ดังแสดงในตารางที่ 20 และ ตารางที่ 21

การศึกษาจุลกายวิภาคของเนื้อเยื่อแผล โดยวิธีการย้อมด้วย H&E พบว่า ในวันที่ 7 และ 11 หลังการทดสอบ มีเซลล์เม็ดเลือดขาวหนาแน่น และมีเซลล์ไฟโบรบลาสต์เพียงเล็กน้อย ในเนื้อเยื่อแผลของหนูกลุ่มควบคุม แต่ในเนื้อเยื่อแผลของหนูที่ได้รับการรักษาด้วย ยาซีผึ้ง ซอคโคเซอร์ริล, ยาน้ำมันทองนพคุณ, T-YaSP และ YaSP มีความหนาแน่นของเซลล์เม็ดเลือดขาวลดลงอย่างเห็นได้ชัด และมีเซลล์ไฟโบรบลาสต์มากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (รูปที่ 21 และ รูปที่ 22) จากการศึกษาลักษณะของเนื้อเยื่อแผลด้วยวิธีการย้อมด้วย Masson's trichrome เพื่อประเมินความหนาแน่นของคอลลาเจน พบว่า ในวันที่ 7 และ 11 หลังการทดสอบ เนื้อเยื่อแผลที่ได้รับการรักษาด้วย ยาซีผึ้ง ซอคโคเซอร์ริล, ยาน้ำมันทองนพคุณ, T-YaSP และ YaSP มีความหนาแน่นของคอลลาเจนมากกว่าอย่างเห็นได้ชัดเมื่อเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อแผล ในหนูกลุ่มควบคุม (รูปที่ 23 และ รูปที่ 24)

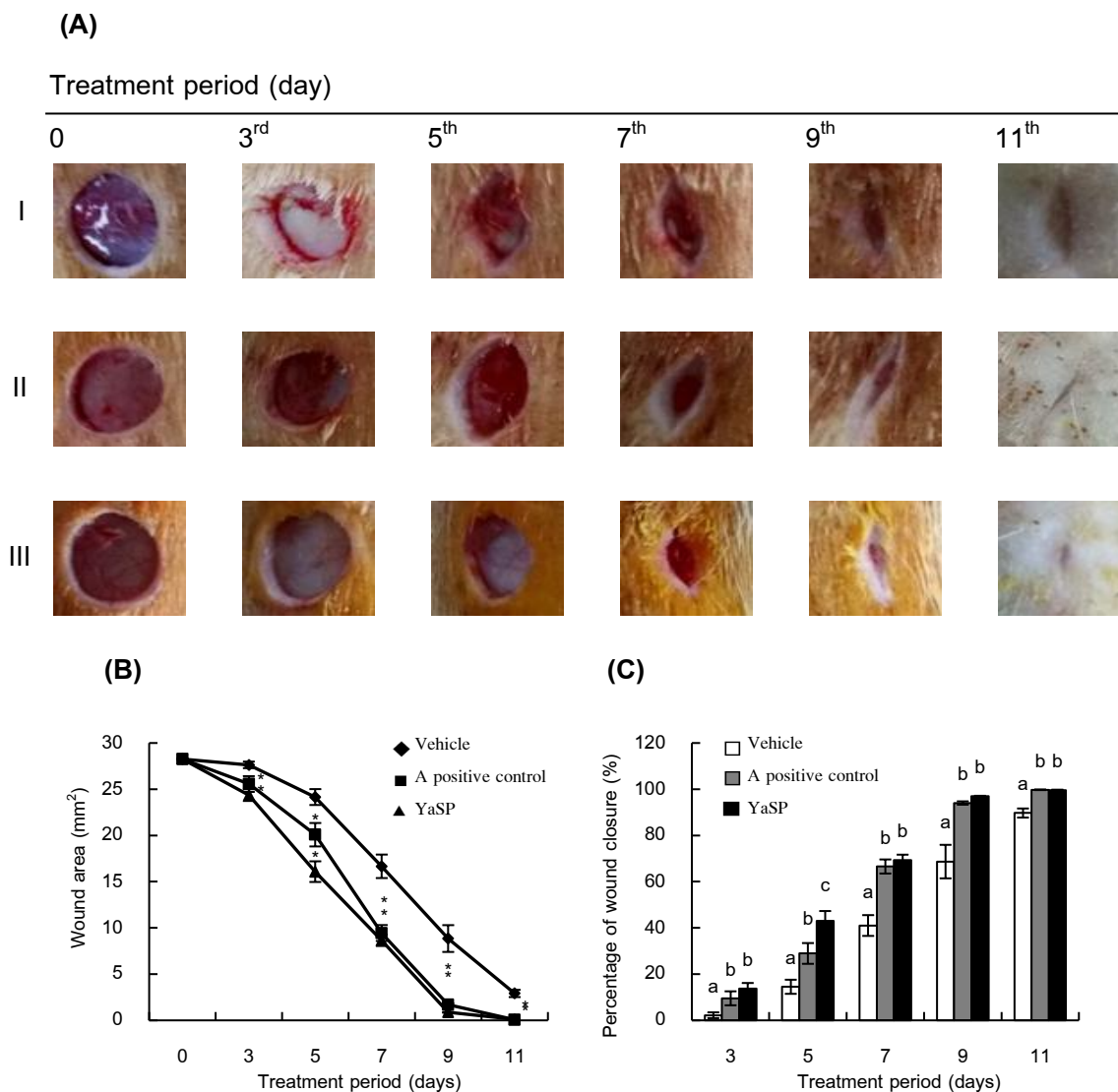
จากการวิเคราะห์ผลการทดสอบเปรียบเทียบฤทธิ์ต่อการหายของแผล โดยประเมินจากการวัดขนาดพื้นที่แผลเมื่อรักษาด้วยยาสมานแผลในรูปแบบ T-YaSP และ YaSP พบว่า ในวันที่ 7 และ 11 หลังการทดสอบ หนูที่ได้รับการรักษาด้วย YaSP มีขนาดของพื้นที่แผลน้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับยาสมานแผลในรูปแบบ T-YaSP ( $p < 0.05$ ) (รูปที่ 25A)

จากการวิเคราะห์ผลการทดสอบเปรียบเทียบฤทธิ์ต่อการหายของแผล โดยการประเมินปริมาณของ TGF-beta1 และ VEGF ในเนื้อเยื่อแผลที่ได้รับการรักษาด้วยยาสมานแผลในรูปแบบ T-YaSP และ YaSP พบว่า ในวันที่ 7 หลังการทดสอบ หนูที่ได้รับการรักษาด้วย T-YaSP มีระดับของ TGF-beta1 และ VEGF ในเนื้อเยื่อแผลสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับ YaSP ( $p < 0.05$ ) วันที่ 11 หลังการทดสอบ เนื้อเยื่อแผลที่ได้รับการรักษาด้วย T-YaSP มีระดับของ TGF-beta1 น้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับ YaSP แต่ระดับของ VEGF ในเนื้อเยื่อแผลที่ได้รับการรักษาด้วย YaSP น้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับ T-YaSP ( $p < 0.05$ ) (รูปที่ 25B และ รูปที่ 25C)

จากการวิเคราะห์ผลการทดสอบเปรียบเทียบฤทธิ์ต่อการหายของแผล โดยการประเมินปริมาณของ collagen I และ collagen III ในเนื้อเยื่อแผลที่ได้รับการรักษาด้วยยาสมานแผลในรูปแบบ T-YaSP และ YaSP พบว่า ในวันที่ 7 หลังการทดสอบ หนูที่ได้รับการรักษาแผลด้วย T-YaSP และ YaSP มีระดับของ collagen I และ collagen III ไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่ในวันที่ 11 หลังการรักษา พบว่า หนูที่ได้รับการรักษาแผลด้วย YaSP มีระดับของ collagen I และ collagen III สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับ T-YaSP ดังแสดงในรูปที่ 25D และรูปที่ 25E



รูปที่ 19 Representative macrophotographs of wounds (A), wound areas (B), and percentage of wound closure (C) in non-diabetic Wistar rats, measured at the operation day (day 0) and on days 3, 5, 7, 9 and 11 after daily treatment with vehicle, a traditional herbal oil Thongnoppakhun<sup>®</sup> (a positive control), or T-YaSP. The results represent the mean±SEM of 9-10 animals per group. \*  $p < 0.05$  vs the control. <sup>(a-c)</sup> Values in the same days followed by a different letter are significantly different at  $p < 0.05$ . (I: vehicle control; II: positive control and III: T-YaSP)



รูปที่ 20 Representative macrophotographs of wounds (A), wound areas (B) and percentage of wound closure (C) in non-diabetic Wistar rats, measured at the operation day (day 0) and on days 3, 5, 7, 9 and 11 after daily treatment with vehicle, Solcoseryl ointment<sup>®</sup> (a positive control), or YaSP. The results represent the mean $\pm$ SEM of 9-10 animals per group. \*  $p < 0.05$  vs the control. <sup>(a-c)</sup> Values in the same days followed by a different letter are significantly different at  $p < 0.05$ . (I: vehicle control; II: positive control and III: YaSP)

ตารางที่ 20 The levels of transforming growth factor beta-1 (TGF-beta1), vascular endothelial growth factor (VEGF), collagen type I, and collagen type III in skin wounds of non-diabetic rats treated with traditionally prepared-Ya-Samarn-Phlae (T-YaSP).

Parameters	Treatment period (days)	Test groups (mean±SEM)		
		Vehicle	TNK	T-YaSP
TGF-beta1 (ng/L)	Intact	77.44±1.11		
	7	154.93±3.92 <sup>*a</sup>	199.47±2.91 <sup>*b</sup>	243.32±3.96 <sup>*c</sup>
	11	143.27±1.34 <sup>*c</sup>	119.16±2.72 <sup>*b</sup>	105.59±2.59 <sup>*a</sup>
VEGF (ng/L)	Intact	59.80±4.27		
	7	211.82±1.49 <sup>*a</sup>	361.25±10.40 <sup>*b</sup>	553.71±21.41 <sup>*c</sup>
	11	321.62±2.56 <sup>*c</sup>	267.45±2.31 <sup>*b</sup>	231.98±2.10 <sup>*a</sup>
Collagen I (ng/mL)	Intact	136.36±2.94		
	7	60.52±0.50 <sup>*a</sup>	79.08±0.44 <sup>*b</sup>	92.21±3.48 <sup>*b</sup>
	11	76.82±2.96 <sup>*a</sup>	92.10±2.22 <sup>*b</sup>	107.28±0.96 <sup>*c</sup>
Collagen III (ng/mL)	Intact	16.38±0.59		
	7	52.61±1.41 <sup>*a</sup>	66.44±5.81 <sup>*bc</sup>	79.91±3.75 <sup>*c</sup>
	11	66.60±1.68 <sup>*c</sup>	55.32±4.74 <sup>*bc</sup>	50.81±1.49 <sup>*a</sup>

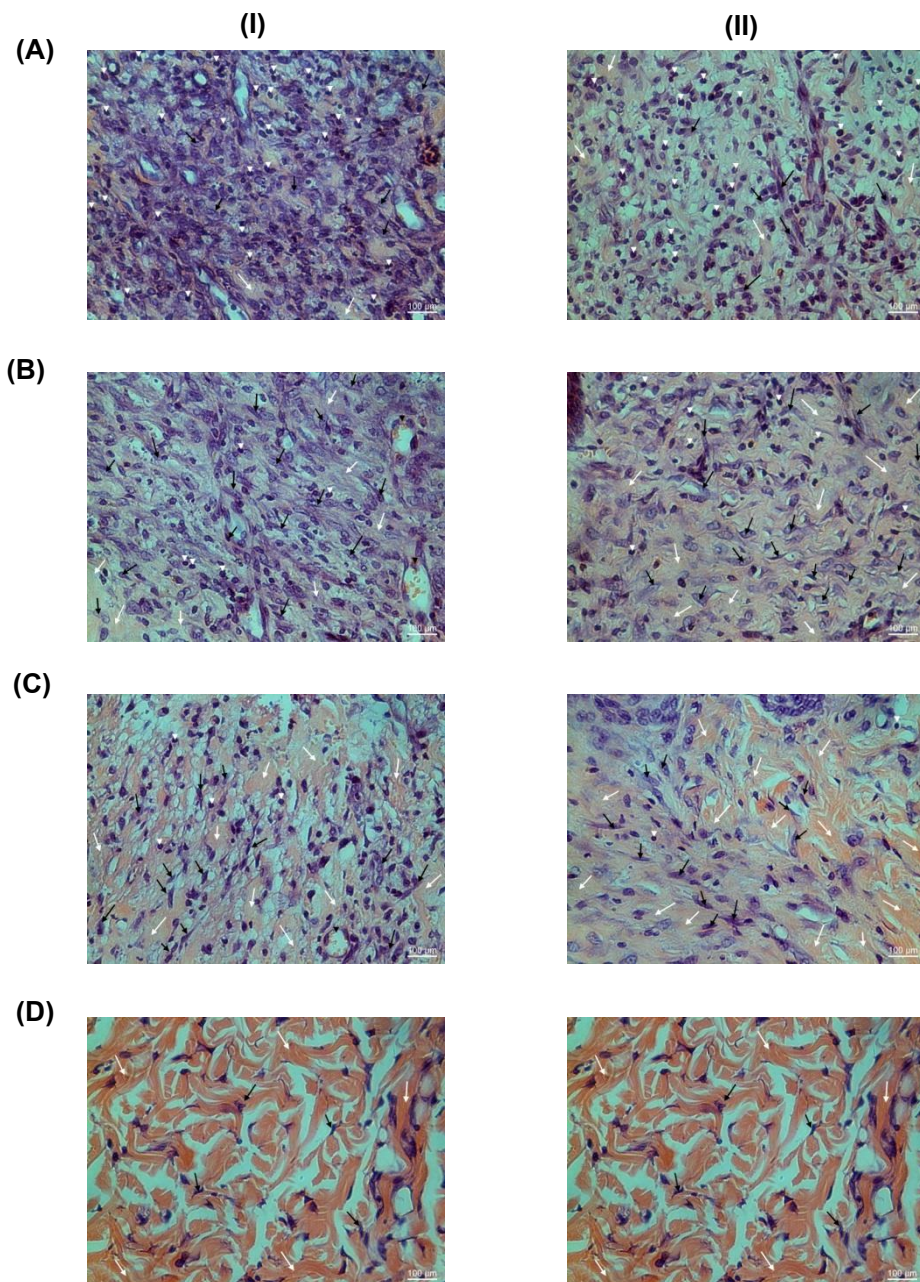
The results represent the mean±SEM of 4-5 animals per group. \*  $p < 0.001$  vs the day 0. <sup>(a-c)</sup> Values in the same days followed by a different letter are significantly different ( $p < 0.001$ ). TNK; a commercial available traditional herbal oil Thongnoppakhun<sup>®</sup> was used as a positive control.



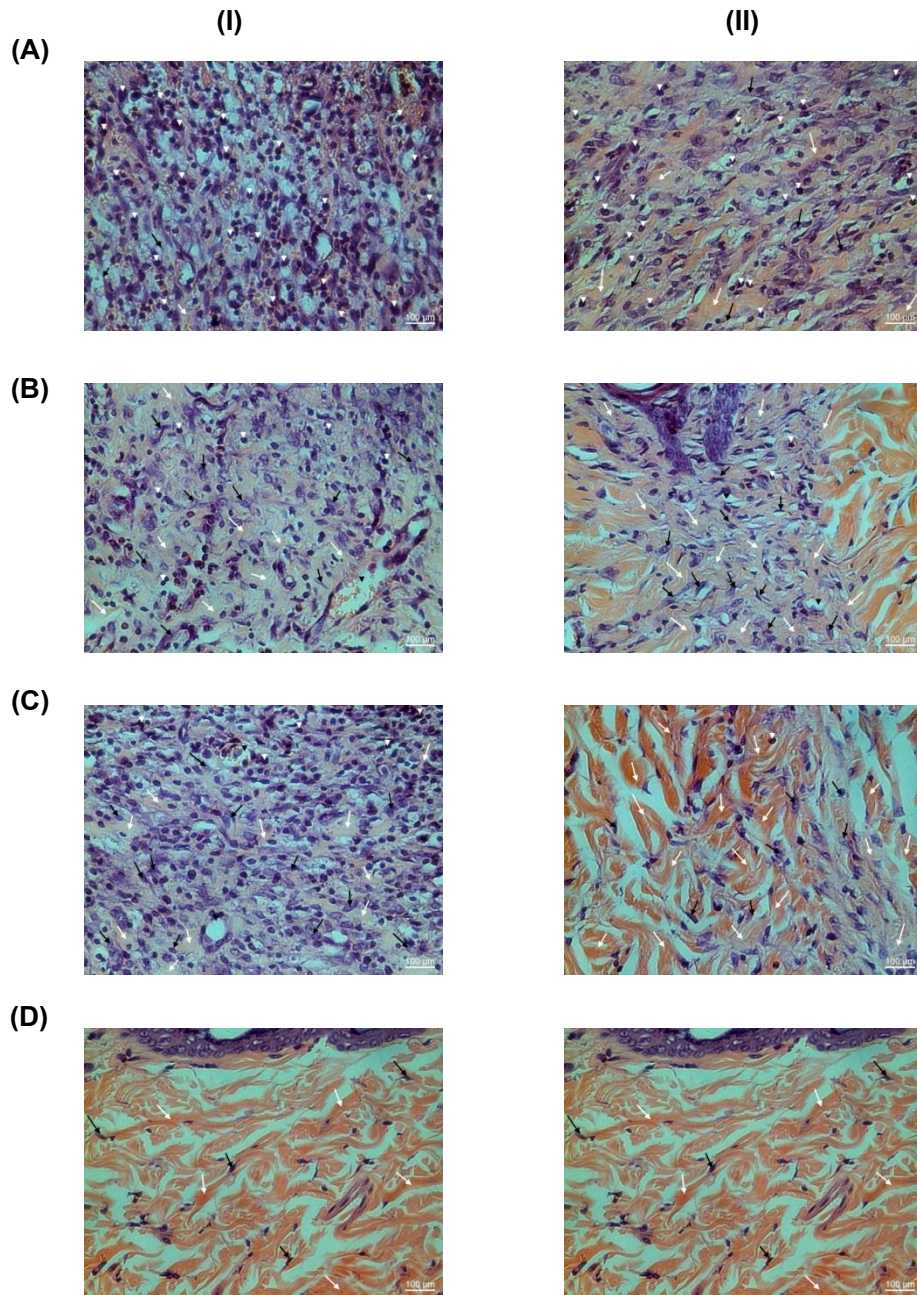
ตารางที่ 21 The levels of transforming growth factor beta-1 (TGF-beta1), vascular endothelial growth factor (VEGF), collagen type I, and collagen type III in skin wounds of non-diabetic rats treated with ointment base for Ya-Samarn-Phlae tulle-gras dressings (YaSP).

Parameters	Treatment period (days)	Test groups (mean±SEM)		
		Vehicle	Solcoseryl ointment <sup>®</sup>	YaSP
TGF-beta1 (ng/L)	Intact	77.44±1.11		
	7	147.50±1.17 <sup>*,a</sup>	259.16±12.38 <sup>*,c</sup>	201.72±5.48 <sup>*,b</sup>
	11	131.87±0.70 <sup>*,c</sup>	111.51±0.43 <sup>*,a</sup>	118.70±0.51 <sup>*,b</sup>
VEGF (ng/L)	Intact	59.80±4.27		
	7	182.08±1.03 <sup>*,a</sup>	330.89±7.20 <sup>*,b</sup>	356.47±6.38 <sup>*,b</sup>
	11	241.74±2.78 <sup>*,b</sup>	212.95±5.07 <sup>*,a</sup>	206.76±3.98 <sup>*,a</sup>
Collagen I (ng/mL)	Intact	136.36±2.94		
	7	47.19±0.76 <sup>*,a</sup>	103.09±4.69 <sup>*,c</sup>	83.82±3.99 <sup>*,b</sup>
	11	80.68±4.30 <sup>*,a</sup>	124.26±2.35 <sup>*,bc</sup>	115.70±1.49 <sup>*,b</sup>
Collagen III (ng/mL)	Intact	16.38±0.59		
	7	36.88±0.59 <sup>*,a</sup>	72.63±4.35 <sup>*,b</sup>	74.86±4.24 <sup>*,b</sup>
	11	52.07±3.75 <sup>*,b</sup>	28.25±0.94 <sup>*,a</sup>	29.78±3.26 <sup>*,a</sup>

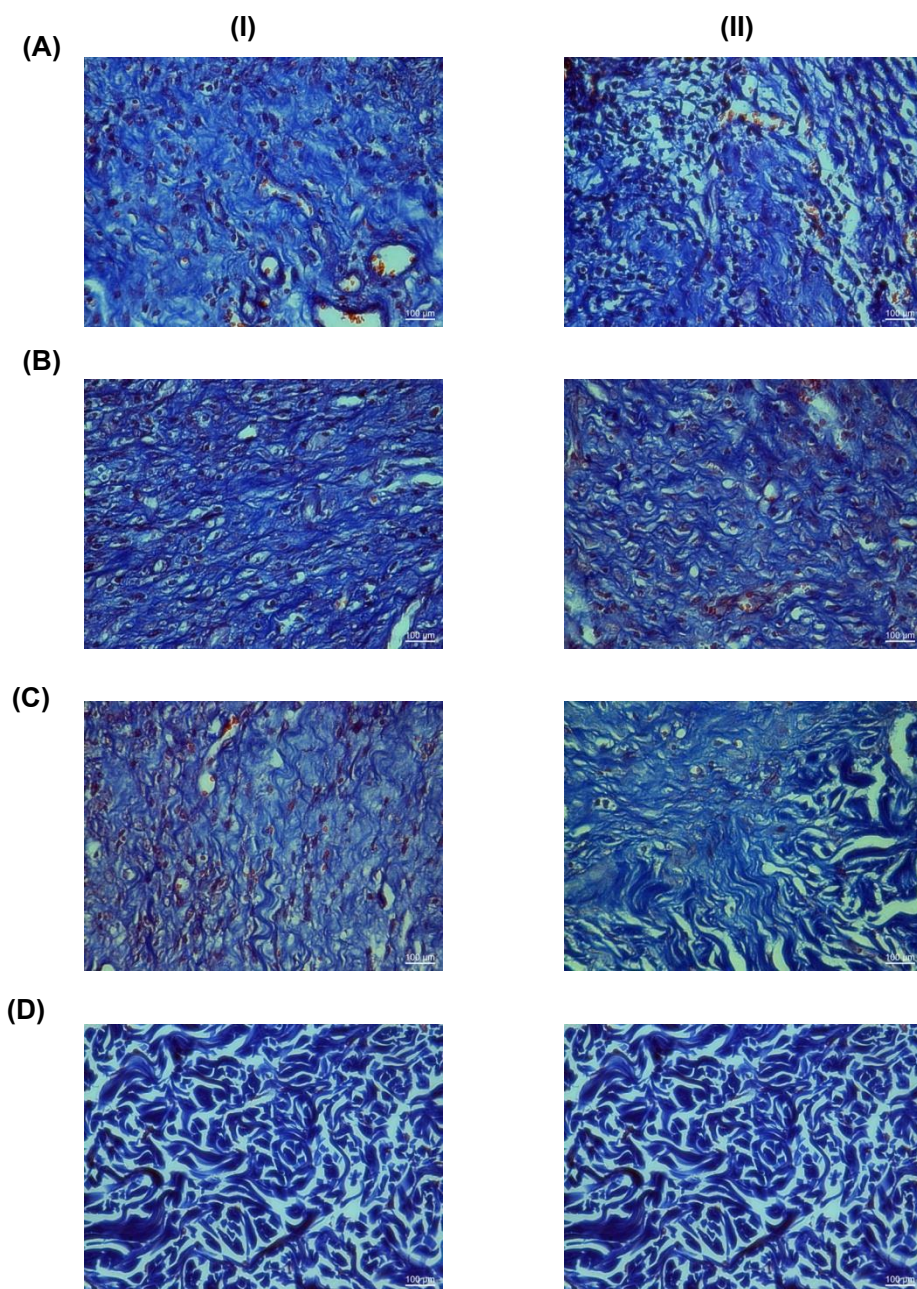
The results represent the mean±SEM of 4-5 animals per group. \*  $p < 0.001$  vs the day 0. (a-c) Values in the same days followed by a different letter are significantly different ( $p < 0.001$ ). Solcoseryl ointment<sup>®</sup> was used as a positive control.



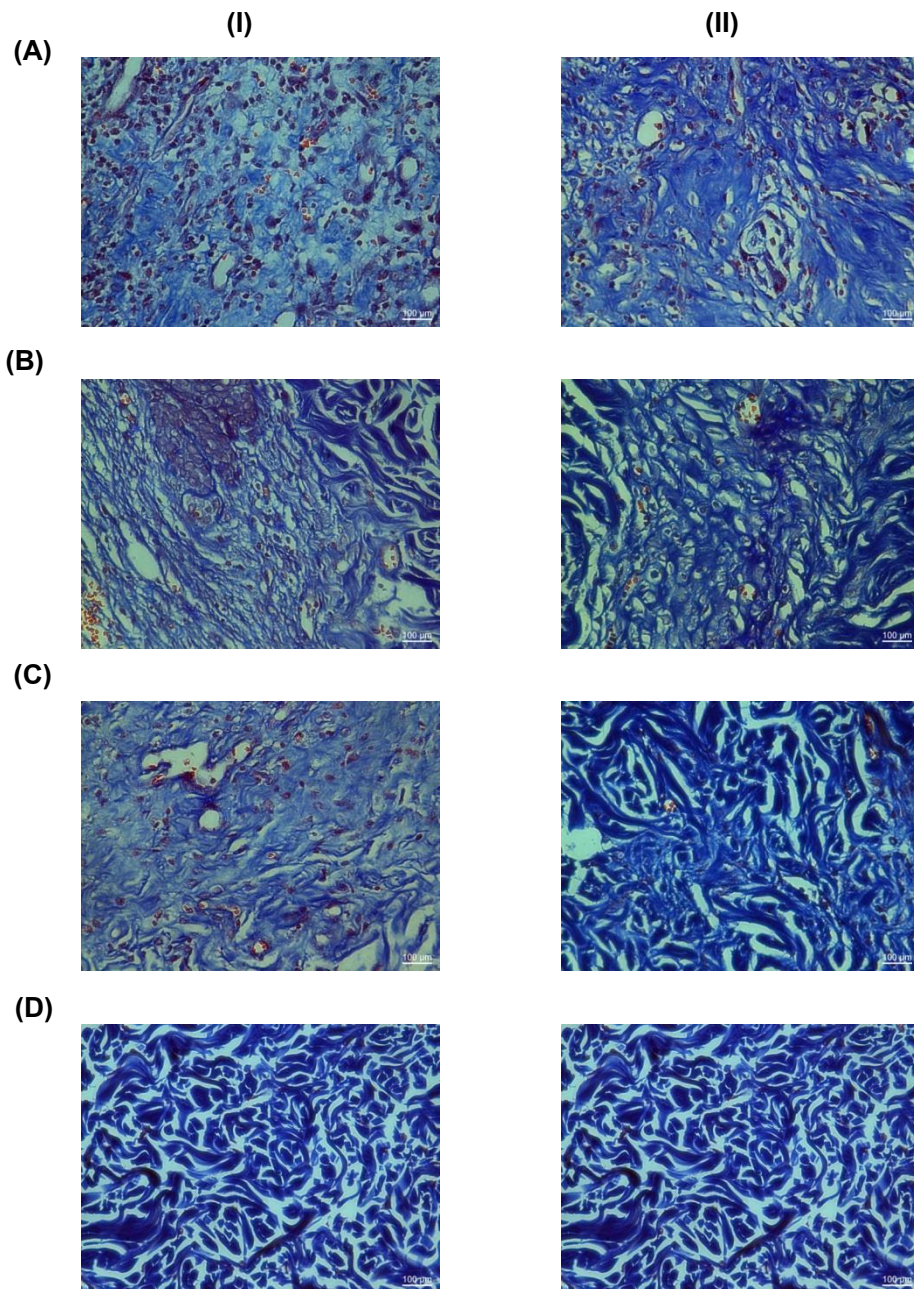
រូបភាព 21 H&E stained tissue sections from non-diabetic wound tissues treated with vehicle (A), a commercial available traditional herbal oil Thongnoppakhun®; (a positive control; B), traditionally prepared-Ya-Samarn-Phlae (T-YaSP; C) and normal tissue (D) for 7 (I) and 11 (II) days. The T-YaSP treated rats showing large amount of collagen (white arrow), fibroblast (black arrow), and small number of inflammatory cell (white arrowhead). Magnification, 40X; scale bars, 100  $\mu$ m.



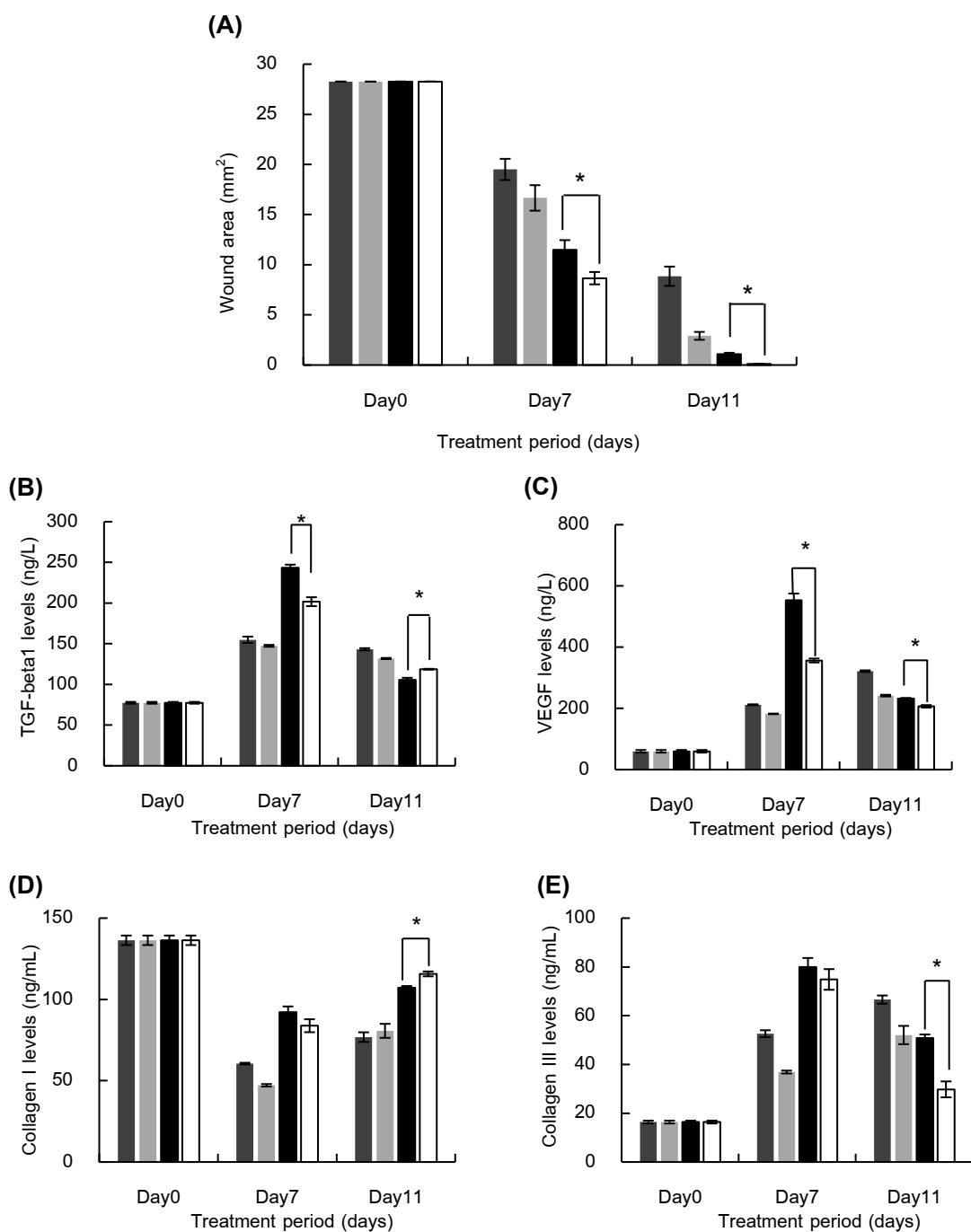
รูปที่ 22 H&E stained tissue sections from non-diabetic wound tissues treated with vehicle (A), Solcoseryl ointment<sup>®</sup> (reference drug; B), ointment base for Ya-Samarn-Phlae tulle-gras dressings (YaSP; C) and normal tissue (D) for 7 (I) and 11 (II) days. The YaSP treated rats showing amount of collagen (white arrow) and fibroblast (black arrow) and small number of inflammatory cell (white arrowhead). Magnification, 40X; scale bars, 100 μm.



รูปที่ 23 Masson's trichrome stained tissue sections from non-diabetic wound tissues treated with vehicle (A), a commercial available traditional herbal oil Thongnoppakhun®; (a positive control; B), traditionally prepared-Ya-Samarn-Phlae (T-YaSP; C) and normal tissue (D) for 7 (I) and 11 (II) days. The T-YaSP treated rats showing amount of collagen (dark blue). Magnification, 40X; scale bars, 100  $\mu$ m.



รูปที่ 24 Masson's trichrome stained tissue sections from non-diabetic wound tissues treated with vehicle (A), Solcoseryl ointment<sup>®</sup> (reference drug; B), ointment base for Ya-Samarn-Phlae tulle-gras dressings (YaSP; C) and normal tissue (D) for 7 (I) and 11 (II) days. The YaSP treated rats showing amount of collagen (dark blue). Magnification, 40X; scale bars, 100 µm.



**รูปที่ 25** The comparison of wound healing activity, including wound area (A), growth factors (B and C) and collagen content (D and E) of non-diabetic wounds treated with T-YaSP (black bars) and YaSP (white bars) in excision wound model. Vehicle of T-YaSP (dark gray bars) and vehicle of YaSP (light gray bars). \*Significantly difference between rats treated with T-YaSP and YaSP ( $p < 0.05$ ) (Independent samples T-Test).

## 6.2 ฤทธิ์ต่อการหายของแผลและกลไกการออกฤทธิ์ของ T-YaSP และ YaSP ในหนูเบาหวาน (Goto-Kakizaki (GK) rats)

โรคเบาหวานจัดอยู่ในกลุ่มโรคที่มีความผิดปกติของระบบเมตาโบลิซึมที่เกี่ยวข้องกับการมีภาวะน้ำตาลในเลือดสูง ซึ่งนำไปสู่การเกิดภาวะแทรกซ้อนต่าง ๆ ความบกพร่องของกระบวนการหายของแผลในผู้ป่วยเบาหวานเป็นหนึ่งในภาวะแทรกซ้อนที่สำคัญและพบได้บ่อยที่ส่งผลกระทบต่อการทำงานของผู้ป่วย ในปัจจุบันการดูแลรักษาแผลเบาหวาน มีทั้งแบบการทำแผลกำจัดเนื้อตายร่วมกับการได้รับยาปฏิชีวนะ และการควบคุมระดับน้ำตาลในเลือด เพื่อประคับประคองไม่ให้เกิดความรุนแรงของโรค การใช้สมุนไพรรักษาแผลเบาหวานเป็นอีกทางเลือกหนึ่งของการดูแลผู้ป่วย การศึกษาในครั้งนี้ มีการประเมินฤทธิ์ต่อการหายของแผล และกลไกการออกฤทธิ์ของยาสมานแผลในรูปแบบ T-YaSP และ YaSP ในหนูเบาหวาน สายพันธุ์ GK rat ซึ่งเป็นหนูที่มีภาวะน้ำตาลในเลือดสูงมาแต่กำเนิด โดยจัดเป็นโรคเบาหวานชนิดที่ 2 โดยมีค่าระดับน้ำตาลในเลือดหลังจากอดอาหารอยู่ในช่วง 10.28-12.98 มิลลิโมลาร์ต่อลิตร (รูปที่ 26) จากการศึกษาฤทธิ์ต่อการหายของแผลในหนูเบาหวานที่ได้รับการรักษาด้วย T-YaSP แสดงดังรูปที่ 27A ในวันที่ 3, 5, 7, 9 และ 11 หลังการทดสอบ ขนาดของพื้นที่แผลในหนูเบาหวานที่ได้รับการรักษาด้วย T-YaSP น้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (p < 0.05) (รูปที่ 27B) โดยมีการหดตัวของแผล เท่ากับร้อยละ 30.32, 51.47, 72.32, 90.85 และ 96.30 ตามลำดับ ดังรูปที่ 27C จากการศึกษาฤทธิ์ต่อการหายของแผลในหนูเบาหวานที่ได้รับการรักษาด้วย YaSP แสดงดังรูปที่ 28A ในวันที่ 3, 5, 7, 9 และ 11 หลังการทดสอบ ขนาดของพื้นที่แผลในหนูเบาหวานที่ได้รับการรักษาด้วย YaSP น้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (p < 0.05) (รูปที่ 28B) โดยมีการหดตัวของแผล เท่ากับร้อยละ 25.78, 39.97, 67.33, 84.55 และ 96.78 ตามลำดับ ดังรูปที่ 28C

ในวันที่ 11 หลังการรักษา มีการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณของ TGF-beta1, VEGF, collagen I และ collagen III ในเนื้อเยื่อแผลเบาหวาน พบว่า หนูเบาหวานกลุ่มควบคุมที่ได้รับการรักษาด้วย vehicle มีระดับของ TGF-beta1, VEGF และ collagen III เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับค่าเริ่มต้น (day 0) แต่ระดับของ collagen I ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับค่าเริ่มต้น (day 0) ในส่วนของหนูเบาหวานที่ได้รับการรักษาแผลด้วย T-YaSP, YaSP, Thongnoppakhun® และ Solcoseryl ointment® มีระดับของ TGF-beta1, VEGF, collagen I และ collagen III มากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (p < 0.001) แสดงดังตารางที่ 22 และ ตารางที่ 23

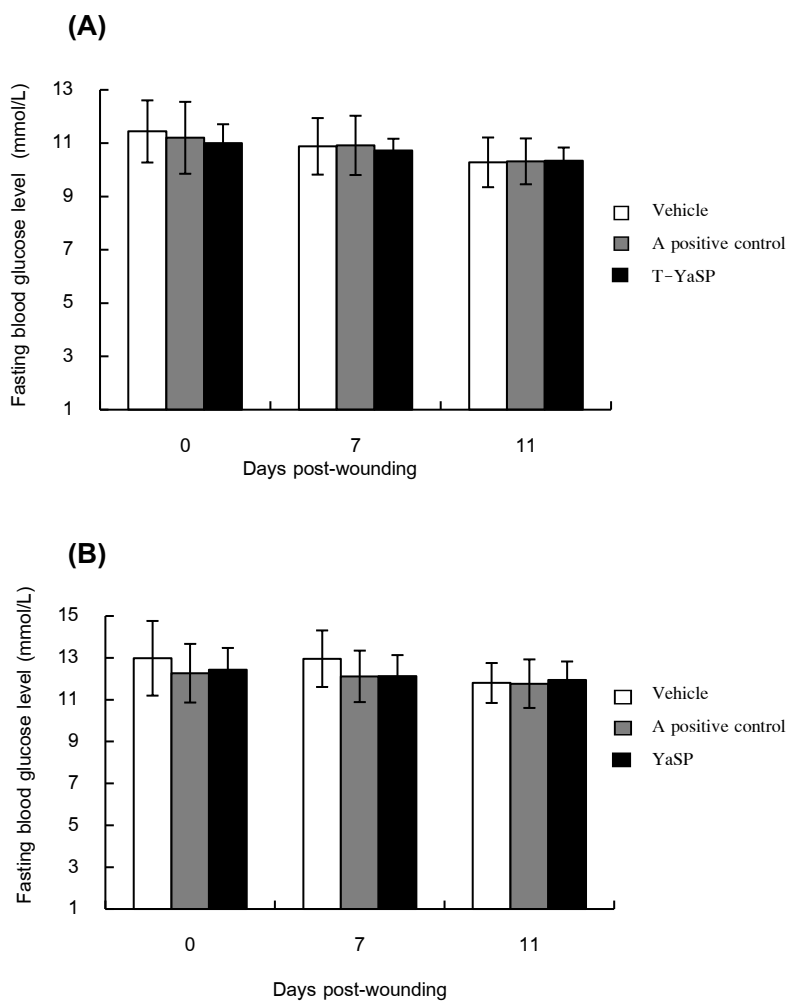
การศึกษาจุลกายวิภาคของเนื้อเยื่อแผลเบาหวาน โดยวิธีการย้อมด้วย H&E พบว่า ในวันที่ 11 หลังการทดสอบ มีเซลล์เม็ดเลือดขาวหนาแน่น และมีเซลล์ไฟโบรบลาสต์เพียงเล็กน้อย

ในเนื้อเยื่อแผลของหนูเบาหวานกลุ่มควบคุมลบ แต่ในเนื้อเยื่อแผลของหนูเบาหวานที่ได้รับการรักษาด้วย T-YaSP, YaSP, Thongnoppakhun<sup>®</sup> และ Solcoseryl ointment<sup>®</sup> มีความหนาแน่นของเซลล์เม็ดเลือดขาวลดลงอย่างเห็นได้ชัด และมีเซลล์ไฟโบรบลาสต์มากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมลบ (รูปที่ 29) จากการศึกษาลักษณะของเนื้อเยื่อแผลเบาหวานด้วยวิธีการย้อมด้วย Masson's trichrome เพื่อประเมินความหนาแน่นของคอลลาเจน พบว่า ในวันที่ 11 หลังการทดสอบ เนื้อเยื่อแผลเบาหวานที่ได้รับการรักษาด้วย T-YaSP, YaSP, Thongnoppakhun<sup>®</sup> และ Solcoseryl ointment<sup>®</sup> มีความหนาแน่นของคอลลาเจนมากกว่าอย่างเห็นได้ชัดเมื่อเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อแผลเบาหวานในหนูกลุ่มควบคุมลบ (รูปที่ 30)

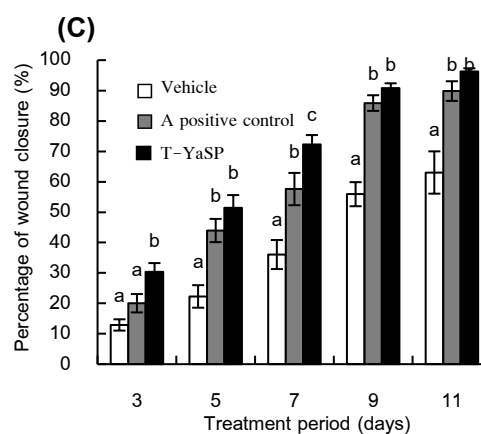
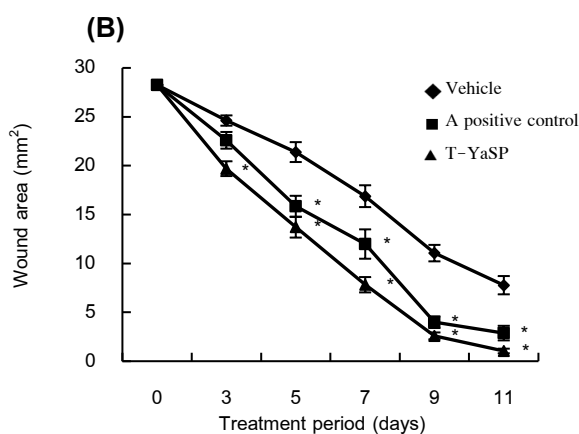
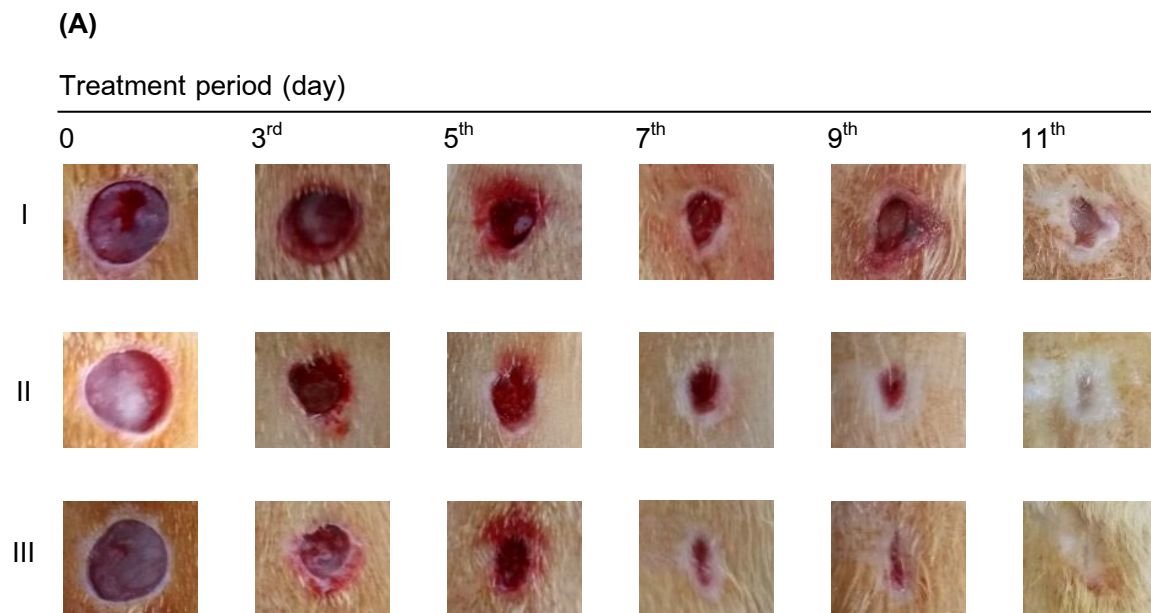
จากการวิเคราะห์ผลการทดสอบเปรียบเทียบฤทธิ์กระตุ้นการหายของแผลหลังจากรักษาด้วยยาสมานแผลในรูปแบบ T-YaSP และ YaSP โดยประเมินจากการวัดขนาดพื้นที่แผล พบว่า ในวันที่ 11 หลังการทดสอบ หนูที่ได้รับการรักษาด้วย T-YaSP และ YaSP มีขนาดพื้นที่แผลไม่แตกต่างกันทางสถิติ (รูปที่ 31A)

จากการวิเคราะห์ผลการทดสอบ โดยประเมินปริมาณของ TGF-beta1, VEGF, collagen I และ collagen III ในหนูเบาหวานที่ได้รับการรักษาแผลด้วย T-YaSP และ YaSP พบว่า เนื้อเยื่อแผลในหนูเบาหวานที่ได้รับการรักษาด้วย YaSP มีระดับของ TGF-beta1 และ collagen I มากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับ T-YaSP ในทางตรงกันข้าม พบว่า เนื้อเยื่อแผลในหนูเบาหวานที่ได้รับการรักษาด้วย YaSP มีระดับของ collagen III น้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับ T-YaSP และไม่พบความแตกต่างของระดับของ VEGF ในเนื้อเยื่อแผลเบาหวานที่ได้รับการรักษาด้วย T-YaSP และ YaSP (รูปที่ 31B-31E)

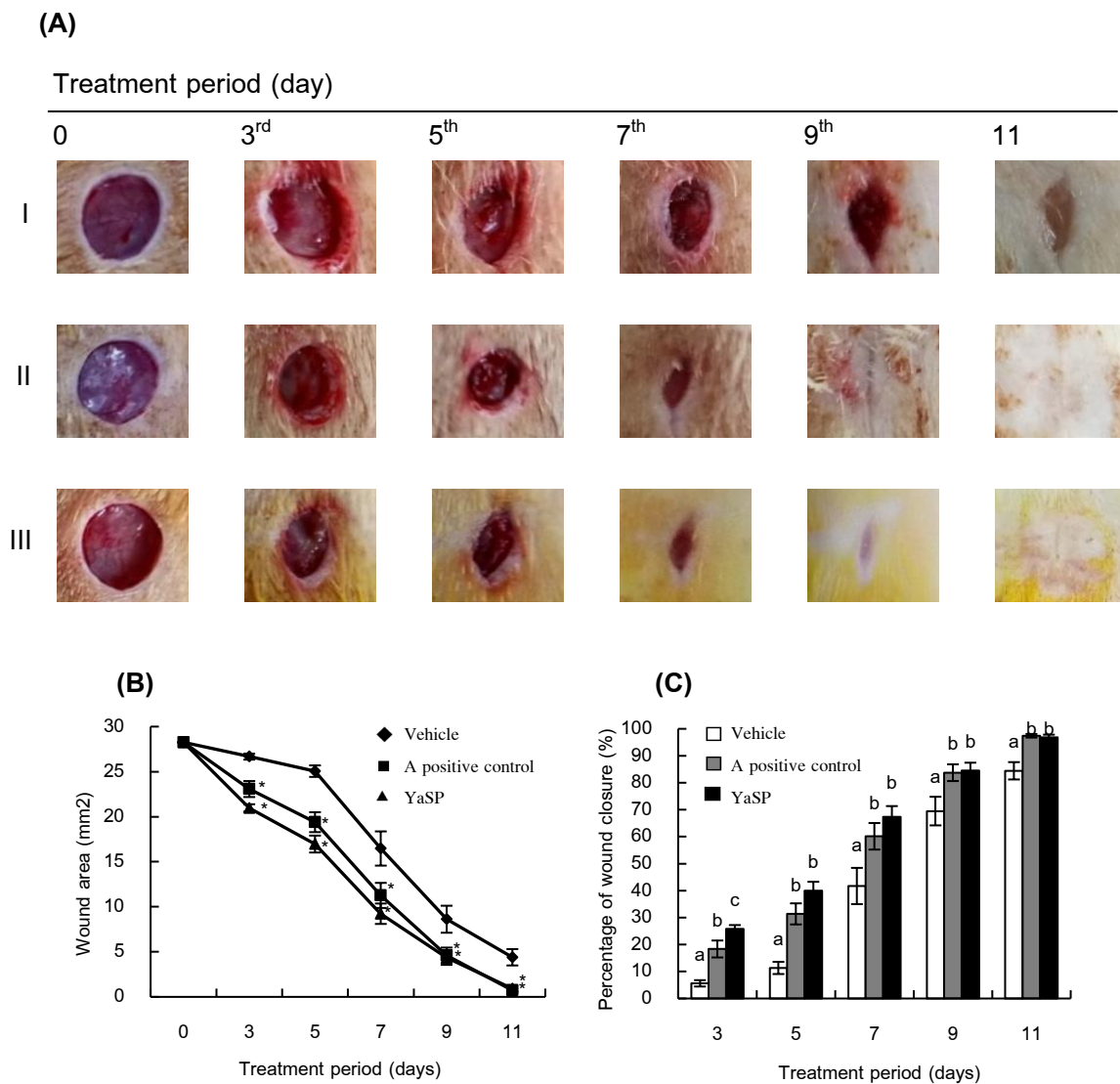




รูปที่ 26 The fasting blood glucose level of rats treated with T-YaSP (A) and YaSP (B). The data represent the mean $\pm$ SEM of 5-6 animals per group.



**รูปที่ 27** Representative macrophotographs of wounds (A), wound areas (B) and percentage wound closure (C) in type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats, measured at the operation day (day 0) and on days 3, 5, 7, 9 and 11 after daily treatment with vehicle, a commercial available traditional herbal oil Thongnoppakhun<sup>®</sup> (a positive control), or T-YaSP. The results represent the mean $\pm$ SEM of 9-10 animals per group. \*  $p < 0.05$  vs the control. <sup>(a-c)</sup> Values in the same days followed by a different letter are significantly different ( $p < 0.05$ ). (I: vehicle control; II: positive control and III: T-YaSP)



รูปที่ 28 Representative macrophotographs of wounds (A), wound areas (B) and percentage wound closure (C) in type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats, measured at the operation day (day 0) and on days 3, 5, 7, 9 and 11 after daily treatment with vehicle, Solcoseryl ointment<sup>®</sup> (a positive control), or ointment base for Ya-Samarn-Phlae tulle-gras dressings (YaSP). The results represent the mean $\pm$ SEM of 9-10 animals per group. \*  $p < 0.05$  vs the control. <sup>(a-c)</sup> Values in the same days followed by a different letter are significantly different ( $p < 0.05$ ). (I: vehicle control; II: positive control and III: YaSP)

ตารางที่ 22 The levels of transforming growth factor beta-1 (TGF-beta1), vascular endothelial growth factor (VEGF), collagen type I, and collagen type III in type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats treated with traditionally prepared-Ya-Samarn-Phlae (T-YaSP).

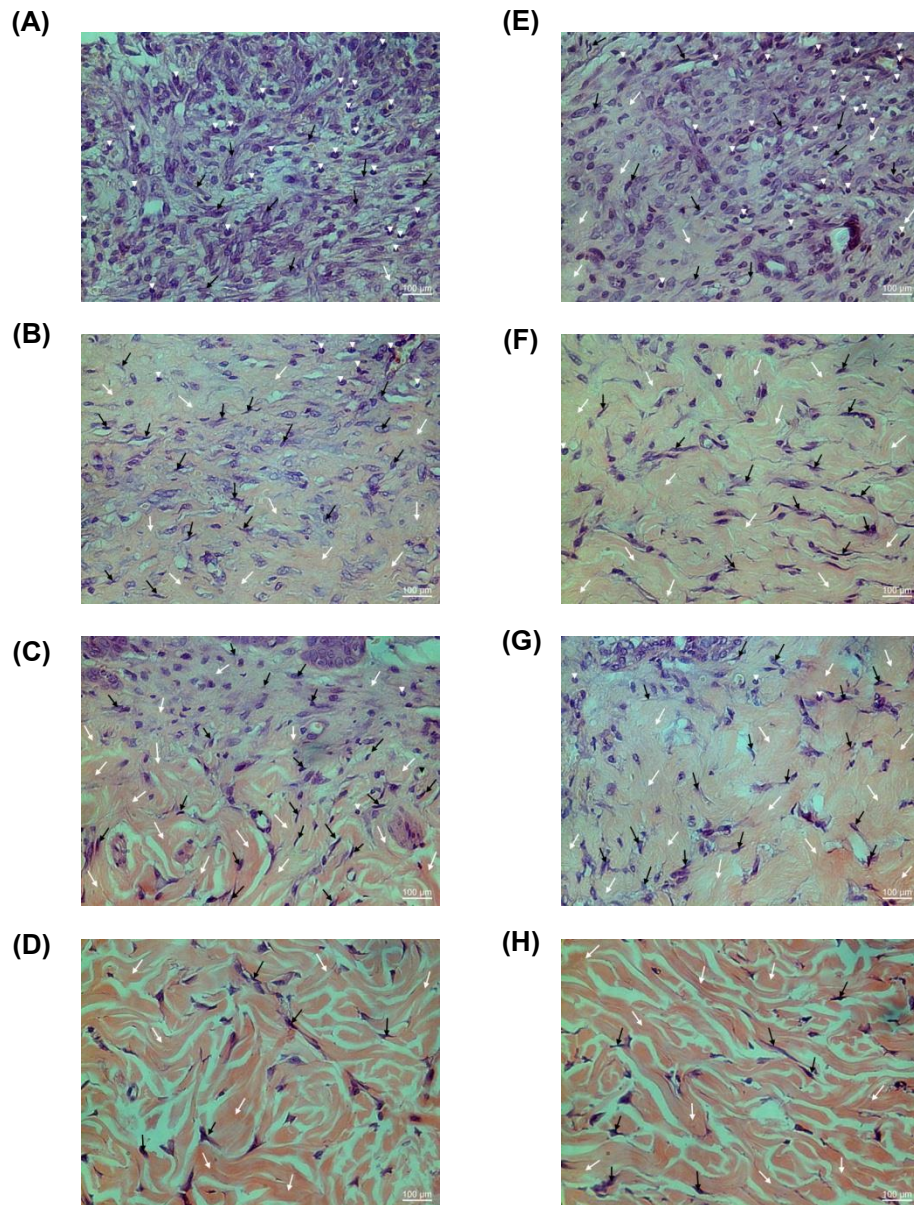
Parameters	Treatment period (days)	Test groups (mean±SEM)		
		Vehicle	TNK	T-YaSP
TGF-beta1	Intact	36.46±2.01		
(ng/L)	11	49.19±1.69 <sup>*.a</sup>	77.72±2.86 <sup>*.b</sup>	85.19±0.71 <sup>*.b</sup>
VEGF	Intact	28.38±0.23		
(ng/L)	11	99.80±3.89 <sup>*.a</sup>	202.21±1.27 <sup>*.b</sup>	211.71±1.76 <sup>*.b</sup>
Collagen I	Intact	101.42±0.89		
(ng/mL)	11	50.35±0.22 <sup>*.a</sup>	88.37±1.24 <sup>*.b</sup>	93.60±0.75 <sup>*.c</sup>
Collagen III	Intact	19.71±0.46		
(ng/mL)	11	80.82±0.55 <sup>*.b</sup>	61.45±0.53 <sup>*.a</sup>	58.87±0.59 <sup>*.a</sup>

The results represent the mean±SEM of 5-6 animals per group. \*  $p < 0.001$  vs pre-treatment (day 0). <sup>(a-c)</sup> Values in the same days followed by a different letter are significantly different ( $p < 0.001$ ). TNK; a commercial available traditional herbal oil Thongnoppakhun<sup>®</sup> was used as a positive control.

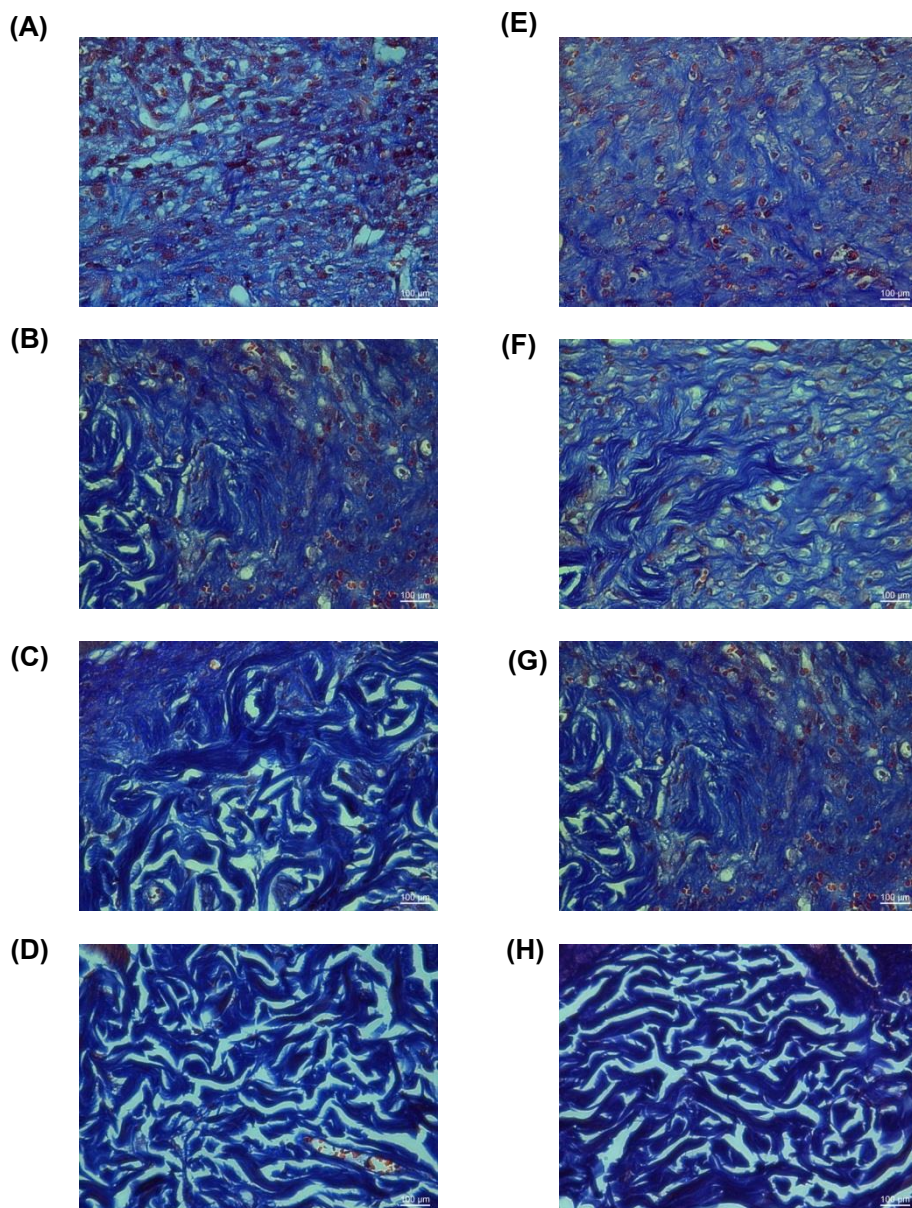
ตารางที่ 23 The levels of transforming growth factor beta-1 (TGF-beta1), vascular endothelial growth factor (VEGF), collagen type I, and collagen type III in type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats treated with ointment base for Ya-Samarn-Phlae tulle-gras dressings (YaSP).

Parameters	Treatment period (days)	Test groups (mean±SEM)		
		Vehicle	Solcoseryl ointment®	YaSP
TGF-beta1 (ng/L)	Intact 11	33.16±0.81 49.18±1.48 <sup>*a</sup>	114.06±3.54 <sup>*c</sup>	99.90±1.23 <sup>*b</sup>
VEGF (ng/L)	Intact 11	28.78±0.12 97.20±1.37 <sup>*a</sup>	188.71±5.10 <sup>*b</sup>	201.81±1.46 <sup>*b</sup>
Collagen I (ng/mL)	Intact 11	103.95±0.45 52.64±0.19 <sup>*a</sup>	100.47±0.93 <sup>*c</sup>	97.15±0.33 <sup>*b</sup>
Collagen III (ng/mL)	Intact 11	20.27±0.17 65.80±1.24 <sup>*c</sup>	22.05±0.15 <sup>a</sup>	24.99±0.41 <sup>*b</sup>

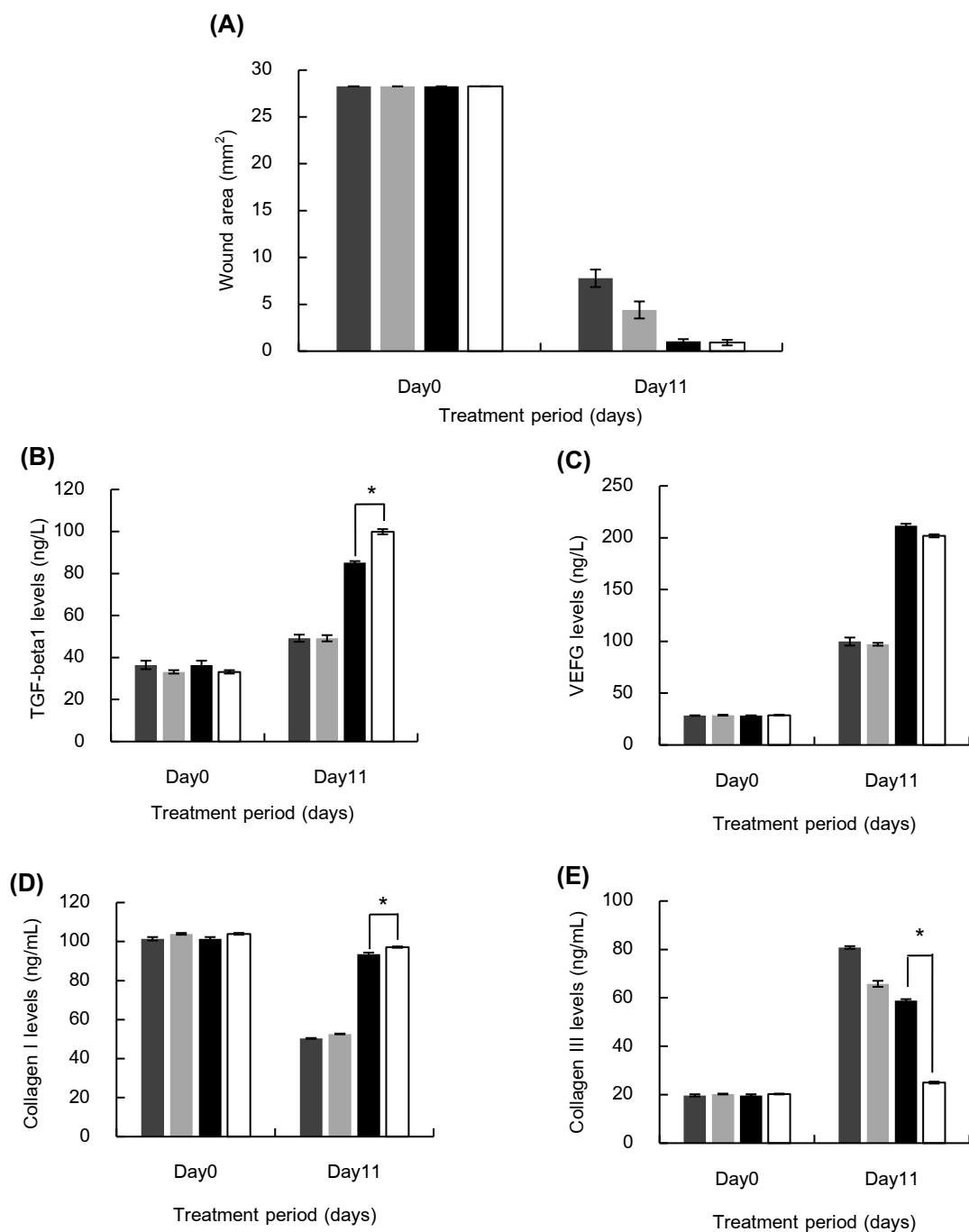
The results represent the mean±SEM of 5-6 animals per group. \*  $p < 0.001$  vs pre-treatment (day 0). <sup>(a-c)</sup> Values in the same day followed by a different letter are significantly different ( $p < 0.001$ ).



รูปที่ 29 H&E stained tissue sections from diabetic wound tissues treated with vehicle of T-YaSP (A), a commercial available traditional herbal oil Thongnoppakhun®; (a positive control; B), traditionally prepared-Ya-Samarn-Phlae (T-YaSP; C), vehicle of YaSP (E), Solcoseryl ointment® (reference drug; F), ointment base for Ya-Samarn-Phlae tulle-gras dressings (YaSP; G) and normal tissue (D and H) for 11 day. The T-YaSP and YaSP were treated diabetic rats showing amount of collagen (white arrow) and fibroblast (black arrow) and small number of inflammatory cell (white arrowhead). Magnification, 40X; scale bars, 100 µm.



รูปที่ 30 Masson's trichrome stained tissue sections from diabetic wound tissues treated with vehicle of T-YaSP (A), a commercial available traditional herbal oil Thongnoppakhun®; (a positive control; B), traditionally prepared-Ya-Samarn-Phlae (T-YaSP; C), vehicle of YaSP (E), Solcoseryl ointment® (reference drug; F), ointment base for Ya-Samarn-Phlae tulle-gras dressings (YaSP; G) and normal tissue (D and H) for 11 day. The T-YaSP and YaSP were treated rats showing amount of collagen (dark blue). Magnification, 40X; scale bars, 100 µm.



**รูปที่ 31** The comparison of wound healing activity, including wound area (A), growth factors (B and C) and collagen content (D and E) of diabetic wounds treated with T-YaSP (black bars) and YaSP (white bars) in excision wound model. Vehicle of T-YaSP (dark gray bars) and vehicle of YaSP (light gray bars). \*Significantly difference between rats treated with T-YaSP and YaSP ( $p < 0.05$ ).

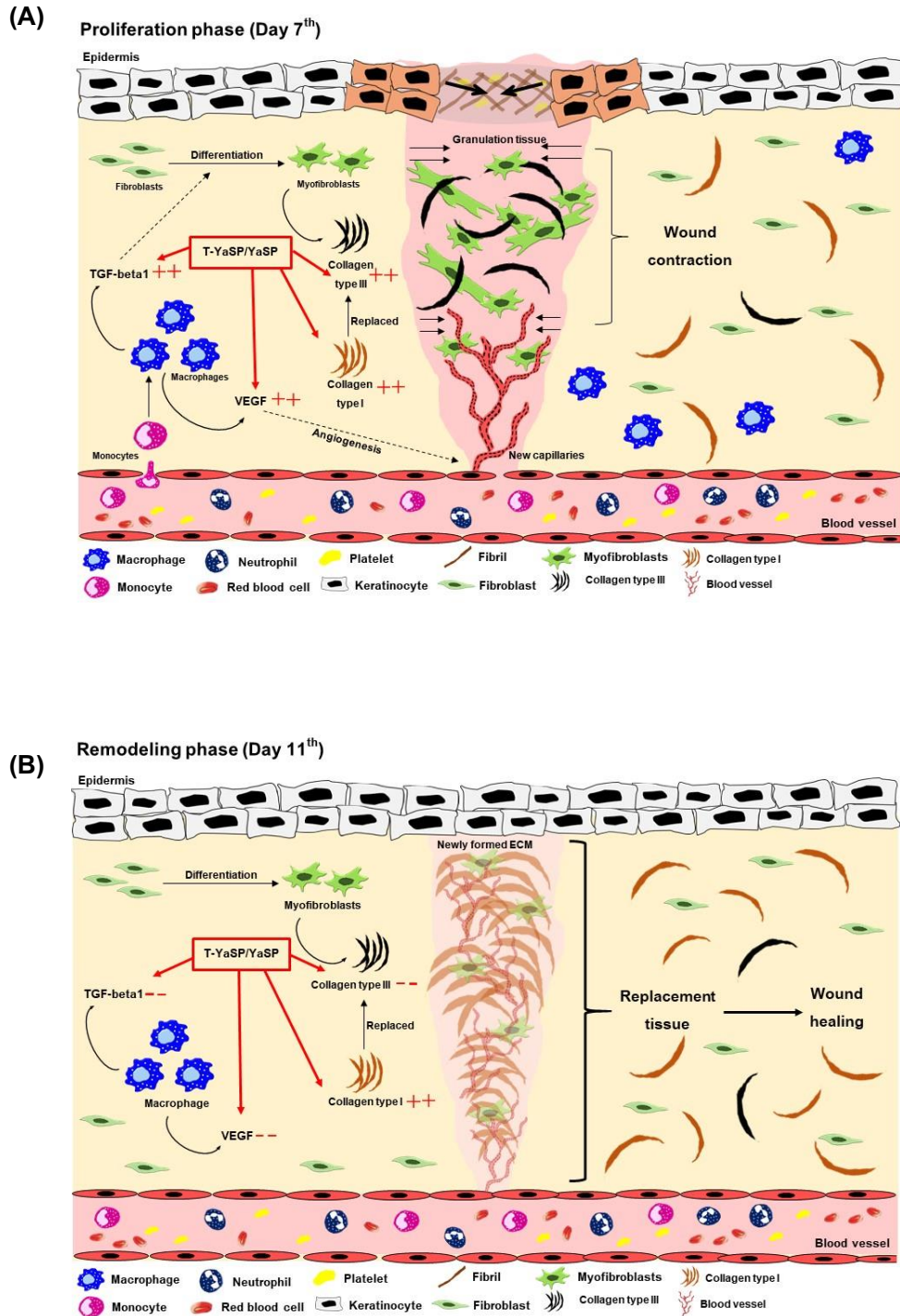


การศึกษาฤทธิ์ต่อการหายของแผลในหนูปกติ (non-diabetic wound; Wistar rats) โดยใช้วิธี excision wound model ซึ่งกระบวนการหายของแผล แบ่งออกเป็น 4 ระยะ ได้แก่ ระยะการแข็งตัวของเลือด (coagulation phase) ระยะการอักเสบ (inflammation phase) ระยะการแบ่งเซลล์ (proliferation phase) และระยะการปรับปรุงร่าง (remodeling phase) หลายปัจจัยที่มีความสำคัญต่อกระบวนการหายของแผล เช่น ปริมาณของปัจจัยการเจริญเติบโต หรือ growth factors ต่าง ๆ ที่สำคัญ ได้แก่ transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta1) ซึ่งเป็น growth factor ที่สำคัญในทุกๆระยะของกระบวนการหายของแผล โดยเฉพาะใน ระยะการแบ่งเซลล์ และระยะการปรับปรุงร่าง โดยมีหน้าที่ในการกระตุ้นการแบ่งเซลล์และเพิ่มจำนวนของ fibroblasts อีกทั้งยังมีผลต่อการกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ fibroblasts ไปเป็น myofibroblasts ทำให้เกิดการหดตัวของแผล myofibroblasts มีผลต่อการกระตุ้นการสร้าง collagen ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักที่สำคัญของ extracellular matrix ในเนื้อเยื่อแผล โดยในระยะแรกจะมีการสร้าง collagen type III และจะถูกแทนที่ด้วย collagen type I ซึ่งมีความแข็งแรงมากกว่า ทำหน้าที่สร้างความแข็งแรงให้กับเนื้อเยื่อใหม่บริเวณแผล นอกจากนี้ TGF-beta1 ยังมีผลต่อการกระตุ้นการแบ่งเซลล์ของ keratinocytes ให้เพิ่มจำนวนและเคลื่อนที่จากบริเวณขอบแผลเข้าสู่กึ่งกลางแผล ทำให้เกิดการปิดของแผล growth factor ที่สำคัญต่อกระบวนการหายของแผลอีกชนิดหนึ่ง คือ vascular endothelial growth factor (VEGF) ซึ่งทำหน้าที่ในการกระตุ้นการสร้างหลอดเลือดใหม่บริเวณแผล การสร้างหลอดเลือดใหม่เป็นสิ่งที่สำคัญอย่างหนึ่งในการเจริญเติบโตของเซลล์ ซึ่งอาศัยสารอาหารและออกซิเจนผ่านทางหลอดเลือดเพื่อหล่อเลี้ยงเนื้อเยื่อที่สร้างใหม่บริเวณแผล

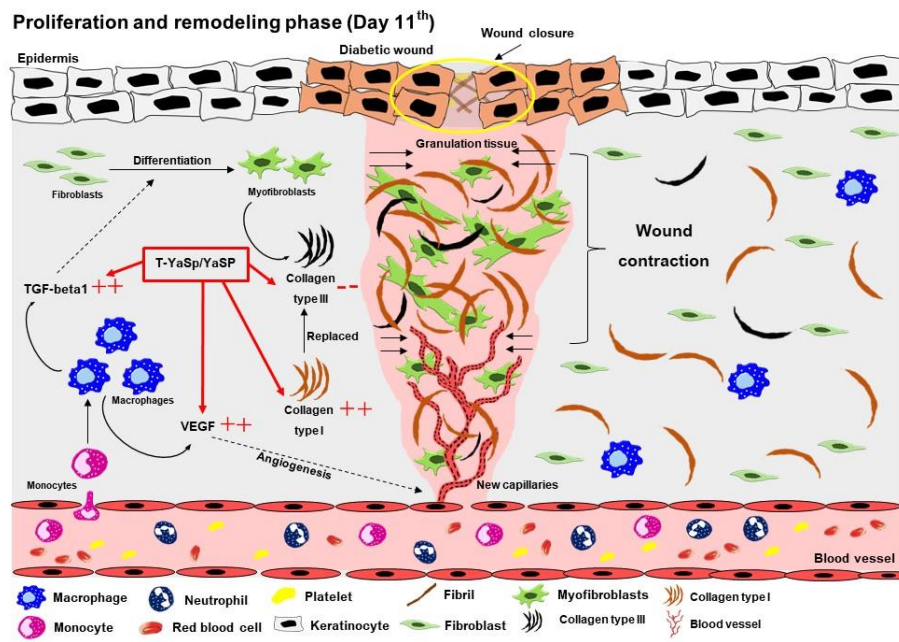
จากการศึกษาในครั้งนี้ พบว่า ในวันที่ 7 หลังการรักษา ยาสมานแผลมีผลต่อการเพิ่มปริมาณของ TGF-beta1, VEGF, collagen type III และ collagen type I อย่างมีนัยสำคัญในเนื้อเยื่อแผล ซึ่งอยู่ในระยะ proliferation phase ดังแสดงในรูปที่ 32A ต่อมาในระยะการปรับปรุงร่าง หรือ remodeling phase เป็นระยะที่มีการเปลี่ยนแปลงของ collagen โดย collagen type III จะถูกแทนที่ด้วย collagen type I ซึ่งมีความแข็งแรงมากกว่า เพื่อเพิ่มความแข็งแรงให้กับเนื้อเยื่อใหม่บริเวณแผล ในระยะนี้เซลล์ macrophages จะลดจำนวนลง ส่งผลให้มีการสร้าง TGF-beta1 และ VEGF ลดลงด้วย ซึ่งเป็นผลดีต่อกระบวนการหายของแผล โดยเป็นการควบคุมไม่ให้มีการสร้างเนื้อเยื่อใหม่ที่มากเกินไป และลดการเกิดแผลเป็นบริเวณแผลได้อีกด้วย จากการศึกษาในครั้งนี้ พบว่า ยาสมานแผลสามารถลดระดับของ TGF-beta1 และ VEGF ในเนื้อเยื่อแผลของวันที่ 11 หลังการรักษา อีกทั้งยังลดระดับของ collagen type III และเพิ่มระดับของ collagen type I ในเนื้อเยื่อแผลได้ ส่งผลให้เกิดการส่งเสริมกระบวนการหายของแผลที่ดี ดังแสดงในรูปที่ 32B

การศึกษาฤทธิ์ต่อการหายของแผลในหนูเบาหวาน (diabetic wound; GK rats) พบว่าในวันที่ 11 หลังการรักษา ยาสมานแผลมีผลต่อการเพิ่มปริมาณของ TGF-beta1, VEGF และ collagen type I อย่างมีนัยสำคัญ อีกทั้งยังมีผลต่อการลดปริมาณของ collagen type III ในเนื้อเยื่อแผลได้อย่างมีนัยสำคัญ ในช่วงระหว่างระยะ proliferation และ remodeling phase ของกระบวนการหายของแผล ดังแสดงในรูปที่ 33

Graphical conclusion



រូបភាពទី 32 Mechanism of Ya-Samarn-Phlae on wound healing process (proliferation phase (A) and remodeling phase (B)) in non-diabetic wound.



รูปที่ 33 Mechanism of Ya-Samarn-Phlae on wound healing process (proliferation and remodeling phase) in diabetic wound.

## บทที่ 4

### วิจารณ์

ตำรับยาสมานแผล (Ya-Samarn-Phlae; YaSP) เป็นตำรับยาของ หมอสมพร ชาญวณิชย์สกุล ซึ่งเป็นแพทย์แผนไทย ประจำโรงพยาบาลการแพทย์แผนไทย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ ประกอบด้วยสมุนไพร 4 ชนิด คือ เหง้าขมิ้นชัน (*Curcuma longa* L.) เปลือกมังคุด (*Garcinia mangostana* L.) เมล็ดหมากสง (*Areca catechu* L.) และเมล็ดข้าวสาร (*Oryza sativa* L.) วิธีการใช้ในแบบดั้งเดิมอยู่ในรูปแบบ ยาน้ำมันซึ่งสกัดด้วยน้ำมันมะพร้าว มีสรรพคุณในการรักษาแผลทั้งแบบเฉียบพลัน และแผลเรื้อรัง มีหลายรายงานการวิจัยก่อนหน้านี้ ได้ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของยาสมานแผล โดยมีรายงานว่า สารสกัดด้วยเอทานอลจากตำรับยาสมานแผลมีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างและการทำลายไบโอฟิล์มที่สร้างจากเชื้อ *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 และ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคที่ทำให้เกิดการบาดเจ็บของเนื้อเยื่อ และเป็นสาเหตุของการเกิดแผลบริเวณเท้าของผู้ป่วยเบาหวานได้อย่างมีนัยสำคัญ (Chusri et al., 2012; Chusri et al., 2013a) นอกจากนี้มีรายงาน พบว่าสารสกัดด้วยเอทานอลจากตำรับยาสมานแผลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ hydroxyl radical ได้ดี และมีฤทธิ์ต้านการอักเสบ โดยสามารถยับยั้งการสร้าง nitric oxide (NO) จากเซลล์ macrophages RAW 264.7 cells ซึ่งถูกชักนำด้วย lipopolysaccharide ได้ (Chusri et al., 2013b) และจากรายงานของ Chusri และคณะ (2014) ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดด้วยเอทานอลจากตำรับยาสมานแผล พบว่า มีค่า MIC ต่อเชื้อ methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) และ methicillin-susceptible *S. aureus* (MSSA) อยู่ในช่วง 3.90-7.80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้มีรายงานการศึกษาของ Chokpaisarn และคณะ (2019) ซึ่งศึกษาฤทธิ์ต้านไบโอฟิล์มที่สร้างจากเชื้อ *P. aeruginosa* ของน้ำมันสมานแผล พบว่ายาสมาแผลในรูปแบบน้ำมันสามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มได้ร้อยละ 50-90 การศึกษาเกี่ยวกับตำรับยาสมานแผลในช่วงก่อนหน้านี้มีเพียงการศึกษาในระดับหลอดทดลองเกี่ยวกับฤทธิ์ทางชีวภาพที่เกี่ยวข้องกับการรักษาแผล และยังไม่มีการศึกษาเกี่ยวกับการควบคุมคุณภาพของสมุนไพรที่นำมาใช้ในการศึกษา ซึ่งเป็นส่วนสำคัญต่อการพัฒนาตำรับยาไปสู่รูปแบบของผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ (ปิยพร พยัฆพรหม, 2558)

การศึกษาในครั้งนี้มีการนำสมุนไพร ประกอบในตำรับยาสมานแผลมาตรวจสอบคุณภาพก่อนการเข้าสู่กระบวนการเตรียมยาให้

อยู่ในรูปแบบของตำรับยา โดยตำรับยาสมานแผลที่นำมาใช้ในการศึกษาประกอบด้วย 3 รูปแบบที่แตกต่างกัน ได้แก่ ตำรับยาสมานแผลที่สกัดด้วยเอทานอล (E-YaSP) ยาสมานแผลในรูปแบบน้ำมัน (T-YaSP) ซึ่งเป็นรูปแบบดั้งเดิมของการใช้ และยาสมานแผลในรูปแบบยาเตรียมแผ่นปิดแผล (YaSP) ซึ่งเป็นรูปแบบใหม่ที่พัฒนามาจากน้ำมันสมานแผล เนื่องจากข้อจำกัดบางประการของการศึกษาในระดับหลอดทดลองซึ่งไม่สามารถใช้ยาสมานแผลในรูปแบบยาน้ำมัน และยาเตรียมแผ่นปิดแผลในการศึกษาได้ จึงมีความจำเป็นต้องใช้สารสกัดด้วยเอทานอลในการทดสอบเบื้องต้น

การควบคุมคุณภาพของสมุนไพรมีบทบาทสำคัญต่อการแพทย์แผนไทย โดยมีผลต่อประสิทธิภาพและความปลอดภัยต่อการใช้สมุนไพรนั้น ๆ องค์การอนามัยโลก (World Health Organization; WHO) ได้มีข้อกำหนดการควบคุมคุณภาพของสมุนไพร ซึ่งใช้เป็นมาตรฐานเดียวกันทั่วโลก คือ Quality Control methods for medicinal Plant (WHO, 1998) ซึ่งได้ระบุวิธีการและขั้นตอนการตรวจสอบ ทั้งการศึกษาเอกลักษณ์ทางเภสัชเวท การตรวจสอบวัตถุเจือปน การตรวจหาปริมาณความชื้น การตรวจหาปริมาณของสารสกัดด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ และการตรวจหาปริมาณสารสำคัญที่พบในสมุนไพร การศึกษาในครั้งนี้ได้อ้างอิงวิธีการตรวจสอบคุณภาพในด้านต่าง ๆ ของสมุนไพรจาก WHO

การศึกษาเอกลักษณ์ทางเภสัชเวทของสมุนไพร คือ การศึกษาลักษณะที่จำเพาะทางมหภาคและจุลภาคของสมุนไพรแต่ละชนิด ลักษณะทางมหภาคของสมุนไพร ได้แก่ ลักษณะภายนอก สี กลิ่น และรสของสมุนไพร จากผลการศึกษาในครั้งนี้ พบว่า ขมิ้นชัน และหมากสง มีลักษณะทางมหภาคที่สอดคล้องกับตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย หรือ Thai Herbal Pharmacopoeia (THP) ข้าวสาร มีลักษณะทางมหภาคที่สอดคล้องกับ Ayurvedic Pharmacopoeia of India ในส่วนของมังคุด ซึ่งไม่พบข้อกำหนดมาตรฐานในการควบคุมคุณภาพของสมุนไพรในปัจจุบัน แต่จากการศึกษาลักษณะทางมหภาค พบว่ามีความสอดคล้องกับบทความวิจัยของ Obolskiy และคณะ (2009) ซึ่งได้กล่าวถึง ลักษณะผลมังคุดที่มีรูปร่างกลม ผิดเรียบ มีกลีบเลี้ยงซึ่งติดกับบริเวณผลประมาณ 4-8 กลีบ และขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 3.40-7.50 เซนติเมตร เปลือกหนา 0.60-1.00 เซนติเมตร มีสีม่วงอมแดงถึงม่วงเข้ม

การศึกษาลักษณะทางจุลภาคของสมุนไพร คือ การศึกษาลักษณะของเซลล์และเนื้อเยื่อที่พบในผงยาสมุนไพรภายใต้กล้องจุลทรรศน์ซึ่งบ่งบอกถึงความจำเพาะของสมุนไพรแต่ละชนิด การศึกษาในครั้งนี้ได้นำผงสมุนไพรองค์ประกอบของตำรับยาสมานแผลทั้ง 4 ชนิด มาศึกษาลักษณะทางจุลภาคภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ขมิ้นชันใช้ส่วนเหง้า หรือ rhizome ซึ่งหมายถึง ลำต้นใต้ดิน ทำหน้าที่สะสมอาหาร เช่น คาร์โบไฮเดรต และโปรตีน เพื่อใช้ในการเจริญเติบโต จากการตรวจสอบผงยาจากเหง้าขมิ้นชันภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่ามี starch granules หรือ

เม็ดแป้ง เป็นจำนวนมาก มีลักษณะรูปร่างเป็นแกรนูลรูปวงรีหรือรูปไข่ และสังเกตเห็นลายตามขวางบาง ๆ ซึ่งจัดเป็นลักษณะจำเพาะของผงแป้งในเหง้าขมิ้นชัน นอกจากนี้ตรวจพบเซลล์พาเรงคิมา (parenchyma) ซึ่งเป็นเนื้อเยื่อถาวรเชิงเดี่ยวที่ยังมีชีวิตอยู่ พบได้ทั่วไปในส่วนของลำต้นและรากของพืชชนิดต่าง ๆ ซึ่งมีรูปร่างที่แตกต่างกัน เหง้าขมิ้นชัน พบลักษณะของเซลล์พาเรงคิมาที่มีผนังเซลล์บาง รูปร่างเป็นทรงกระบอกเหลี่ยมถึงค่อนข้างกลม ทำหน้าที่สะสมสารอาหารจำพวกแป้ง ไขมัน หรือโปรตีน และทำหน้าที่สร้างน้ำมันหอมระเหย ภายในเซลล์พบสารสีเหลือง หรือ oil drop ซึ่งมีลักษณะเป็นหยดน้ำมันสีเหลือง เซลล์อีกชนิดหนึ่งที่ตรวจพบในเหง้าขมิ้นชันซึ่งมีลักษณะคล้ายกับเซลล์พาเรงคิมา คือ เซลล์คอร์ก (cork) ซึ่งเป็นเซลล์ชั้นนอกสุดที่ไม่มีชีวิต แต่มีผนังเซลล์หนา และรูปร่างหลายเหลี่ยม ทำหน้าที่ป้องกันการระเหยของน้ำ และป้องกันอันตรายให้กับพืชจากสิ่งแวดล้อมภายนอก เซลล์ท่อลำเลียง หรือ vessel เป็นเซลล์ที่พบในเนื้อเยื่อไซเลม (xylem) ทำหน้าที่ขนส่งสารอาหาร และแร่ธาตุจากส่วนรากไปยังส่วนต่าง ๆ ของลำต้น ผงยาจากเหง้าขมิ้นชัน ตรวจพบเซลล์ท่อลำเลียงซึ่งมีลักษณะเป็นท่อยาวเรียงต่อกันจำนวน 3 รูปแบบ ได้แก่ spiral vessel, scalariform vessel และ bordered pit vessel ลำต้นใต้ดินหรือเหง้าเป็นส่วนของพืชที่จำเป็นต้องมีความแข็งแรงเพื่อพยุงลำต้นส่วนเหนือดินให้ตั้งตรง ซึ่งเซลล์ที่มีบทบาทสำคัญและทำหน้าที่ให้ความแข็งแรงกับลำต้นพืช คือ เซลล์เส้นใย หรือ fiber จากการตรวจสอบผงยาจากเหง้าขมิ้นชัน พบว่ามีเซลล์เส้นใยเป็นองค์ประกอบ นอกจากนี้ยังตรวจพบเซลล์เอพิเดอร์มิส (epidermis) ซึ่งเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ขน หรือ trichome มีลักษณะเป็นแบบเซลล์เดี่ยวและมีปลายแหลม ทำหน้าที่เพิ่มพื้นที่ผิวในการดูดซึมสารอาหารและแร่ธาตุต่าง ๆ จากดิน และป้องกันความร้อนจากภายนอกให้กับพืช จากการศึกษาลักษณะทางจุลภาคของผงขมิ้นชัน พบว่า เซลล์ต่าง ๆ ที่ตรวจพบสอดคล้องกับตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย เล่มที่ 1 ซึ่งระบุลักษณะทางจุลภาคของขมิ้นชัน ประกอบด้วย starch granules, parenchyma cell, spiral vessel, scalariform vessel, bordered pit vessel, cork cell, trichome, fiber และ oil drop เช่นเดียวกับการศึกษาของ Amel Bouzabata (2015) และ Abraham และคณะ (2018) ซึ่งได้รายงานลักษณะทางจุลภาคของเหง้าขมิ้นชันที่ประกอบด้วย gelatinized starch, covering trichome, starch granules, vessels, cork และ fibers หนึ่งเป็นหนึ่งในส่วนประกอบของตำรับยาสมานแผล ซึ่งใช้ส่วนของเมล็ดเป็นส่วนประกอบในตำรับยาเมล็ด คือ ส่วนของออวูล (ovule) ที่ผ่านการปฏิสนธิ เจริญเติบโตและเปลี่ยนแปลงมาเป็นเมล็ด จากการศึกษาในครั้งนี้ พบว่าลักษณะทางจุลภาคของผงยาจากเมล็ดหมาก ประกอบด้วย เทสตา (testa) ซึ่งเป็นเปลือกหุ้มเมล็ดชั้นนอกที่เปลี่ยนแปลงมาจากผนังชั้นนอกของออวูล ทำหน้าที่ป้องกันการระเหยของน้ำ และป้องกันอันตรายให้กับเอ็มบริโอ (embryo) นอกจากนี้ ยังตรวจพบเอนโดสเปิร์ม (endosperm) จำนวนมาก ซึ่งเป็นเนื้อเยื่อในเมล็ด ทำหน้าที่สะสมอาหารเพื่อการ

เจริญเติบโตของเอมบริโอในการงอกของเมล็ด ซึ่งเป็นส่วนสำคัญในการขยายพันธุ์ของพืช เอนโดสเปิร์มมักจะมีโปรตีนแทรกอยู่ในรูปของผลอะลิวโรน (aleurone grains) ซึ่งจากการศึกษาในครั้งนี้ตรวจพบผลอะลิวโรนในผงยาของเมล็ดหมากเช่นเดียวกัน นอกจากนี้ยังตรวจพบเซลล์ท่อลำเลียง 2 รูปแบบ คือ bordered pitted vessel และ pitted tracheidal vessel เซลล์สโตน (stone cell) หรือสเกลอริต (sclereid) เป็นเนื้อเยื่อถาวรเชิงเดี่ยวในกลุ่มของสเกลอเลงคิมา (sclerenchyma) ซึ่งเป็นเซลล์ที่ตายแล้ว มีรูปร่างหลายแบบ พบได้บ่อยในส่วนของพืช โดยเฉพาะเปลือกหุ้มเมล็ดและเนื้อในเมล็ดที่มีความแข็ง เปลือกหุ้มเมล็ดและเนื้อในเมล็ดหมากที่มีลักษณะแข็ง จึงสามารถตรวจพบเซลล์สโตน และสเกลอริต ลักษณะรูปร่างสั้น ภายในมีลักษณะเป็นรอยแยกและมีรูตรงกลาง ทำหน้าที่สร้างความแข็งแรงให้กับพืช นอกจากนี้ยังพบสเกลอเลงคิมาอีกชนิดหนึ่งในผงยาจากเมล็ดหมากสูง คือเซลล์เส้นใย ซึ่งทำหน้าที่เช่นเดียวกับเซลล์สโตน นอกจากนี้เมล็ดหมากยังสามารถตรวจพบหยดน้ำมันแต่มีจำนวนน้อย และพบเซลล์ที่มีเม็ดสีเป็นสีน้ำตาลจำนวนมาก การศึกษาลักษณะทางจุลภาคของเมล็ดหมาก พบว่า เซลล์ต่าง ๆ ที่ตรวจพบสอดคล้องกับตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย เล่มที่ 2 ซึ่งระบุลักษณะทางจุลภาคของหมาก ประกอบด้วย endosperm cell, aleurone grains, cell containing brown pigment, testa rumination, stone cell, sclereid cell, fiber, bordered pitted vessel, pitted tracheidal vessel และ oil drop เมล็ดข้าวสารเป็นสมุนไพรอีกชนิดหนึ่งที่อยู่ในตำรับยาสมานแผล ซึ่งตรวจพบ endosperm cell, aleurone grains, bordered pitted vessel และ sclerenchyma แต่มีลักษณะเซลล์ที่พบเพิ่มเติม ได้แก่ เม็ดแป้ง เซลล์เอพิเดอร์มิส และเซลล์ขน ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะทางจุลภาคของเมล็ดข้าวสารที่ระบุไว้ใน Ayurvedic Pharmacopoeia of India มังคุดซึ่งใช้ส่วนของเปลือกผลที่เป็นส่วนประกอบในตำรับยาสมานแผล จากการตรวจสอบลักษณะทางจุลภาคของผงยา พบว่า มี sclerenchyma, aleurone grains, epidermis, bordered pitted vessel, sclereid cell และ fiber เซลล์โดยส่วนใหญ่ที่ตรวจพบทำหน้าที่ให้ความแข็งแรง และป้องกันอันตรายจากสิ่งแวดล้อมภายนอกให้กับเนื้อในผล ซึ่งเป็นหน้าที่พื้นฐานของเปลือกผล

การควบคุมคุณภาพของสมุนไพร ในส่วนของการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสมุนไพรในตำรับยาสมานแผล พบว่า ปริมาณวัตถุเจือปน ปริมาณความชื้น ปริมาณเถ้ารวม และปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรดมีปริมาณอยู่ในเกณฑ์ที่เหมาะสม ในส่วนของปริมาณสารสกัดด้วยเอทานอลและน้ำ พบว่าสมุนไพรองค์ประกอบในตำรับยาสมานแผล มีลักษณะเป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐาน และสารสกัดด้วยเฮกเซนซึ่งตรวจสอบในเหง้าขมิ้นชันก็มีลักษณะเป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐานเช่นเดียวกัน จากการตรวจหาปริมาณแทนนินในเมล็ดหมาก พบว่า มีปริมาณแทนนินซึ่งเป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐาน และจากการตรวจหาปริมาณน้ำมันหอมระเหย และปริมาณ



เคอร์คูมินอยด์ในเหง้าขมิ้นชันก็พบว่ามีปริมาณเป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐาน ซึ่งจากการศึกษาเหล่านี้สามารถบ่งชี้ถึงสมุนไพรที่นำมาใช้ในตำรับยาสมานแผลมีคุณภาพที่ดีเป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนดไว้

นอกจากการศึกษาลักษณะทางเภสัชเวทดังที่ได้กล่าวมาแล้ว พบว่าการประเมินคุณสมบัติทางเคมีจัดเป็นส่วนสำคัญในการควบคุมคุณภาพของสมุนไพร การศึกษาในครั้งนี้มีการประเมินคุณสมบัติทางเคมีเชิงคุณภาพโดยใช้เครื่อง LC-MS ในสมุนไพรเดี่ยวของตำรับยาสมานแผลที่สกัดด้วยเอทานอล ยาสมานแผลในรูปแบบน้ำมัน และยาสมานแผลในรูปแบบยาเตรียมแผ่นปิดแผล พบว่า มีสารองค์ประกอบทางเคมี 2 ชนิด ที่ตรวจพบในยาสมานแผลทั้ง 3 รูปแบบ คือ alpha-mangostin และ curcumin ซึ่งสารทั้ง 2 ชนิดนี้สามารถตรวจพบได้ในเปลือกมังคุด และเหง้าขมิ้น โดยจัดเป็น biological markers ของตำรับยาสมานแผล การประเมินคุณสมบัติทางเคมีเชิงคุณภาพของสารสกัดด้วยเอทานอลจากตำรับยาสมานแผลในครั้งนี้ มีความจำเป็นเป็นอย่างมาก เนื่องจากการประเมินฤทธิ์ของยาสมานแผลต่อการต้านการอักเสบ และฤทธิ์ส่งเสริมกระบวนการหายของแผลในระดับเซลล์ ไม่สามารถใช้ตำรับยาสมานแผลในรูปแบบน้ำมันและยาเตรียมแผ่นปิดแผลในการทดสอบได้ เนื่องจากมีข้อจำกัดบางประการในการทดสอบ ได้แก่ ความสามารถในการละลายของน้ำมันและยาเตรียมแผ่นปิดแผล โดยตำรับยาสมานแผลทั้ง 2 รูปแบบนี้ สามารถละลายได้ใน acetonitrile ซึ่งเป็นตัวทำละลายที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ จึงไม่สามารถใช้ในการทดสอบได้ ผู้วิจัยจึงใช้สารสกัดด้วยเอทานอลจากตำรับยาสมานแผลในการทดสอบแทน โดยสามารถเทียบเคียงผลการทดสอบฤทธิ์ดังกล่าวได้โดยวิธีการตรวจวิเคราะห์สารสำคัญ กล่าวคือ สารสกัดด้วยเอทานอลจากตำรับยาสมานแผลมี alpha-mangostin และ curcumin เช่นเดียวกับ ยาสมานแผลในรูปแบบน้ำมันและยาเตรียมแผ่นปิดแผล

การศึกษาคุณสมบัติทางเคมีเชิงปริมาณโดยใช้เครื่อง HPLC พบว่า ตำรับยาสมานแผลในรูปแบบยาน้ำมันที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้มีปริมาณของ alpha-mangostin และ curcumin เท่ากับ  $2.472 \pm 0.002$  และ  $2.399 \pm 0.005$  มิลลิกรัมต่อกรัม ตามลำดับ ในส่วนของยาสมานแผลในรูปแบบยาเตรียมแผ่นปิดแผลมีปริมาณของ alpha-mangostin และ curcumin เท่ากับ  $0.415 \pm 0.000$  และ  $0.366 \pm 0.001$  มิลลิกรัมต่อกรัม ตามลำดับ

alpha-mangostin เป็นสารที่จัดอยู่ในกลุ่มของแซนโทน (xanthone) พบได้ทั่วไปในเปลือกของมังคุดและมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย ได้แก่ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Kokmas *et al.*, 2018; Herrera-Aco *et al.*, 2019) ฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง (Fukuda *et al.*, 2017; Phan *et al.*, 2018; Scolamiero *et al.*, 2018) ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย (Sodata *et al.*, 2017; Nittayananta *et al.*, 2018; Phunpee *et al.*, 2018) ฤทธิ์ต้านการอักเสบ (Chae *et al.*, 2012; Gutierrez-Orozco *et*

*al.*, 2013; Tarasuk *et al.*, 2017) รวมทั้งฤทธิ์ส่งเสริมกระบวนการหายของแผล (Wang *et al.*, 2012; Aukkanimart *et al.*, 2017) Navya และคณะ (2012) ได้ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบของ alpha-mangostin ในสัตว์ทดลองโดยใช้วิธี carrageenan induced paw edema ในหนูแรท พบว่า ที่เวลา 3 ชั่วโมงหลังการชักนำด้วย carrageenan สาร alpha-mangostin ขนาด 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สามารถยับยั้งการบวมของอุ้งเท้าได้ร้อยละ 40.21 นอกจากนี้พบว่ายังสามารถยับยั้ง iNOS และ PGE<sub>2</sub> ในการทดสอบแบบ *in silico* และมีรายงานของ Mohan และคณะ (2018) ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบของ alpha-mangostin ทั้งในระดับหลอดทดลอง และสัตว์ทดลอง ซึ่งพบว่าสาร alpha-mangostin ที่ความเข้มข้น 8 และ 14 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการสร้าง NO, iNOS, PGE<sub>2</sub>, TNF-alpha, IL-1beta และ COX-2 ได้อย่างมีนัยสำคัญในเซลล์ macrophage RAW 264.7 cells ที่ได้รับการชักนำให้เกิดการอักเสบด้วย LPS กลไกสำคัญต่อการควบคุมการสร้าง iNOS และ COX-2 ได้แก่ NF-kB pathway ซึ่งจากรายงานนี้ พบว่า alpha-mangostin ที่ความเข้มข้นเดียวกันสามารถยับยั้งการเคลื่อนที่ของ NF-kB เข้าสู่นิวเคลียสได้อย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบในสัตว์ทดลองโดยใช้วิธี carrageenan-induced peritonitis ในหนูเมิร์ค์ ซึ่งพบว่า alpha-mangostin ที่ความเข้มข้น 14 และ 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้ง neutrophils ได้ร้อยละ 72 และ 85 ตามลำดับ และที่ความเข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถลดระดับของ TNF-alpha และ IL-1beta ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

curcumin เป็นสารที่จัดอยู่ในกลุ่มเคอร์คูมินอยด์ (curcuminoid) พบได้ทั่วไปในพืชวงศ์ขิงรวมทั้งเหง้าขมิ้นชัน curcumin มีฤทธิ์ทางชีวภาพหลายชนิด ได้แก่ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Galano *et al.*, 2009; Naik *et al.*, 2011) ฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง (Einbond *et al.*, 2012; Hong *et al.*, 2015) ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา (Lal *et al.*, 2013; Sanabria-Rios *et al.*, 2015) ฤทธิ์ต้านการอักเสบ (Song *et al.*, 2011; Cooney *et al.*, 2016; Nakatake *et al.*, 2017) และฤทธิ์ส่งเสริมกระบวนการหายของแผล (Merrell *et al.*, 2009; Dhurai *et al.*, 2013; Mohammadi *et al.*, 2016; Mei *et al.*, 2017; Mutlu *et al.*, 2018; Nikpour *et al.*, 2019; Mohammadi *et al.*, 2019) curcumin มีบทบาทสำคัญต่อการส่งเสริมกระบวนการหายของแผลในทุกระยะ ได้แก่ ระยะการอักเสบ ระยะการแบ่งเซลล์ และระยะการปรับรูปร่าง (Akbik *et al.*, 2014) ในระยะการอักเสบ curcumin มีความสามารถในการยับยั้ง NF-kB signaling ส่งผลต่อการลดการแสดงออกของ pro-inflammatory cytokines ได้แก่ TNF-alpha และ IL-1beta (Wu and Wang, 2014; Barchitta *et al.*, 2019) นอกจากนี้ยังสามารถลดภาวะเครียดออกซิเดชัน โดยการเข้าทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระ หรือ ROS และมีความสามารถในการดับจับอนุมูลอิสระอื่น ๆ ได้ อีกทั้งยังสามารถยับยั้งการเกิดปฏิกิริยา lipid peroxidation ได้อีกด้วย (Mohanty *et al.*, 2012;

Mohanty and Sahoo, 2017) ในระยะการแบ่งเซลล์ curcumin มีความสามารถในการกระตุ้นการสร้างหลอดเลือดใหม่ โดยเพิ่มการแสดงออกของ VEGF (Kant *et al.*, 2015; Wang and Chen, 2019) เพิ่มการเคลื่อนที่ของเซลล์ fibroblasts ไปยังบริเวณแผล โดยการกระตุ้นผ่านกลไก Wnt signaling pathway (Dai *et al.*, 2017) นอกจากนี้ยังมีผลกระตุ้นการสร้างคอลลาเจนและการสร้างเนื้อเยื่อใหม่บริเวณแผล (Panchatcharam *et al.*, 2006) ในระยะสุดท้ายของกระบวนการหายของแผล curcumin มีความสามารถในการลดปริมาณของ MMPs ซึ่งมีผลต่อการเพิ่มการสังเคราะห์ ECM ในเนื้อเยื่อแผล อีกทั้งยังมีผลกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ fibroblasts ไปเป็นเซลล์ myofibroblasts ได้อีกด้วย ส่งผลให้เกิดการหดตัวของแผล (Barchitta *et al.*, 2019) จากรายงานการวิจัยก่อนหน้านี้ที่ได้กล่าวไว้ข้างต้น สามารถบ่งชี้ได้ว่าตำรับยาสมานแผลมีสารสำคัญของเปลือกมังคุดและเหง้าขมิ้นชันที่มีคุณสมบัติในการต้านการอักเสบและส่งเสริมกระบวนการหายของแผลได้ นอกจากการควบคุมคุณภาพของสมุนไพรประกอบและตำรับยาสมานแผลแล้ว อีกหนึ่งปัจจัยที่มีความสำคัญในการพัฒนาผลิตภัณฑ์จากสมุนไพร คือ การประเมินความคงตัวของตำรับยา หรือ stability ซึ่งหมายถึงความสามารถของตำรับยาที่ยังคงรักษาสภาพของคุณสมบัติเชิงเคมีหรือสารสำคัญต่าง ๆ และความสามารถของตำรับยาที่ยังคงรักษาสภาพของฤทธิ์ทางชีวภาพ รวมทั้งความคงสภาพทางด้านกายภาพต่าง ๆ ที่เป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนดตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา (Bansa *et al.*, 2016)

การศึกษาในครั้งนี้ใช้การประเมินความคงตัวในช่วงระยะเวลา 6 เดือน โดยแบ่งออกเป็น 3 ช่วงเวลา คือ 0, 3 และ 6 เดือน ซึ่งประกอบด้วย การศึกษาความคงตัวทางเคมี และการศึกษาความคงตัวของฤทธิ์ทางชีวภาพที่เกี่ยวข้องกับการหายของแผล ได้แก่ การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ NO และการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการเกิดปฏิกิริยา lipid peroxidation

จากการประเมินความคงตัวทางเคมีเชิงคุณภาพ พบว่า ตำรับยาสมานแผลทั้ง 2 รูปแบบเมื่อผ่านการเก็บรักษาเป็นเวลา 6 เดือน มีสารสำคัญบางชนิดที่ตรวจไม่พบเมื่อเปรียบเทียบกับตำรับยาสมานแผลก่อนการเก็บรักษา ซึ่งมีความเป็นไปได้ว่าอาจจะเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างไปเป็นสารชนิดอื่นหรือสารสำคัญชนิดนั้นได้เสื่อมสลายไปเมื่อเก็บไว้เป็นเวลานาน แต่อย่างไรก็ตาม ยังคงมีสารสำคัญ 2 ชนิดที่ตรวจพบเหมือนกันในตำรับยาสมานแผลทั้ง 2 รูปแบบ โดยสามารถตรวจพบในช่วงเริ่มต้น และยังคงตรวจพบเมื่อผ่านการเก็บรักษาเป็นเวลา 6 เดือน ได้แก่ curcumin และ alpha-mangostin และจากการประเมินความคงตัวทางเคมีเชิงปริมาณของยาสมานแผลทั้ง 2 รูปแบบ พบว่าปริมาณของ curcumin และ alpha-mangostin ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ ยังมีการศึกษาความคงตัวของฤทธิ์ทางชีวภาพที่เกี่ยวข้องกับการหายของแผล ได้แก่ การศึกษาฤทธิ์ยับยั้ง NO และการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการเกิดปฏิกิริยา lipid peroxidation โดยประเมินผลจากฤทธิ์ยับยั้งการสร้าง MDA ของตำรับยา

สมานแผลทั้ง 2 รูปแบบ โดยพบว่า เมื่อผ่านการเก็บรักษาเป็นเวลา 6 เดือน ยาสมานแผลทั้ง 2 รูปแบบ มีความสามารถในการยับยั้ง NO และ MDA ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับช่วงเริ่มต้นก่อนการเก็บรักษา ทั้งนี้อาจจะเป็นผลมาจากการลดลงของปริมาณสารสำคัญ curcumin และ alpha-mangostin แต่อย่างไรก็ตาม แม้ว่าตำรับยาสมานแผลทั้ง 2 รูปแบบมีความสามารถในการยับยั้ง NO และ MDA ลดลง แต่ยังคงมีความสามารถที่ดีกว่ากลุ่มควบคุม จึงมีการศึกษาฤทธิ์เพิ่มเติมในลำดับถัดไป การพัฒนาตำรับยาสมุนไพรร่วมเพื่อประยุกต์สำหรับการใช้จริงในผู้ป่วยนั้น จำเป็นต้องมีการศึกษาความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์ตำรับยานั้น ๆ โดยตำรับยาสมุนไพรร่วมที่ใช้สำหรับการทาภายนอกร่างกาย จำเป็นต้องมีการศึกษาการก่อความระคายเคืองต่อผิวหนังในสัตว์ทดลอง

การศึกษาในครั้งนี้มีการทดสอบการก่อความระคายเคืองของยาสมานแผลทั้งในรูปแบบยาน้ำมันและยาเตรียมแผ่นปิดแผล จากผลการประเมิน พบว่ายาสมานแผลทั้ง 2 รูปแบบ ไม่ก่อให้เกิดความระคายเคืองต่อผิวหนังของกระต่าย ซึ่งสามารถบ่งชี้ได้ว่ายาสมานแผลมีความปลอดภัยต่อการศึกษาในระดับสัตว์ทดลองและการศึกษาเชิงคลินิกได้ในอนาคต แต่อย่างไรก็ตาม การประยุกต์ใช้ตำรับสมุนไพรร่วมในการใช้จริงสำหรับผู้ป่วยจำเป็นต้องมีหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ในการยืนยันถึงความสามารถในออกฤทธิ์ต่อการรักษาโรคนั้น ๆ โดยจำเป็นต้องมีการศึกษาทั้งในระดับหลอดทดลอง และสัตว์ทดลองอย่างเพียงพอ การศึกษาในครั้งนี้ ได้นำตำรับยาสมานแผลทั้ง 2 รูปแบบ มาศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพที่เกี่ยวข้องกับการหายของแผลในระดับหลอดทดลองและระดับสัตว์ทดลอง ได้แก่ การศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบ และการศึกษาฤทธิ์ส่งเสริมการหายของแผล

การศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบของยาสมานแผลในหลอดทดลอง ได้แก่ การทดสอบฤทธิ์การเข้าจับโดยตรงกับอนุมูลอิสระ NO ซึ่งมีความสำคัญต่อกระบวนการหายของแผล NO คืออนุมูลอิสระขนาดเล็กที่มีอายุสั้น โดยเกิดจากการย่อยกรดอะมิโน L-arginine ไปเป็น L-citrulline ด้วยเอนไซม์ nitric oxide synthase (NOS) ซึ่งแบ่งออกเป็น 3 ชนิดได้แก่ endothelial nitric oxide synthase (eNOS), neuronal nitric oxide synthase (nNOS) และ inducible nitric oxide synthase (iNOS) (Rizk *et al.*, 2004; Florentino *et al.*, 2017) ในกระบวนการหายของแผล NO มีบทบาทสำคัญในการกระตุ้นการขยายตัวของหลอดเลือดบริเวณแผล ทำให้เพิ่มการซึมผ่านของเซลล์เม็ดเลือดขาวไปยังบริเวณแผลเพื่อจับกินสิ่งแปลกปลอมต่างๆ ในระยะของการอักเสบ (Maria *et al.*, 2002; Luo and Chen, 2005) การจับกินสิ่งแปลกปลอมโดยเซลล์เม็ดเลือดขาวมีผลทำให้จำนวนของ NO เพิ่มขึ้นในบริเวณแผล ส่งผลให้ NO เข้าทำปฏิกิริยากับออกซิเจนได้เป็นอนุมูลอิสระที่มีความเป็นพิษสูง คือ peroxynitrite ( $\text{ONOO}^-$ ) ก่อให้เกิดความเสียหายต่อเซลล์และเนื้อเยื่อบริเวณแผลทำให้แผลหายช้า นอกจากกระตุ้นการขยายหลอดเลือดแล้ว NO

ยังมีผลต่อการกระตุ้นการสร้างหลอดเลือดใหม่บริเวณแผล และเพิ่มการสะสมของคอลลาเจนได้อีกด้วย โดยบทบาทของ NO ที่มีต่อระยะการอักเสบซึ่งเป็นหนึ่งในกระบวนการหายของแผลมีทั้งการออกฤทธิ์ที่ส่งเสริมการอักเสบ และยับยั้งการอักเสบ (Janakiram *et al.*, 2012; Florentino *et al.*, 2017) มีรายงานการศึกษาก่อนหน้านี้ ได้ศึกษาการหายของแผลในหนูที่มีความบกพร่องของเอนไซม์ iNOS (iNOS-null (KO) mice) เปรียบเทียบกับหนูปกติในกลุ่ม wild type (WT) พบว่า ในวันที่ 3 และ 6 หลังการเกิดแผล หนูในกลุ่ม WT มีพื้นที่แผลลดลงน้อยกว่า 50% แต่หนูในกลุ่ม KO ยังคงมีพื้นที่แผลมากกว่า 50% นอกจากนี้ยังพบว่า มีการแทรกซึมของเซลล์ macrophages บริเวณแผลลดลง จำนวนของเซลล์ myofibroblast ลดลง และการแสดงออกของ TGF-beta ลดลงอย่างมีนัยสำคัญในหนูกลุ่ม KO ซึ่งสามารถบ่งชี้ได้อย่างชัดเจนว่าหนูที่มีความบกพร่องของเอนไซม์ iNOS ซึ่งอาจจะมีส่วนต่อการสร้าง NO ที่น้อยลงจะส่งผลให้แผลหายช้ากว่าหนูปกติ (Kitano *et al.*, 2017) แต่ในทางกลับกันหากบริเวณแผลมีปริมาณของ iNOS ที่มากเกินไป ส่งผลให้เกิดการสร้าง NO ออกมาเป็นจำนวนมากจะส่งผลเสียต่อกระบวนการหายของแผล มีรายงานการศึกษาก่อนหน้านี้ ได้ทำการศึกษาการหายของแผลในหนูที่ถูกชักนำให้มีการสร้าง NO เป็นจำนวนมาก โดยใช้โมเดล turpentine-induced granuloma ซึ่งเป็นโมเดลที่กระตุ้นให้เกิดการอักเสบ พบว่ามีการสะสมของคอลลาเจนบริเวณแผลลดลง 38.5% (Park *et al.*, 2013) ซึ่งบ่งชี้ได้ว่าการมีปริมาณของ NO ที่มากเกินไปจะส่งผลเสียต่อกระบวนการหายของแผล โดยลดการสร้างคอลลาเจน

การศึกษาฤทธิ์การเข้าจับโดยตรงกับอนุมูลอิสระ NO ของยาสมานแผลในครั้งนี้ พบว่า สารสกัดด้วยเอทานอลของยาสมานแผล ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าร้อยละในการเข้าจับโดยตรงกับอนุมูลอิสระ NO เท่ากับ 34.56 ยาสมานแผลในรูปแบบยาน้ำมันที่ความเข้มข้น 1% (v/v) มีค่าร้อยละ 52.88 และยาสมานแผลในรูปแบบยาเตรียมแผ่นปิดแผลที่ความเข้มข้น 1% (w/v) มีค่าร้อยละ 41.14

นอกจากนี้ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดด้วยเอทานอลจากยาสมานแผลและสมุนไพรประกอบทั้ง 4 ชนิดในเซลล์ macrophage RAW 264.7 ที่ได้รับการชักนำให้เกิดการอักเสบด้วย LPS โดยประเมินผลฤทธิ์ยับยั้งการสร้าง NO จากเซลล์ LPS หรือ lipopolysaccharide ซึ่งเป็นสารที่ได้รับความนิยมและมีประสิทธิภาพที่ดีสำหรับการใช้ในการกระตุ้นเซลล์ monocytes หรือ macrophages เพื่อให้เกิดการอักเสบ และสร้างสารสื่ออักเสบต่างๆ รวมทั้ง NO โดย LPS จะมีผลกระตุ้นการทำงานของ NF- $\kappa$ B signaling pathway ให้มีการหลั่ง pro-inflammatory cytokines ออกมาเป็นจำนวนมาก (Tucureanu *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2019) จากการศึกษาพบว่าสารสกัดด้วยเอทานอลของตำรับยาสมานแผล และสารสกัดด้วยเอทานอลของเหง้าขมิ้นชันสามารถยับยั้งการสร้าง NO ได้ดีที่สุด โดยที่ความเข้มข้น 15 และ 20

ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการสร้าง NO ได้ อย่างมีนัยสำคัญ โดยไม่มีผลลดปริมาณของเซลล์ ความสามารถของยาสมานแผลในการเข้าจับโดยตรงกับอนุมูล NO และฤทธิ์ยับยั้งการสร้าง NO จากเซลล์ macrophages นั้นอาจจะเป็นผลมาจากสมุนไพรวงศ์ประกอบในตำรับยา โดยมีรายงานก่อนหน้านี้ พบว่า สารสกัดด้วยเอทานอลจากเหง้าขมิ้นชันมีความสามารถในการเข้าจับกับอนุมูล NO ได้ โดยมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 12.40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่ curcumin ซึ่งเป็นสารสำคัญของเหง้าขมิ้นชันมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 10.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Rackova *et al.*, 2009) และจากรายงานการศึกษาของ Arya และคณะ (2015) พบว่า เหง้าขมิ้นชันที่สกัดด้วยเอทานอลมีความสามารถในการเข้าจับกับอนุมูล NO ได้ โดยมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 39.03 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้ยังมีรายงานเกี่ยวกับฤทธิ์การเข้าจับโดยตรงกับอนุมูล NO ของเปลือกมังคุด ซึ่งเป็นหนึ่งในสมุนไพรวงศ์ประกอบของตำรับยาสมานแผล จากการศึกษาของ Kosem และคณะ (2007) พบว่าสารสกัดด้วย เมทานอลของเปลือกมังคุดที่ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งอนุมูล NO ได้ร้อยละ 67.95 โดยมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 55.61 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งใกล้เคียงกับการศึกษาของ Samuagam และคณะ (2013) ที่รายงานว่า สารสกัดด้วยเอทานอลจากเปลือกมังคุดที่ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งอนุมูล NO ได้ร้อยละ 54.66 มีรายงานก่อนหน้านี้ได้ศึกษาสารสำคัญของเปลือกมังคุดเกี่ยวกับฤทธิ์ยับยั้งการสร้าง NO พบว่า alpha-mangostin ที่ความเข้มข้น 8 และ 14 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการสร้าง NO ในเซลล์ macrophage RAW 264.7 ที่ได้รับการชักนำให้เกิดการอักเสบด้วย LPS ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้พบว่ายังสามารถลดการแสดงออกของโปรตีน iNOS ได้อย่างมีนัยสำคัญ (Mohan *et al.*, 2018) จากการศึกษาของ Lee และคณะ (2014) ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดด้วยเอทานอลจากใบของหมากในเซลล์ macrophages RAW 264.7 ที่ได้รับการเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบด้วย LPS พบว่า สารสกัดที่ความเข้มข้น 1 และ 3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการสร้าง NO ได้ร้อยละ 45 และ 50 ตามลำดับ นอกจากนี้พบว่า ที่ความเข้มข้น 3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถลดการแสดงออกของ iNOS, COX-2 และ NF- $\kappa$ B อีกทั้งยังช่วยเพิ่มระดับของ I $\kappa$ B ในเซลล์ macrophages ได้อย่างมีนัยสำคัญ จากการศึกษาในระดับหลอดทดลอง พบว่ายาสมานแผลทั้ง 2 รูปแบบ มีความสามารถในการยับยั้ง NO ได้ดี จึงมีการศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบต่อในระดับสัตว์ทดลอง โดยเลือกใช้โมเดล carrageenan induced rat paw edema ซึ่งเป็นโมเดลที่นิยมใช้ในการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบของสารจากธรรมชาติ

carrageenan จัดเป็น phlogistic factor ที่มีคุณสมบัติในการเหนี่ยวนำให้เกิดการตอบสนองต่อการอักเสบที่หลากหลาย เช่น สามารถเหนี่ยวนำให้ neutrophils สร้างสารอนุมูลอิสระและสารสื่ออักเสบ เหนี่ยวนำให้เกิดการแทรกซึมของ neutrophils เหนี่ยวนำให้เกิดอาการ

บวมของอุ้งเท้า และเหนียวนำไปเพิ่มการซึมผ่านของหลอดเลือด (Bajpai *et al.*, 2018) โดยแบ่งการออกฤทธิ์ออกเป็น 2 ระยะ คือ ระยะแรก (0-1 ชั่วโมง) หลังการฉีด carrageenan เข้าบริเวณอุ้งเท้าของหนูทดลอง จะกระตุ้นให้เกิดการหลั่ง histamine, serotonin และ bradykinin ทันที และในระยะสุดท้าย (มากกว่า 1 ชั่วโมง) จะมีผลกระตุ้นการหลั่ง iNOS, COX-2, PGE<sub>2</sub>, TNF-alpha และ IL-1beta รวมทั้งชักนำให้เซลล์เม็ดเลือดขาวเคลื่อนที่ออกนอกหลอดเลือดและเข้าสู่บริเวณที่เกิดการอักเสบ (Sadeghi *et al.*, 2014)

จากการศึกษาในครั้งนี้ พบว่า ยาสมานแผลทั้ง 2 รูปแบบ สามารถยับยั้งการบวมของอุ้งเท้าหนูทดลองที่ได้รับการเหนียวนำไปเกิดการอักเสบด้วย carrageenan ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่เวลา 1, 2 และ 3 ชั่วโมงหลังการฉีด ซึ่งสามารถบ่งชี้ได้ว่า ยาสมานแผลน่าจะมีความสามารถในการยับยั้งการหลั่ง histamine, serotonin และ bradykinin ในระยะแรกของการอักเสบได้ รวมทั้งอาจจะมีผลยับยั้งการหลั่ง iNOS, COX-2, PGE<sub>2</sub>, TNF-alpha และ IL-1beta ในระยะสุดท้ายของการอักเสบที่เหนียวนำด้วย carrageenan เช่นกัน จึงทำให้ยาสมานแผลสามารถลดอาการบวมเนื่องจากการอักเสบได้ ซึ่งข้อสันนิษฐานเหล่านี้ สามารถยืนยันได้ด้วยผลการทดลองในครั้งนี้ กล่าวคือ หลังจากการเหนียวนำด้วย carrageenan เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ได้มีการนำเนื้อเยื่อที่เกิดการอักเสบบริเวณอุ้งเท้าของหนูทดลองมาตรวจวิเคราะห์หาปริมาณของ iNOS, COX-2, PGE<sub>2</sub>, TNF-alpha และ IL-1beta โดยใช้ ELISA kit ซึ่งพบว่า ยาสมานแผลทั้ง 2 รูปแบบสามารถลดปริมาณของ iNOS, COX-2, PGE<sub>2</sub>, TNF-alpha และ IL-1beta ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ยังมีการตรวจวิเคราะห์ปริมาณของ MDA, NO และ MPO ในเนื้อเยื่ออักเสบที่ได้รับการรักษาด้วยยาสมานแผลอีกด้วย ซึ่งพบว่า ยาสมานแผลทั้ง 2 รูปแบบ สามารถลดปริมาณของ MDA, NO และ MPO ได้อย่างมีนัยสำคัญ

iNOS และ COX-2 จัดอยู่ในกลุ่มของ pro-inflammatory enzymes ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการอักเสบ โดยทำหน้าที่ในการสร้างสารสื่ออักเสบ ได้แก่ NO และ PGE<sub>2</sub> ตามลำดับ การใช้ carrageenan เหนียวนำไปเกิดการอักเสบนั้นจะส่งผลให้มีระดับของ COX-2 สูงที่สุดในช่วงเวลา 1 ชั่วโมงแรกหลังการฉีด carrageenan ซึ่งสร้างมาจากเซลล์เม็ดเลือดขาว neutrophils และ macrophages ในส่วนของ iNOS จะแสดงออกมากที่สุดในช่วงเวลา 3 ชั่วโมงหลังการฉีด carrageenan (Rafiee *et al.*, 2019) ยาสมานแผลทั้ง 2 รูปแบบ สามารถยับยั้งเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดนี้ได้ ซึ่งส่งผลโดยตรงต่อการลดระดับของ NO และ PGE<sub>2</sub> ในเนื้อเยื่ออักเสบ NO นอกจากจะถูกสร้างมาจากการทำงานของ iNOS แล้ว ยังสามารถสร้างมาจากกระบวนการ phagocytosis ของเซลล์เม็ดเลือดขาวในบริเวณที่เกิดการอักเสบได้อีกด้วย (Tsujii *et al.*, 2012; Silva-Comar *et al.*, 2014) neutrophils คือเม็ดเลือดขาวชนิดแรกที่เคลื่อนที่เข้าสู่บริเวณที่เกิดการอักเสบ ทำหน้าที่จับกินสิ่งแปลกปลอมต่าง ๆ โดยวิธี phagocytosis การ

ตรวจวัดปริมาณของ neutrophils ที่นิยมใช้กันทั่วไป คือ การตรวจวัดปริมาณของ MPO ซึ่งเป็น เอนไซม์ที่หลั่งออกมาจาก azurophilic granule ของ neutrophil ในระหว่างที่เกิดการ phagocytosis (Schierwagen *et al.*, 1990; Lingaraju *et al.*, 2016) จากการศึกษาในครั้งนี้ ยา สมานแผลทั้ง 2 รูปแบบสามารถยับยั้งปริมาณของ MPO ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งบ่งชี้ได้ ว่า ยาสมานแผลมีผลต่อการลดจำนวน neutrophil ในเนื้อเยื่ออักเสบ กระบวนการ phagocytosis คือแหล่งที่มาของการปลดปล่อยอนุมูลอิสระออกมาเป็นจำนวนมากในเนื้อเยื่ออักเสบ ซึ่งอนุมูล อิสระมีบทบาทสำคัญที่ทำให้เกิดการอักเสบที่รุนแรง การสร้างอนุมูลอิสระ หรือ ROS ออกมา เป็นจำนวนมากจะก่อให้เกิดความไม่สมดุลระหว่างสารอนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ หรือ ที่เรียกกันว่า ภาวะเครียดออกซิเดชัน โดยเมื่อเกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน จะส่งผลเสียต่อ ร่างกายทำให้เซลล์ต่าง ๆ ที่อยู่เนื้อเยื่อ และ plasma membrane เกิดการบาดเจ็บ นำไปสู่การ เกิดปฏิกิริยา lipid peroxidation ได้เป็นผลิตภัณฑ์ชนิดหนึ่งที่มีชื่อว่า MDA การตรวจวิเคราะห์ ภาวะเครียดออกซิเดชัน สามารถทำได้โดยการตรวจวัดระดับของ MDA (Janero, 1990; Kuedo *et al.*, 2016) จากการศึกษาในครั้งนี้ พบว่า ยาสมานแผลทั้ง 2 รูปแบบ มีความสามารถในการ ลดปริมาณของ MDA ในเนื้อเยื่ออักเสบได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งบ่งชี้ได้ว่ายาสมานแผล น่าจะมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระได้ จึงไม่ทำให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน และยับยั้งปฏิกิริยา lipid peroxidation ได้ carrageenan ยังมีความสามารถในการเหนี่ยวนำให้ เกิดปฏิกิริยาทางเคมี phosphorylation ของ NF-kB (Basu *et al.*, 2017) NF-kB คือ transcription factor ที่มีความสำคัญในการควบคุมการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับสารสื่ออักเสบ ซึ่งมีผล ต่อการตอบสนองต่อการอักเสบ p65 และ p50 เป็นโปรตีนที่อยู่ในกลุ่มของ NF-kB พบใน ไซโตพลาสซึมของเซลล์โดยอยู่ในระยะพัก หรือ inactive โดยการควบคุมของ inhibitors kB (IkB) ที่อยู่ในรูป inactive NF-kB complex เมื่อฉีด carrageenan จะมีผลต่อการกระตุ้นโปรตีน IkB kinase (IKK) ทำให้เกิด phosphorylation และมีผลในการทำลาย IkB ทำให้เกิดการเปลี่ยน รูปจาก inactive NF-kB complex เป็น active NF-kB complex จากนั้น NF-kB จะเคลื่อนที่จาก ไซโตพลาสซึมเข้าสู่นิวเคลียสและกระตุ้นการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ โดยเฉพาะ TNF-alpha และ IL-1beta (Hussein *et al.*, 2013; Bajpai *et al.*, 2018) TNF-alpha และ IL-1beta เป็นสารสื่ออักเสบซึ่งทำหน้าที่กระตุ้นให้เกิดการอักเสบ การศึกษาในครั้งนี้ พบว่า ยาสมานแผลทั้ง 2 รูปแบบ มีความสามารถในการลดระดับของ TNF-alpha และ IL-1beta ได้อย่างมีนัยสำคัญในเนื้อเยื่อที่เกิดการอักเสบจากการเหนี่ยวนำด้วย carrageenan ซึ่งสามารถ บ่งชี้ได้ว่ายาสมานแผลมีคุณสมบัติในการต้านอักเสบได้โดยมีผลยับยั้งการสร้าง TNF-alpha และ IL-1beta โดยอาจจะเป็นผลมาจากการยับยั้งผ่านกลไกของ NF-kB pathway มีรายงาน การศึกษาก่อนหน้านี้ พบว่า curcumin สามารถยับยั้งการอักเสบในเซลล์ 3T3-L1



preadipocytes ได้ โดยการยับยั้ง NF-kB signaling และสามารถลดระดับของของ TNF-alpha และ IL-1beta ได้อย่างมีนัยสำคัญ (Gonzales and Orlando, 2008)

มีรายงานการวิจัยก่อนหน้านี้ ได้ทำการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบของสมุนไพรเดี่ยวที่เป็นองค์ประกอบในตำรับยาสมานแผล ขมิ้นชันซึ่งเป็นสมุนไพรองค์ประกอบของตำรับยาสมานแผล การศึกษาของ Chandrasekaran และคณะ (2013) พบว่า สารสกัดด้วยน้ำของเหง้าขมิ้นชัน สามารถยับยั้งการสร้าง PGE<sub>2</sub> และ IL-12 ในเซลล์ splenocytes ที่ได้รับการเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบด้วย LPS ได้ และมีรายงานการศึกษาก่อนหน้านี้ พบว่า ที่เวลา 4 และ 24 ชั่วโมงหลังการฉีด carrageenan สารสกัดด้วยเมทานอลจากเหง้าขมิ้นชันขนาด 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สามารถยับยั้งการบวมของอุ้งเท้าหนูทดลองที่ได้รับการเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบด้วย carrageenan ได้อย่างมีนัยสำคัญ (Arya *et al.*, 2015b) Pushpa และคณะ (2016) ได้ศึกษาผลของผงยาจากเหง้าขมิ้นชันต่อฤทธิ์ต้านการอักเสบ โดยใช้วิธี carrageenan-induced edema พบว่า ผงยาขนาด 300 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สามารถยับยั้งการบวมของอุ้งเท้าได้ร้อยละ 55 หลังการฉีด carrageenan ที่เวลา 4 ชั่วโมง ขมิ้นชันมีสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ต่อการต้านการอักเสบ Zhao และคณะ (2015) ได้ศึกษาฤทธิ์ของ curcumin, tetrahydrocurcumin, hexahydrocurcumin และ octahydrocurcumin ซึ่งเป็นสารสำคัญที่พบในเหง้าขมิ้นชัน ต่อฤทธิ์ต้านการอักเสบในเซลล์ macrophage RAW 264.7 ที่ได้รับการเหนี่ยวนำด้วย LPS พบว่า curcumin, tetrahydrocurcumin, hexahydrocurcumin และ octahydrocurcumin ที่ความเข้มข้น 3.125-25 ไมโครโมลาร์ สามารถยับยั้งการสร้าง NO ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้พบว่า curcumin ที่ความเข้มข้น 12.5-100 ไมโครโมลาร์ สามารถลดปริมาณของ TNF-alpha และ IL-6 ได้อย่างมีนัยสำคัญ tetrahydrocurcumin ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ สามารถลดปริมาณของ TNF-alpha ได้ และที่ความเข้มข้น 25-100 ไมโครโมลาร์ สามารถลดปริมาณของ IL-6 ได้อย่างมีนัยสำคัญ ในทางตรงกันข้ามไม่พบฤทธิ์ดังกล่าวใน hexahydrocurcumin และ octahydrocurcumin นอกจากนี้พบว่า curcumin, tetrahydrocurcumin, hexahydrocurcumin และ octahydrocurcumin ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ มีฤทธิ์ยับยั้ง iNOS และ COX-2 ได้อย่างมีนัยสำคัญ โดย curcumin มีฤทธิ์ดีที่สุด และที่ความเข้มข้นเดียวกันยังมีความสามารถในการยับยั้งการแสดงออกของ IkB-alpha และ NF-kB (p65) ได้อย่างมีนัยสำคัญ จากรายงานก่อนหน้านี้ ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบของ curcuminoid ซึ่งเป็นสารเคมีออร์แกนิกประกอบในเหง้าขมิ้นชัน โดยใช้วิธี carrageenan-induced edema ในหนูเม้าท์ พบว่า ที่เวลา 1 ชั่วโมงหลังการฉีด carrageenan สาร curcuminoid ขนาด 0.3, 1 และ 3 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สามารถยับยั้งการบวมของอุ้งเท้าได้ร้อยละ 20, 25 และ 36 ตามลำดับ หลังจากเวลาผ่านไป 5 ชั่วโมง curcuminoid ยังคงมีความสามารถยับยั้งการบวมของอุ้งเท้าได้ร้อยละ 69, 73

และ 86 ตามลำดับ อีกทั้งสาร curcuminoid ยังมีความสามารถในการยับยั้งการบวมของอุ้งเท้าหนูทดลองหลังจากได้รับการเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบด้วย histamine, serotonin และ bradykinin ได้อย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบแบบเรื้อรังโดยใช้วิธี cotton pellet-induced granuloma test พบว่า curcuminoid ขนาด 0.1, 0.3, 1 และ 3 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สามารถลดการสร้าง granuloma ได้อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งที่ขนาด 3 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมออกฤทธิ์ได้ดีที่สุด โดยสามารถลดการสร้าง granuloma ได้ร้อยละ 49 (Hisamuddin *et al.*, 2019) เปลือกมังคุดเป็นสมุนไพรอีกชนิดหนึ่งในตำรับยาสมาน Tewtrakul และคณะ (2009) ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดด้วยเอทานอลจากเปลือกมังคุดในเซลล์ macrophage RAW 264.7 ที่ได้รับการเหนี่ยวนำด้วย LPS พบว่าสารสกัดด้วยเอทานอล รวมทั้ง alpha-mangostin และ gamma-mangostin ซึ่งเป็นสารสำคัญที่พบในเปลือกมังคุด สามารถยับยั้งการสร้าง NO ได้โดยมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, 3.1 และ 6 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่า มีฤทธิ์ในการยับยั้ง  $PGE_2$  โดยมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, 13.9 และ 13.5 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ alpha-mangostin และ gamma-mangostin ยังมีฤทธิ์ในการยับยั้งการสร้าง TNF-alpha และ IL-1beta ได้โดยมีค่า  $IC_{50}$  อยู่ในช่วง 31.8-64.8 ไมโครโมลาร์ ในส่วนของ iNOS และ COX-2 สามารถยับยั้งได้โดยสารสกัดด้วยเอทานอลจากเปลือกมังคุด และ alpha-mangostin แต่ gamma-mangostin สามารถยับยั้งได้เพียง iNOS โดยไม่มีผลต่อ COX-2 และจากรายงานก่อนหน้านี พบว่า สารสกัดด้วยเอทานอลจากเปลือกมังคุดมีฤทธิ์ต้านการอักเสบในเซลล์ macrophage RAW 264.7 ที่ได้รับการเหนี่ยวนำด้วย LPS โดยสารสกัดที่ความเข้มข้น 5-20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการสร้าง COX-2 ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีร้อยละของการยับยั้งอยู่ในช่วง 27-54 และที่ความเข้มข้นเดียวกันยังสามารถยับยั้ง IL-1beta, IL-6 และ NO ได้เช่นกัน โดยมีร้อยละของการยับยั้งอยู่ในช่วง 10-54 ในส่วนของ alpha-mangostin และ gamma-mangostin ที่ความเข้มข้น 25-75 ไมโครโมลาร์ สามารถยับยั้งการสร้าง COX-2, IL-1beta, IL-6 และ NO ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Widowati *et al.*, 2016) จากการศึกษาของ Tatiya-aphiradee และคณะ (2019) ซึ่งทำการศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดด้วยเอทานอลจากเปลือกมังคุดในหนูทดลองที่ได้รับการเหนี่ยวนำให้เกิดแผลติดเชื้อบริเวณผิวหนัง โดยใช้โมเดล methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*-induced superficial skin infection พบว่า ในวันที่ 10 หลังการรักษาแผลด้วย 10% ของสารสกัดเปลือกมังคุด หนูทดลองมีแผลที่หายแบบสมบูรณ์ ซึ่งเร็วกว่ากลุ่มควบคุมเป็นเวลา 5 วัน อีกทั้งยังสามารถยับยั้งระดับของ TNF-alpha, IL-6 และ IL-1beta ในเนื้อเยื่อแผลได้อย่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมล็ดหมากเป็นสมุนไพรอีกหนึ่งชนิดซึ่งเป็นองค์ประกอบในตำรับยาสมานแผล จากรายงานของ Bhandare และคณะ (2010) ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัด

ด้วยเอทานอลจากเมล็ดหมาก โดยใช้วิธี carrageenan-induced edema พบว่าสารสกัดขนาด 250-1000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สามารถยับยั้งการบวมของอุ้งเท้าหนูทดลองได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ หลังจากการฉีด carrageenan เป็นเวลา 1, 3, 5 และ 24 ชั่วโมง จากรายงานของ Khan และคณะ (2011) ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดด้วยเมทานอล เฮกเซน เอทิลอะซีเตท และน้ำ จากเมล็ดหมาก โดยใช้วิธี carrageenan-induced edema ในหนูแรท (Sprague Dawley rat) และหนูไมค์ (BALB/c mice) พบว่า สารสกัดด้วยเมทานอล เฮกเซน เอทิลอะซีเตท และน้ำ สามารถยับยั้งการบวมของอุ้งเท้าในหนูไมค์ได้ร้อยละ 52, 16, 33 และ 52 ตามลำดับ โดยพบว่าสารสกัดด้วยน้ำมีความสามารถดีที่สุด จึงได้ศึกษาต่อในหนูแรทที่ได้รับการเหนี่ยวนำด้วย carrageenan, PGE<sub>2</sub>, arachidonic acid, histamine และ serotonin พบว่าที่เวลา 2, 3 และ 4 ชั่วโมงหลังการเหนี่ยวนำด้วย carrageenan, PGE<sub>2</sub> และ arachidonic acid สารสกัดด้วยน้ำขนาด 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สามารถยับยั้งการบวมของอุ้งเท้าได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ที่ขนาดของสารสกัดเดียวกัน ไม่สามารถยับยั้งการบวมของอุ้งเท้าจากการเหนี่ยวนำด้วย histamine และ serotonin ได้ ซึ่งบ่งชี้ได้ว่าสารสกัดจากเมล็ดหมากมีฤทธิ์ต้านการอักเสบที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งกระบวนการ COX inhibitory pathway แต่ไม่มีผลในการยับยั้ง histamine และ serotonin จากการศึกษารายงานของ Anthikat และ Michael (2012) ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดด้วยน้ำจากเมล็ดหมาก โดยใช้วิธี carrageenan-induced edema ในหนูไมค์ พบว่าสารสกัดขนาด 500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สามารถยับยั้งการบวมของอุ้งเท้าได้อย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ยังมีการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการเกิดปฏิกิริยา lipid peroxidation ในหลอดทดลอง ซึ่งพบว่า สารสกัดที่ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยา lipid peroxidation ได้ร้อยละ 61.46 การศึกษาของ Lee และคณะ (2014) ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดด้วยเอทานอลจากใบของหมาก โดยใช้วิธี carrageenan-induced edema ในหนูแรท พบว่า สารสกัดขนาด 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สามารถยับยั้งการบวมของอุ้งเท้าหนูได้ร้อยละ 22.6 หลังการฉีด carrageenan เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และสามารถยับยั้งการบวมของอุ้งเท้าหนูได้ร้อยละ 27.3 หลังการฉีด carrageenan เป็นเวลา 4 ชั่วโมง การศึกษาของ Sharafudheen และคณะ (2015) ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดด้วยน้ำจากเมล็ดหมาก โดยใช้วิธี carrageenan-induced edema ในหนูแรท พบว่า สารสกัดขนาด 200 และ 400 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สามารถยับยั้งการบวมของอุ้งเท้าได้เป็นเวลา 1 และ 2 ชั่วโมงหลังการฉีด carrageenan การศึกษาของ Sharafudheen และคณะ (2018) ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสำคัญ 2 ชนิดที่แยกได้จากเมล็ดหมาก คือ arecoline และ polyphenols โดยใช้วิธี carrageenan-induced edema ในหนูแรท พบว่า arecoline ขนาด 200 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม สามารถยับยั้งการบวมของอุ้งเท้าได้ที่เวลา 1, 2 และ 3 ชั่วโมงหลังการ

ฉีด carrageenan แต่ที่ขนาด 400 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม สามารถยับยั้งการบวมของอุ้งเท้าได้ที่เวลา 30 นาที, 1, 2 และ 3 ชั่วโมงหลังการฉีด carrageenan ในส่วนของ polyphenols ขนาด 200 และ 400 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม สามารถยับยั้งการบวมของอุ้งเท้าได้ที่เวลา 1, 2 และ 3 ชั่วโมงหลังการฉีด carrageenan ข่าวสารเป็นหนึ่งในสมุนไพรประกอบของตำรับยาสมานแผล ซึ่งมีรายงานการวิจัยเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านการอักเสบ Shalini และคณะ (2011) ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดด้วยเมทานอลจากเมล็ดข้าวสาร โดยใช้วิธี carrageenan-induced edema ในหนูแรท พบว่า สารสกัดขนาด 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สามารถยับยั้งการบวมของอุ้งเท้าได้อย่างมีนัยสำคัญที่เวลา 3 และ 5 ชั่วโมงหลังการฉีด carrageenan นอกจากนี้ยังมีการศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบในระดับหลอดทดลองซึ่งเกี่ยวกับฤทธิ์ยับยั้งการสร้างสารสื่ออักเสบต่าง ๆ ในเซลล์ human peripheral blood mononuclear cells ที่ได้รับการเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบด้วย LPS พบว่า สารสกัดที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการสร้าง COX, NOS, LOX และ MPO ได้อย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ยังมีความสามารถในการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยา lipid peroxidation โดยมีผลลดการสร้าง MDA และเพิ่มระดับของ SOD ในเซลล์ที่ได้รับการเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบ Limtrakul และคณะ (2016) ได้รายงานการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบของสารสกัดด้วยเอทานอลจากเมล็ดข้าวสารในเซลล์ macrophages RAW 264.7 ที่ได้รับการเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบด้วย LPS พบว่า สารสกัดที่ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการสร้าง IL-6, TNF-alpha และ NO ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ อีกทั้งยังลดการแสดงออกของ COX-2 และ iNOS ได้อย่างมีนัยสำคัญอีกด้วย นอกจากนี้ที่ความเข้มข้น 100 และ 150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการแสดงออกของ NF-kB ในนิวเคลียสได้ สารสกัดด้วยเอทานอลจากเมล็ดข้าวสาร ประกอบด้วย proanthocyanidin และ catechins ในปริมาณที่สูง แต่จากการศึกษานี้ พบว่ามีเพียง proanthocyanidin ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีคุณสมบัติในการลดการแสดงออกของ NF-kB ในนิวเคลียส ซึ่งบ่งชี้ได้ว่า proanthocyanidin น่าจะเป็นสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ยับยั้งกลไก NF-kB pathway ส่งผลให้สามารถต้านการอักเสบได้ เช่นเดียวกับรายงานการศึกษาของของ Hu และคณะ (2016) พบว่า สารสกัดด้วยเอทานอลจากข้าวสารที่ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการอักเสบในเซลล์ macrophages RAW 264.7 ที่ได้รับการเหนี่ยวนำด้วย LPS ได้ โดยมีความสามารถลดการแสดงออกของ NF-kB ได้ ส่งผลให้สามารถยับยั้งการทำงานของ iNOS และ COX-2 ซึ่งมีผลโดยตรงต่อการลดปริมาณของ NO และ PGE<sub>2</sub> ได้ ตามลำดับ

จากรายงานการศึกษาที่ได้กล่าวถึงข้างต้น จะเห็นได้ว่า สมุนไพรทั้ง 4 ชนิด ที่เป็นส่วนประกอบในตำรับยาสมานแผลมีคุณสมบัติในการยับยั้งการอักเสบทั้งในระดับหลอดทดลอง

และสัต์ว์ทดลอง โดยมีผลยับยั้งได้ทั้ง pro-inflammatory enzymes (COX-2 และ iNOS) และ pro-inflammatory cytokines (NO, PGE<sub>2</sub>, TNF-alpha และ IL-1beta) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบของยาสมานแผลในครั้งนี ยาสมานแผลมีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบที่ดีอาจจะเป็นผลมาจากการเสริมฤทธิ์กันของสมุนไพรทั้ง 4 ชนิด รวมทั้งสารสำคัญต่าง ๆ ที่เป็นองค์ประกอบในสมุนไพรนั้น ๆ

จากการวิเคราะห์เปรียบเทียบยาสมานแผลในรูปแบบยาน้ำมันและยาสมานแผลในรูปแบบยาเตรียมแผ่นปิดแผลต่อฤทธิ์ต้านการอักเสบ พบว่า ยาสมานแผลทั้ง 2 รูปแบบสามารถลดระดับของ MDA, NO, TNF-alpha, IL-1beta และ iNOS ได้ไม่แตกต่างกัน แต่ยาสมานแผลในรูปแบบยาเตรียมแผ่นปิดแผลมีความสามารถในการลดระดับของ ความบวมของอุ้งเท้า, MPO, PGE<sub>2</sub> และ COX-2 ได้ดีกว่ายาสมานแผลในรูปแบบยาน้ำมัน ซึ่งสามารถบ่งชี้ได้ว่า รูปแบบของผลิตภัณฑ์ที่แตกต่างกันมีผลต่อการออกฤทธิ์ของยา โดยในการศึกษาครั้งนี้ยาสมานแผลในรูปแบบยาเตรียมสามารถออกฤทธิ์ได้ดีกว่ายาสมานแผลในรูปแบบยาน้ำมัน

การอักเสบ เป็นกระบวนการที่ทำหน้าที่ในการป้องกันอันตรายต่าง ๆ ที่เข้าสู่ร่างกาย ซึ่งเป็นผลดีต่อการกำจัดสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อโรคต่าง ๆ แต่หากกระบวนการอักเสบเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องเป็นระยะเวลานานจะส่งผลเสียต่อร่างกาย โดยมีผลกระทบต่อการดำเนินโรคต่าง ๆ เช่น ในกระบวนการหายของแผล การอักเสบเป็นระยะที่มีความสำคัญต่อการกำจัดสิ่งแปลกปลอมบริเวณแผล และกระตุ้นให้มีการสร้างปัจจัยการเจริญเติบโตที่สำคัญในการแบ่งเซลล์ของการสร้างเนื้อเยื่อใหม่บริเวณแผล หากมีความบกพร่องของการอักเสบจะส่งผลโดยตรงให้กระบวนการหายของแผลเกิดช้าลง

การศึกษาฤทธิ์ของยาสมานแผลในการส่งเสริมกระบวนการหายของแผลในระดับหลอดทดลอง โดยประเมินจากฤทธิ์ของการกระตุ้นการเคลื่อนที่และการแบ่งเซลล์ของ human dermal fibroblast หรือ HDF พบว่า สารสกัดด้วยเอทานอลจากขมิ้นชัน ข่าขาว และตำรับยาสมานแผลมีฤทธิ์ดีที่สุด โดยที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถกระตุ้นให้เซลล์ HDF เคลื่อนที่ซิดติดกันที่เวลา 48 ชั่วโมง หลังการทดสอบ โดยไม่มีผลต่อความเป็นพิษของเซลล์ ในกระบวนการหายของแผล fibroblast เป็นเซลล์ที่มีบทบาทสำคัญ ทำหน้าที่สร้างและหลั่งปัจจัยการเจริญเติบโตหลายชนิด เช่น TGF-beta, VEGF และ FGF เป็นต้น เพื่อกระตุ้นการสร้างหลอดเลือดใหม่และการแบ่งเซลล์ต่าง ๆ บริเวณ และทำให้เกิดการหดตัวของแผล (Porter, 2007; Bainbridge, 2013; Jardins-Park *et al.*, 2018) การที่ยาสมานแผลและสมุนไพรองค์ประกอบในตำรับยา มีความสามารถกระตุ้นการเคลื่อนที่และการแบ่งเซลล์ของ fibroblast ได้ นั้น น่าจะส่งผลดีในการส่งเสริมกระบวนการหายของแผลได้

การศึกษาฤทธิ์ต่อการหายของแผลในสัตว์ทดลองของตำรับยาสมานแผลทั้ง 2 รูปแบบ ใช้โมเดลหนูทดลองจำนวน 2 สายพันธุ์ ได้แก่ 1) Wistar rats เพื่อประเมินการหายของแผลในสภาวะปกติ และ 2) GK rats ซึ่งเป็นหนูเบาหวานชนิดที่ 2 เพื่อประเมินการหายของแผลในสภาวะที่เป็นโรคเบาหวานหรือมีระดับน้ำตาลในเลือดสูง

จากการประเมินฤทธิ์ของยาสมานแผลต่อการหายของแผลในหนูปกติ พบว่า หลังจกการทำให้เกิดแผลหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับการรักษาด้วยยาสมานแผลในรูปแบบยาน้ำมัน มีขนาดพื้นที่แผลลดลงอย่างมีนัยสำคัญในวันที่ 5, 7, 9 และ 11 หลังการรักษา แต่กลุ่มที่ได้รับการรักษาด้วยยาสมานแผลในรูปแบบยาเตรียมแผ่นปิดแผล มีขนาดพื้นที่แผลลดลงอย่างมีนัยสำคัญในวันที่ 3, 5, 7, 9 และ 11 หลังการรักษา ซึ่งจะเห็นได้ว่ายาสมานแผลในรูปแบบยาเตรียมแผ่นปิดแผลออกฤทธิ์ได้เร็วกว่าโดยสามารถลดพื้นที่แผลลงได้ตั้งแต่วันที่ 3 หลังการรักษา ซึ่งอาจจะเป็นผลมาจากความแตกต่างของรูปแบบยา และความคงตัวของยาหลังจกการทาบริเวณแผลยาน้ำมัน ซึ่งมีลักษณะเป็นของเหลว เมื่อทาลงบนบริเวณแผลจะเกิดการแพร่กระจายไปทั่วแผลด้วยคุณสมบัติการแพร่กระจายของยาน้ำมันจะส่งผลเสียโดยมียาบางส่วนแพร่กระจายออกนอกบริเวณแผล จึงอาจจะทำให้ผลของยาสมานแผลในรูปแบบยาน้ำมันออกฤทธิ์ได้ช้ากว่า ในส่วนของยาสมานแผลในรูปแบบยาเตรียมแผ่นปิดแผล มีลักษณะคล้ายยาสีผึ้ง ซึ่งมีคุณสมบัติในการเคลือบติดบริเวณแผล สามารถคงสภาพของยาไว้ในตำแหน่งของแผลได้เป็นเวลานานจึงสามารถออกฤทธิ์ได้เร็วกว่ายาสมานแผลในรูปแบบยาน้ำมัน นอกจากนี้ จากผลการประเมินฤทธิ์ต้านการอักเสบในระดับสัตว์ทดลอง พบว่า ยาสมานแผลในรูปแบบยาเตรียมแผ่นปิดแผลสามารถออกฤทธิ์ได้ดีกว่ายาสมานแผลในรูปแบบยาน้ำมัน จึงเป็นเหตุผลหนึ่งที่สามารถอธิบายได้ว่า ในวันที่ 3 หลังจกการเกิดแผลนั้น กระบวนการหายของแผลอยู่ในระยะของการอักเสบ ซึ่งรูปแบบยาที่สามารถยับยั้งการอักเสบได้ดีกว่า จะมีผลต่อการหายของแผลที่เร็วกว่า

จากการตรวจวิเคราะห์ระดับของปัจจัยการเจริญเติบโต และระดับของคอลลาเจนในเนื้อเยื่อแผล หลังจกการรักษาด้วยยาสมานแผลทั้ง 2 รูปแบบ พบว่า ยาสมานแผลมีผลต่อการเพิ่มปริมาณของ TGF-beta1, VEGF, collagen type III และ collagen type I อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ในวันที่ 7 หลังจกการรักษา แต่ในวันที่ 11 หลังจกการรักษา พบว่า ยาสมานแผลทั้ง 2 รูปแบบมีผลต่อการลดระดับของ TGF-beta1, VEGF และ collagen type III แต่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณของ collagen type I ได้อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

การหายของแผล คือ กระบวนการที่เกิดจากการทำงานร่วมกันของเซลล์หลายชนิดเพื่อซ่อมแซมเนื้อเยื่อที่ได้รับบาดเจ็บ เช่น epidermal cells, endothelial cells, polymorphonuclear leukocytes, macrophages, fibroblasts และ keratinocytes (Bainbridge, 2013; Savari *et al.*,

2019) ซึ่งประกอบด้วย 4 ระยะ คือ ระยะการแข็งตัวของเลือด (coagulation phase) ระยะการอักเสบ (inflammation phase) ระยะการแบ่งเซลล์ (proliferation phase) และระยะการปรับรูปร่าง (remodeling phase) (Canedo-Dorantes and Canedo-Ayala, 2019; Karppinen *et al.*, 2019) ระยะการแบ่งเซลล์ ประกอบด้วย การสร้างหลอดเลือดใหม่ (angiogenesis) การสะสมของคอลลาเจน (collagen deposition) การสร้างเนื้อเยื่อแกรนูเลชัน (granulation tissue formation) และการหดตัวของแผล (wound contraction) (Singhal *et al.*, 2011; Shao *et al.*, 2019)

TGF-beta1 คือ ปัจจัยการเจริญเติบโตที่มีความสำคัญในทุกๆระยะของกระบวนการหายของแผล ซึ่งมีรายงานก่อนหน้านี้ระบุว่า การทำงานของ TGF-beta1 มีผลต่อกระบวนการหายของแผลทั้งผลดีและผลเสีย (Wang *et al.*, 2006) จากการศึกษาของ Crown และคณะ (2000) ได้ศึกษาผลต่อการหายของแผลในหนู TGF-beta1 knockout mice เปรียบเทียบกับหนูปกติ พบว่า หนูปกติมีการหายของแผลอย่างสมบูรณ์ในวันที่ 16 หลังการเกิดแผล แต่หนูที่มีความบกพร่องของ TGF-beta1 มีการหายของแผลที่ไม่สมบูรณ์หลังจากการเกิดแผลเป็นเวลา 20 วัน แสดงให้เห็นว่าความบกพร่องของ TGF-beta1 มีผลต่อการหายของแผลที่ช้าลง แต่ในทางตรงกันข้ามหากมีปริมาณของ TGF-beta1 เป็นจำนวนมากต่อเนื่องเป็นระยะเวลานานในช่วงท้ายของระยะการแบ่งเซลล์และระยะการปรับรูปร่างของกระบวนการหายของแผลนั้น จะส่งผลเสีย โดย TGF-beta1 มีผลต่อการกระตุ้นเซลล์ fibroblast ให้มีการสร้างเนื้อเยื่อพังผืด (tissue fibrosis) ที่มากเกินไปนำไปสู่การเกิดแผลเป็นแบบ hypertrophic scar มีรายงานก่อนหน้านี้ พบว่า ใน hypertrophic scar fibroblast cells มีปริมาณของ TGF-beta1 มากกว่าอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ปกติ (Wang *et al.*, 2000) hypertrophic scar นอกจากจะมีการแสดงออกของ TGF-beta1 ที่มากกว่าปกติแล้ว ยังพบว่าการแสดงออกของ TGF-beta receptors type I และ type II ที่นานกว่าเนื้อเยื่อปกติอีกด้วย โดยงานวิจัยระบุว่า แม้ว่าจะมีการแสดงออกของ TGF-beta receptors type I และ type II อย่างหนาแน่นในการหายของแผลที่เป็นปกติ แต่การแสดงออกเหล่านี้จะลดลงเมื่อเข้าสู่ระยะท้ายของการแบ่งเซลล์และระยะการปรับรูปร่าง ซึ่งการแสดงออกที่มากเกินไปของ TGF-beta1 และ TGF-beta receptors ในเซลล์ fibroblasts ของระยะท้ายในกระบวนการหายของแผลมีผลต่อการเกิดแผลเป็น (Schmid *et al.*, 1998; Penn *et al.*, 2012) จากการศึกษาของยาสมานแผลต่อการหายของแผล พบว่า ยาสมานแผลมีผลเพิ่มระดับของ TGF-beta1 ในวันที่ 7 หลังการรักษา และสามารถลดระดับของ TGF-beta1 ได้ในวันที่ 11 หลังการรักษา ซึ่งบ่งชี้ได้ว่ายาสมานแผลมีผลที่ดีในการทำให้แผลหายเร็วขึ้นและลดการเกิดแผลเป็นได้ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Gopal และคณะ (2014) ได้ศึกษาฤทธิ์ของ chitosan-based copper nanocomposite (CCNC) ต่อการหายของแผลในหนู

ทดลอง พบว่า มีความสามารถในการรักษาแผล โดยมีร้อยละการหดตัวของแผลมากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ในวันที่ 3, 7, 11 และ 14 หลังการรักษา และพบว่าในวันที่ 7 หลังการรักษา CCNC มีความสามารถในการเพิ่มระดับของ TGF-beta1 แต่ในวันที่ 14 หลังการรักษา CCNC มีผลลดระดับของ TGF-beta1 ในเนื้อเยื่อแผล ส่งผลให้เกิดการส่งเสริมกระบวนการหายของแผลที่ดี

การสร้างหลอดเลือดใหม่ หรือ angiogenesis ในกระบวนการหายของแผล เป็นปัจจัยที่มีความสำคัญซึ่งเกี่ยวข้องกับการขนส่งสารอาหารและออกซิเจนมาหล่อเลี้ยงเนื้อเยื่อที่สร้างใหม่ ซึ่งเป็นผลมาจากการทำงานของปัจจัยการเจริญเติบโตที่สำคัญ ได้แก่ VEGF (Ferrari *et al.*, 2009; Savari *et al.*, 2019) ในกระบวนการหายของแผล การแสดงออกของ VEGF พบมากที่สุดในวันที่ 3-7 ซึ่งอยู่ในระยะการแบ่งเซลล์และสร้างเนื้อเยื่อแกรนูเลชัน และลดลงในวันที่ 14 หลังการเกิดแผลซึ่งอยู่ในระยะการปรับรูปร่าง (Frank *et al.*, 1995; Bao *et al.*, 2009; Johnson *et al.*, 2014) แม้ว่า VEGF มีคุณสมบัติที่ดีในการกระตุ้นการสร้างหลอดเลือดใหม่ในกระบวนการหายของแผล แต่มีหลายรายงานการศึกษาที่ระบุว่าระดับของ VEGF ที่มากและคงอยู่เป็นระยะเวลานานจะส่งผลเสียต่อการสร้างแผลเป็นที่รุนแรง นำไปสู่การเกิดแผลเป็นที่ผิดปกติ (Gira *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2008; Wilgus *et al.*, 2008; Salem *et al.*, 2009) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาฤทธิ์ของยาสมานแผลต่อการหายของแผลในครั้งนี้ โดยพบว่า ยาสมานแผลมีผลต่อการเพิ่มระดับของ VEGF ในวันที่ 7 หลังการรักษา และสามารถลดระดับของ VEGF ลงในวันที่ 11 หลังการรักษา โดยเป็นการกระตุ้นการหายของแผลและลดปัจจัยเสี่ยงของการเกิดแผลเป็นที่รุนแรง และเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับการศึกษาของ Gopal และคณะ (2014) ซึ่งศึกษาฤทธิ์ของ CCNC ต่อการหายของแผลในหนูทดลอง พบว่า ในวันที่ 7 หลังการรักษา CCNC มีความสามารถในการเพิ่มระดับของ VEGF และในวันที่ 14 หลังการรักษา CCNC มีผลลดระดับของ VEGF ในเนื้อเยื่อแผลได้ ส่งผลให้แผลหายเร็ว

collagen เป็นองค์ประกอบหลักของการสร้าง ECM ในระยะการแบ่งเซลล์และระยะการปรับรูปร่างของกระบวนการหายของแผล ทำหน้าที่ให้ความแข็งแรงและความสมบูรณ์ของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่สร้างขึ้นใหม่ (Li *et al.*, 2017) collagen type I ทำหน้าที่ให้ความแข็งแรง และ collagen type III จะพบมากในระยะแรกของกระบวนการหายของแผล (Wang *et al.*, 2015) การเพิ่มขึ้นของ collagen type I เป็นตัวบ่งชี้ถึงเนื้อเยื่อที่สร้างใหม่บริเวณแผลมีความแข็งแรง การประเมินฤทธิ์ของยาสมานแผลทั้ง 2 รูปแบบต่อระดับของ collagen พบว่าในวันที่ 11 มีระดับของ collagen type I เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ และมีระดับของ collagen type III ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการศึกษาของ Volk และคณะ (2011) โดยพบว่า หนูทดลองที่มีความบกพร่องของ collagen type III (Col3 deficient (Col3+/-) mice) มีการปิด



ของแผลเร็วกว่าหนูปกติโดยเพิ่มอัตราการหดตัวของแผล นอกจากนี้ยังเพิ่มปริมาณของเซลล์ myofibroblast ในเนื้อเยื่อแผลรุ่นเลขนั้ได้อีกด้วย

จากการวิเคราะห์เปรียบเทียบยาสมานแผลในรูปแบบยาน้ำมันและยาสมานแผลในรูปแบบยาเตรียมแผ่นปิดแผลต่อฤทธิ์ส่งเสริมกระบวนการหายของแผลในหนูปกติ พบว่า ยาสมานแผลในรูปแบบยาน้ำมัน สามารถกระตุ้นการสร้าง TGF-beta1 และ VEGF ได้ดีกว่ายาสมานแผลในรูปแบบยาเตรียมแผ่นปิดแผล ซึ่งอาจจะเป็นผลมาจากการที่ยาสมานแผลในรูปแบบน้ำมันมีปริมาณของสาร curcumin ที่มากกว่ายาสมานแผลในรูปแบบยาเตรียม ซึ่งมีรายงานการวิจัยที่ระบุว่า curcumin มีความสามารถที่ดีในการกระตุ้นการแสดงออกของ TGF-beta1 (Mani *et al.*, 2002; Prasad *et al.*, 2017) และ VEGF (Kant *et al.*, 2015; You *et al.*, 2017) ในเนื้อเยื่อแผลได้ แต่ยาสมานแผลในรูปแบบยาเตรียมแผ่นปิดแผล สามารถกระตุ้นการสร้าง collagen ได้ดีกว่ายาสมานแผลในรูปแบบยาน้ำมัน ซึ่งอาจจะเป็นผลมาจากความแตกต่างของรูปแบบยา ซึ่งยาสมานแผลรูปแบบยาเตรียมแผ่นปิดแผลเมื่อทาลงบนแผลสามารถคงสภาพของยาในบริเวณแผลได้นานกว่า จึงทำให้ออกฤทธิ์กระตุ้นการสร้าง collagen ได้ดีกว่า

จากการประเมินฤทธิ์ของยาสมานแผลทั้ง 2 รูปแบบ ต่อการหายของแผลในหนูเบาหวาน GK rats พบว่า หนูเบาหวานที่ได้รับการรักษาแผลด้วยยาสมานแผลทั้ง 2 รูปแบบ มีการหดตัวของแผลมากกว่าอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ตั้งแต่วันที่ 3, 5, 7, 9 และ 11

โรคเบาหวาน คือสภาวะที่มีระดับน้ำตาลในเลือดสูงอย่างต่อเนื่องเป็นระยะเวลานาน ซึ่งส่งผลเสียต่อระบบต่าง ๆ ในร่างกาย รวมทั้งมีผลกระทบต่อกระบวนการหายของแผลในระยะการอักเสบ ก่อให้เกิดการอักเสบแบบ low grade inflammation โดยส่งผลให้เกิดการอักเสบต่อเนื่องเป็นเวลานาน ทำให้ไม่สามารถเปลี่ยนผ่านจากระยะการอักเสบ เข้าสู่ระยะการแบ่งเซลล์ได้ ก่อให้เกิดความบกพร่องของกระบวนการหายของแผล เกิดเป็นแผลเรื้อรัง (Tellechea *et al.*, 2010) มีรายงานการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า ภาวะที่มีระดับน้ำตาลในเลือดสูงจะทำให้การหายของแผลเกิดขึ้นช้ากว่าปกติ จากการศึกษาของ Slavkovsky และคณะ (2011) ได้ศึกษาการหายของแผลในหนูเบาหวานสายพันธุ์ Zucker diabetic fatty rats (ZDF) เปรียบเทียบกับหนูปกติ พบว่า หนู ZDF ทั้งเพศผู้และเพศเมีย มีขนาดพื้นที่ของแผลมากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับหนูปกติ ในวันที่ 2, 4, 6, 8 และ 10 หลังการเกิดแผล การศึกษาของ Wang และคณะ (2012) ได้ศึกษาการหายของแผลบริเวณเยื่อบุตา (corneal epithelial) ในหนูเบาหวานสายพันธุ์ GK rats เปรียบเทียบกับหนูปกติ พบว่า หลังการเกิดแผลเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หนู GK rats มีขนาดพื้นที่แผล เท่ากับ  $463,666 \pm 69,692$  pixels ซึ่งมากกว่าอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับหนูปกติ ( $329,500 \pm 69,681$  pixels) และที่เวลา 35 ชั่วโมง หลังการเกิดแผล หนู

GK rats มีขนาดพื้นที่แผล เท่ากับ  $278,417 \pm 64,948$  pixels ซึ่งมากกว่าอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับหนูปกติ ( $70,250 \pm 68,947$  pixels) การศึกษาของ Yu และคณะ (2017) ซึ่งได้ประเมินการหายของแผลบริเวณเท้าในหนูทดลองที่ได้รับการเหนี่ยวนำด้วย streptozotocin เป็นเวลา 5 วัน เพื่อให้เป็นโรคเบาหวานชนิดที่ 2 กับหนูทดลองปกติ พบว่า ในวันที่ 8 หลังการเกิดแผล หนูเบาหวานมีขนาดพื้นที่ของแผลเท่ากับ  $9.29 \pm 0.88$  ตารางมิลลิเมตร ซึ่งมากกว่าอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับหนูปกติ ( $7.91 \pm 1.80$  ตารางมิลลิเมตร) และจากการศึกษาทางจุลกายวิภาคของเนื้อเยื่อแผลในวันที่ 13 หลังการเกิดแผล พบว่า ในหนูเบาหวานยังตรวจพบเซลล์ neutrophils ซึ่งบ่งชี้ถึงภาวะการคงอยู่ของการอักเสบ และไม่พบการสร้างหลอดเลือดใหม่ในทางตรงกันข้ามเนื้อเยื่อแผลของหนูปกติไม่มีพบเซลล์อักเสบ มีการหายของแผลที่ค่อนข้างสมบูรณ์ และพบการสร้างหลอดเลือดใหม่บริเวณเนื้อเยื่อแผล จากรายงานของ Suckow และคณะ (2017) ได้ทำการศึกษาผลต่อการหายของแผลในหนู Zucker diabetic Sprague Dawley (ZDSD) rats ซึ่งเป็นหนูเบาหวานชนิดที่ 2 ที่มีภาวะอ้วนเปรียบเทียบกับการหายของแผลในหนูปกติ พบว่าในวันที่ 9, 11 และ 14 หลังการเกิดแผล หนูเบาหวาน ZDSD rats มีเส้นผ่านศูนย์กลางของแผลมากกว่าอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับหนูปกติ

นอกจากการประเมินการหดตัวและการปิดของแผลแล้ว การศึกษาในครั้งนี้ได้เก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อแผลที่ได้รับการรักษาด้วยยาสมานแผลทั้ง 2 รูปแบบ ในวันที่ 11 มาตรวจวิเคราะห์หาระดับของ TGF-beta1, VEGF, collagen type III และ collagen type I พบว่า ยาสมานแผลทั้ง 2 รูปแบบ มีความสามารถในการเพิ่มระดับของ TGF-beta1, VEGF, collagen type III และ collagen type I ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

ความบกพร่องของกระบวนการหายของแผลในโรคเบาหวาน ซึ่งนำไปสู่การเกิดแผลเรื้อรังนั้น เกิดจากสาเหตุต่างๆ หลายปัจจัยร่วมกัน หนึ่งในสาเหตุที่มีรายงานการวิจัยก่อนหน้านี้ พบว่า โรคเบาหวานมีความบกพร่องของเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ เช่น neutrophils และ macrophages ทำให้ลดการสร้างและหลังปัจจัยการเจริญเติบโตที่สำคัญบางชนิดในกระบวนการหายของแผล (Wetzler *et al.*, 2000) เช่น TGF-beta1 (Jude *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2003; Galkowska *et al.*, 2006) และ VEGF (Saaristo *et al.*, 2006; Lin *et al.*, 2017) โรคเบาหวานนอกจากส่งผลต่อความบกพร่องของการหลังปัจจัยการเจริญเติบโตแล้ว ยังทำให้เกิดความไม่สมดุลของการสร้างและสลาย collagen อีกด้วย โดยมีผลทำให้เกิดการสลาย collagen มากกว่าสภาวะปกติ ส่งผลให้เนื้อเยื่อที่สร้างใหม่บริเวณแผลไม่มีความแข็งแรง (Goulding, 2015) จากผลการประเมินฤทธิ์ของยาสมานต่อปัจจัยเหล่านี้ พบว่า ยาสมานแผลสามารถกระตุ้นการสร้าง TGF-beta1, VEGF, collagen type III และ collagen type I ได้อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งเป็นผลการ

ทดสอบที่สามารถยืนยันฤทธิ์ของยาสมานแผลที่สามารถส่งเสริมกระบวนการหายของแผลในโรคเบาหวานได้

จากการวิเคราะห์เปรียบเทียบยาสมานแผลในรูปแบบยาน้ำมันและยาสมานแผลในรูปแบบยาเตรียมแผ่นปิดแผลต่อฤทธิ์ส่งเสริมกระบวนการหายของแผลในหนูเบาหวาน พบว่ายาสมานแผลทั้ง 2 รูปแบบ มีความสามารถในการกระตุ้นการสร้าง VEGF ในแผลเบาหวานได้ไม่แตกต่างกัน แต่ยาสมานแผลในรูปแบบยาเตรียมแผ่นปิดแผลสามารถกระตุ้นการสร้าง TGF-beta1 และ collagen ในแผลเบาหวานได้ดีกว่ายาสมานแผลในรูปแบบยาน้ำมัน อาจจะเป็นผลมาจากกระบวนการหายของแผลในสภาวะที่มีน้ำตาลในเลือดสูง ส่งผลต่อการเกิดการอักเสบที่ยาวนาน รูปแบบยาเตรียมแผ่นปิดแผลของตำรับยาสมานแผลที่สามารถยับยั้งการอักเสบได้ดีกว่าน่าจะสามารถกระตุ้นการสร้างปัจจัยการเจริญเติบโตและส่งเสริมให้มีกระบวนการหายของแผลที่ดีกว่าได้

## บทที่ 5

### สรุป

1. สมุนไพรองค์ประกอบในตำรับยาสมานแผลมีลักษณะทางเภสัชเวท ปริมาณสิ่งเจือปน และปริมาณสารสำคัญที่เป็นไปตามข้อกำหนดมาตรฐานของ Thai herbal pharmacopeia และ/หรือ Ayurvedic herbal pharmacopoeia

2. ความคงตัวของเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของยาสมานแผล T-YaSP และ YaSP ลดลงเมื่อผ่านการเก็บรักษาเป็นเวลา 6 เดือน
3. ยาสมานแผล T-YaSP และ YaSP ไม่ก่อให้เกิดการระคายเคืองต่อผิวหนังสัตว์ทดลอง
4. ยาสมานแผล T-YaSP และ YaSP มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ โดยการยับยั้ง MPO, MDA, NO, iNOS, COX-2, PGE<sub>2</sub> และ TNF-alpha, IL-1beta แต่ยาสมานแผลในรูปแบบ YaSP มีฤทธิ์ที่ดีกว่า
5. ยาสมานแผล T-YaSP และ YaSP มีฤทธิ์ส่งเสริมกระบวนการหายของแผลได้ในแผลปกติและแผลเบาหวาน โดยสามารถกระตุ้นการสร้าง VEGF และ TGF-beta1 ในระยะแรกของการหายของแผลได้ และสามารถลดระดับของ VEGF และ TGF-beta1 ในระยะสุดท้ายของการหายของแผลได้ อีกทั้งยังสามารถกระตุ้นการสร้าง collagen I และยับยั้งการสร้าง collagen III ในระยะการแบ่งเซลล์และระยะการปรับรูปร่างของการหายของแผลได้ ซึ่ง YaSP มีฤทธิ์ส่งเสริมกระบวนการหายของแผลที่ดีกว่า

## เอกสารอ้างอิง

Abraham A., Samuel S. and Mathew 3. 2018. Pharmacognostic evaluation of *Curcuma longa* L. rhizome and standardization of its formulation by HPLC using Curcumin as marker. International journal of pharmacognosy and phytochemical research. 10, 38-42

- Amel B. 2015. Microscopic analysis of *Curcuma longa* L. using multivariate test. International journal of pharmacognosy. 2, 173-177.
- Anthikat R.R.N and Michael A. 2012. Anti-inflammatory and antioxidant effect of *Areca catechu*. International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research. 3, 2031-2037.
- Akbik D., Ghadiri M., Chrzanowski W. and Rohanizadeh R. 2014. Curcumin as a wound healing agent. Life Sciences. 116. 1-7.
- Aratani Y. 2018. Myeloperoxidase: its role for host defense, inflammation, and neutrophil function. Archives of Biochemistry and Biophysics. 640, 47-52.
- Arya N., Prakash O., Verma A.K. and Pant A.K. 2015a. Variation in antioxidant potential of *Curcuma longa* L. collected from different ecological niches of western Himalayan region. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. 7, 85-90.
- Arya N., Prakash O., Vivekanand A.K. and Pant A.K. 2015b. Anti-inflammatory and antipyretic activity of *Curcuma longa* L. collected from Uttarakhand. International Journal of Development Research. 5, 2914-2917.
- Aukkanimart R., Boonmars T., Sriraj P., Sripan P., Songsri J., Ratanasuwan P. and et al. 2017. *In vitro* and *in vivo* inhibitory effects of alpha-mangostin on cholangiocarcinoma cells and allografts. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention. 18, 707-713.
- Bainbridge P. 2013. Wound healing and the role of fibroblasts. Journal of Wound Care. 22, 407-408.
- Bajpai V.K., Alam M.B., Quan K.T., Ju M., Majumder R., Shukla S. and et al. 2018. Attenuation of inflammatory responses by (+)-syringaresinol via MAP-Kinase mediated suppression of NF-KB signaling *in vitro* and *in vivo*. Scientific Reports. 8, 9216.

- Bansal G., Suthar N., Kaur J. and Jain A. 2016. Stability testing of herbal drugs: challenges, regulatory compliance and perspectives. *Phytotherapy Research*. 30, 1046-1058.
- Bao P., Kodra A., Tomic-Canic M., Golinko M.S., Ehrlich H.P. and Brem H. 2009. The role of vascular endothelial growth factor in wound healing. *Journal of Surgical Research*. 153, 347-358.
- Basu A., Das A.S., Sharma M., Pathak M.P., Chattopadhyay P., Biswas K. and et al. 2017. STAT3 and NF- $\kappa$ B are common targets for kaempferol-mediated attenuation of COX-2 expression in IL-6-induced macrophages and carrageenan-induced mouse paw edema. *Biochemistry and Biophysics Reports*. 12, 54-61.
- Bhandare A.M., Kshirsagar A.D., Vyawahare N.S., Hadambar A.A. and Thorve V.S. 2010. Potential analgesic, anti-inflammatory and antioxidant activities of hydroalcoholic extract of *Areca catechu* L. nut. *Food and Chemical Toxicology*. 48, 3412-3417.
- Björnsdóttir H., Welin A., Michaëlsson E., Osla V., Berg S., Christenson K. and et al. 2015. Neutrophil NET formation is regulated from the inside by myeloperoxidase processed reactive oxygen species. *Free Radical Biology and Medicine*. 89, 1024-1035.
- Cañedo-Dorantes L. and Cañedo-Ayala M. 2019. Skin acute wound healing: a comprehensive review. *International Journal of Inflammation*. 2019, Article ID 3706315.
- Chae H.S., Oh S.R., Lee H.K., Joo S.H. and Chin Y.W. 2012. Mangosteen xanthenes, a- and c-mangostins, inhibit allergic mediators in bone marrow-derived mast cell. *Food Chemistry*. 134, 397-400.
- Chandrasekaran C., Sundarajan K., Edwin J., Gururaja G., Mundkinajeddu D. and Agarwal A. 2013. Immune-stimulatory and anti-inflammatory activities of

*Curcuma longa* extract and its polysaccharide fraction. *Pharmacognosy Research*. 5, 71-79.

Chokpaisarn J., Yincharoen K., Sanpinit S., Pandian S.T.K., Nandhini JR., Gowrishankar S. and et al. 2019. Effects of a traditional Thai polyherbal medicine 'Ya-Samarn-Phlae' as a natural antibiofilm agent against *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbial Pathogenesis*. 128, 354-362.

Chusri S., Sompetch K., Mukdee S., Jansrisewangwong S., Srichai T., Maneenoon K., Limsuwan S. and Voravuthikunchai S.P. 2012. Inhibition of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation by traditional thai herbal recipes used for wound treatment. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. ID 159797, 1-9.

Chusri S., Jittanon W., Maneenoon K. and Voravuthikunchai S.P. 2013. An effective antibiofilm agent against *Pseudomonas aeruginosa* biofilm from traditional thai herbal recipes used for wound treatments. *Microbial Drug Resistance*. 5, 337-343.

Chusri S., Tongrod S., Saising J., Mordmuang A., Limsuwan S., Sanpinit S. and et al. 2016. Antibacterial and anti-biofilm effects of a polyherbal formula and its constituents against coagulase-negative and -positive staphylococci isolated from bovine mastitis. *Journal of Applied Animal Research*. 1-8.

Chusri S., Tongrod S., Chokpaisarn J., Limsuwan S. and Voravuthikunchai S.P. 2014. Antagonistic interactions of "Ya-Sa-Marn-Phlae" ethanol extract in combination with topical antiseptics against clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *BioMed Research International*. ID 867603, 1-7.

Cooney J.M., Barnett M.P.G., Dommels Y.E.M., Brewster D., Butts C.A., McNabb W.C. and et al. 2016. A combined omics approach to evaluate the effects of dietary curcumin on colon inflammation in the Mdr1a/ mouse model of inflammatory bowel disease. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 27, 181-192.

- Crowe M.J., Doetschman T. and Greenhalgh D.G. 2000. Delayed wound healing in immunodeficient TGF-beta 1 knockout mice. *Journal of Investigative Dermatology*. 115, 3-11.
- Dai X., Liu J., Zheng H., Wichmann J., Hopfner U., Sudhop S. and et al. 2017. Nano formulated curcumin accelerates acute wound healing through Dkk-1-mediated fibroblast mobilization and MCP-1-mediated anti-inflammation. *NPG Asia Materials*. 9, e368-e368.
- Dhurai B., Saraswathy N., Maheswaran R., Sethupathi P., Vanitha P., Vigneshwaran S. and Rameshbabu V. 2013. Electrospinning of curcumin loaded chitosan/poly (lactic acid) nanofilm and evaluation of its medicinal characteristics. *Frontiers of Materials Science*. 7, 350-361.
- Dorrington M.G. and Fraser I.D.C. 2019. NF-kB signaling in macrophages: dynamics, crosstalk, and signal integration. *Frontiers in Immunology*. 10, 1-12.
- Einbond L.S., Wu H., Kashiwazaki R., He K., Roller M., Wang X. and et al. 2012. Carnosic acid inhibits the growth of ER-negative human breast cancer cells and synergizes with curcumin. *Fitoterapia*. 83, 1160-1168.
- Galano A., Álvarez-Diduk R., Ramírez-Silva M.T, Alarcón-Ángeles G. and Rojas-Hernández A. 2009. Role of the reacting free radicals on the antioxidant mechanism of curcumin. *Chemical Physics*. 363, 13-23.
- Galkowska H., Wojewodzka U. and Olszewski W.L. 2006. Chemokines, cytokines, and growth factors in keratinocytes and dermal endothelial cells in the margin of chronic diabetic foot ulcers. *Wound Repair and Regeneration*. 14, 558-565.
- Gasparini C. and Feldmann M. 2012. NF-kB as a target for modulating inflammatory responses. *Current Pharmaceutical Design*. 18, 5735-5745.
- Gira A.K., Brown L.F., Washington C.V., Cohen C. and Arbiser J.L. 2004. Keloids demonstrate high-level epidermal expression of vascular endothelial growth factor. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 50, 850-853.



- Gonzales A.M. and Orlando R.A. 2008. Curcumin and resveratrol inhibit nuclear factor kappaB-mediated cytokine expression in adipocytes. *Nutrition and Metabolism*. 5, 1-13.
- Gutierrez-Orozco F., Chitchumroonchokchai C., Lesinski G.B., Suksamrarn S. and Failla M.L. 2013. Alpha-mangostin: anti-inflammatory activity and metabolism by human cells. 61, 3891-3900.
- Ha S.K., Sung J., Choi I. and Kim Y. 2016. *Oryza sativa* (rice) hull extract inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory response in RAW264.7 macrophages by suppressing extracellular signal-regulated kinase, c-Jun N-terminal kinase, and nuclear factor-kB activation. *Pharmacognosy Magazine*. 12, 295-301.
- Herrera-Aco H.R., Medina-Campos O.N., Pedraza-Chaverri J., Sciotto-Conde E., Rosas-Salgado G. and Fragoso-González G. 2019. Alpha-mangostin: Anti-inflammatory and antioxidant effects on established collagen-induced arthritis in DBA/1J mice. *Food and Chemical Toxicology*. 124, 300-315.
- Hong X.J., Ping Y.H., Dong Z.X., Jing W.H., Liang G. and Lan T.C. 2015. Autophagy accompanied with bisdemethoxycurcumin-induced apoptosis in non-small cell lung cancer cells. *Biomedical and Environmental Sciences*. 28, 105-115.
- Hisamuddin N., Mossadeq W.M.S., Sulaiman M.R., Abas F., Leong S.W., Kamarudin N. and et al. 2019. Anti-Edematogenic and Anti-Granuloma Activity of a Synthetic Curcuminoid Analog, 5-(3,4-Dihydroxyphenyl)-3-hydroxy-1-(2-hydroxyphenyl)penta-2,4-dien-1-one, in Mouse Models of Inflammation. *Molecules*. 24, 1-14.
- Hussein S.Z., Yusoff K.M., Makpol S. and Yusof Y.A.M. 2013. Gelam honey attenuates carrageenan-induced rat paw inflammation via NF-kB pathway. *PLOS ONE*. 8, e72365.
- Florentino I.F., Silva D.P.B., Silva D.M., Cardoso C.S., Moreira A.L.E., Borges C.L. and et al. 2017. Potential anti-inflammatory effect of LQFM-021 in carrageenan induced inflammation: the role of nitric oxide. *Nitric Oxide*. 69, 35-44.

- Frank S., Hübner G., Breier G., Longaker M.T., Greenhalgh D.G. and Werner S. 1995. Regulation of vascular endothelial growth factor expression in cultured keratinocytes. *Journal of Biological Chemistry*. 270, 12607-12613.
- Fukuda M., Sakashita H., Hayashi H., Shiono J., Miyake G., Komine Y., et al. 2017. Synergism between a-mangostin and TRAIL induces apoptosis in squamous cell carcinoma of the oral cavity through the mitochondrial pathway. *Oncology Reports*. 38, 3439-3446.
- Janakiram N.B. and Rao C.V. 2012. iNOS-selective inhibitors for cancer prevention: promise and progress. *Future Medicinal Chemistry*. 4, 2193-2204.
- Johnson K.E. and Wilgus T.A. 2014. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis in the regulation of cutaneous wound repair. *Advances in Wound Care*. 3, 647-661.
- Jude E.B., Blakytyn R., Bulmer J., Boulton A.J.M and Ferguson M.W.J. Transforming growth factor-beta 1, 2, 3 and receptor type I and II in diabetic foot ulcers. *Diabetic Medicine*. 19, 440-447.
- Kant V., Gopal A., Kumar D., Pathak N.N., Ram M., Jangir B.L. and et al. 2015. Curcumin-induced angiogenesis hastens wound healing in diabetic rats. *Journal of Surgical Research*. 193, 978-988.
- Karppinen S.M., Heljasvaara R., Gullberg D., Tasanen K. and Pihlajaniemi T. 2019. Toward understanding scarless skin wound healing and pathological scarring. *F1000Research*. 8, 1-11.
- Khan S., Mehmood M.H., Ali A.N.A., Ahmed F.S., Dar A. and Gilani A.H. 2011. Studies on anti-inflammatory and analgesic activities of betel nut in rodents. *Journal of Ethnopharmacology*. 135, 654-661.
- Kim B.C., Kim H.T., Park S.H., Cha J.S., Yufit T., Kim S.J. and et al. 2003. Fibroblasts from chronic wounds show altered TGF-beta-signaling and decreased TGF-beta type II receptor expression. *Journal of Cellular Physiology*. 195, 331-336.

- Kitano T., Yamada H., Kida M., Okada Y., Saika S. and Yoshida M. 2017. Impaired healing of a cutaneous wound in an inducible nitric oxide synthase-knockout mouse. *Dermatology Research and Practice*. 2017, Article ID 2184040.
- Kokmas W., Kruevaisayawan H., Amatyakul P. and Khongsombat O. 2018. Supplementation of freezing medium with alpha-mangostin improves human sperm quality after cryopreservation. *Thai Journal of Pharmacology*. 40, 27-37.
- Kosema N., Hanb Y. and Moongkarndia P. 2007. Antioxidant and cytoprotective activities of methanolic extract from *Garcinia mangostana* hulls. *ScienceAsia*. 33, 283-292.
- Kuedo Z., Sangsuriyawong A., Klaypradit W., Tipmanee V. and Chonpathompikunlert P. 2016. Effects of astaxanthin from *Litopenaeus vannamei* on carrageenan induced edema and pain behavior in mice. *Molecules*. 21, 382.
- Lal J., Gupta S.K., Thavaselvam D. and Agarwal D.D. 2013. Biological activity, design, synthesis and structure activity relationship of some novel derivatives of curcumin containing sulfonamides. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 64, 579-588.
- Lee M., Hwang J. and Lim K. 2017. Alternatives to *in vivo* draize rabbit eye and skin irritation tests with a focus on 3D reconstructed human cornea-like epithelium and epidermis models. *Toxicological Research*. 33, 191-203.
- Lee K.P., Sudjarwo G.W., Kim J.S., Dirgantara S., Maeng W.J. and Hong H. 2014. The anti-inflammatory effect of Indonesian *Areca* catechuleaf extract *in vitro* and *in vivo*. *Nutrition Research and Practice*. 8, 267-271.
- Li X.Q., Kang R., Huo J.C., Xie Y.H., Wang S.W. and Cao W. 2017. Wound-healing activity of *Zanthoxylum bungeanum* Maxim seed oil on experimentally burned rats. *Pharmacognosy Magazine*. 13, 363-371.
- Lin C., Yin G., Ou M. and Zheng S. 2017. The effects of HIF-1 $\alpha$  and VEGF on wound healing in diabetic mice. *Biomedical Research*. 28, 8121-8124.

- Lingaraju M.C., Anand S., Balaganur V., Kumari R.R., Bhat R.A., More A.S. and et al. 2016. Anti-inflammatory effect of dikae,pherol rhamnopyranoside, a diflavonoid from *Eugenia jambolana* Lam. Leaves. Indian Journal of Experimental Biology. 54, 801-807.
- Limtrakul P., Yodkeeree S., Pitchakarn P. and Punfa W. 2016. Anti-inflammatory effects of proanthocyanidin-rich red rice extract via suppression of MAPK, AP-1 and NF-kB pathways in RAW 264.7 macrophages. Nutrition Research and Practice. 10, 251-258.
- Luo J. and Chen A. 2005. Nitric oxide: a newly discovered function on wound healing. Acta Pharmacologica Sinica. 26, 259-264.
- Mani H., Sidhu G.S., Kumari R., Gaddipati J.P., Seth P. and Maheshwari R.K. 2002. Curcumin differentially regulates TGF-beta1, its receptors and nitric oxide synthase during impaired wound healing. Biofactors. 16, 29-43.
- Maria B. Witte M.D. and Barbul A. 2002. Role of nitric oxide in wound repair. The American Journal of Surgery. 183, 406-412.
- Mei L., Fan R., Li X., Wang Y., Han B., Gu Y. and et al. 2017. Nanofibers for improving the wound repair process: the combination of a grafted chitosan and an antioxidant agent. Polymer Chemistry. 8, 1664-1671.
- Merrell J.G., McLaughlin S.W., Tie L., Laurencin C.T., Chen A.F. and Nair L.S. 2009. Curcumin-loaded poly( $\epsilon$ -caprolactone) nanofibres: Diabetic wound dressing with anti-oxidant and anti-inflammatory properties. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology. 36, 1149-1156.
- Mohan S., Syam S., Abdelwaha S.I. and Thangavel N. 2018. Anti-inflammatory molecular mechanism of action of alpha-mangostin, the major xanthone from the pericarp of *Garcinia mangostana*; an in silico, in vitro and in vivo approach. Food & Function. 9, 3860-3871.

- Mohanty C., Das M. and Sahoo S.K. 2012. Sustained wound healing activity of curcumin loaded oleic acid based polymeric bandage in a rat model. *Molecular Pharmaceutics*. 9, 2801-2811.
- Mohanty C. and Sahoo S.K. 2017. Curcumin and its topical formulations for wound healing applications. *Drug Discovery Today*. 22, 1582-1592.
- Mohammadi Z., Zak M.S., Majdi H., Mostafavi E., Barati M., Lotfimehr H. and et al. 2019. The effect of chrysin–curcumin-loaded nanofibers on the wound-healing process in male rats. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*. 47, 1642-1652.
- Mutlu G., Calamak S., Ulubayram K. and Guven E. 2018. Curcuminloaded electrospun PHBV nanofibers as potential wound-dressing material. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 43, 185-193.
- Naik S.R., Thakare V.N. and Patil S.R. Protective effect of curcumin on experimentally induced inflammation, hepatotoxicity and cardiotoxicity in rats: evidence of its antioxidant property. *Experimental and Toxicologic Pathology*. 63 ,419-431.
- Nakatake R., Hishikawa H., Matushima H., Nakamura Y., Ishizaki M, Matsui K. and et al. 2017. Curcumin protects liver inflammation by suppressing expression of inducible nitric oxide synthase in primary cultured rat hepatocytes. *Functional Foods in Health and Disease*. 7, 716-734.
- Navya A., Kumar Y., Prasad O., Santhrani T. and Devi P. 2012. *In vivo* and *in silico* analysis divulges the anti-inflammatory activity of alpha-mangostin. *International Journal of Applied Biotechnology and Biochemistry*. 2, 69-80.
- Nikpour M., Delavar M.A., Khafri S., Ghanbarpour A., Moghadamnia A.A., Esmaeilzadeh S. and et al. 2019. The use of honey and curcumin for episiotomy pain relief and wound healing: a three-group double-blind randomized clinical trial. *Nursing and Midwifery Studies* 8, 64-69.

- Nittayananta W., Limsuwan S., Srichana T., Sae-Wong C., Amnuait T. 2018. Oral spray containing plant-derived compounds is effective against common oral pathogens. *Archives of Oral Biology*. 90, 80-85.
- Obolskiy D., Pischel I., Siriwatanametanon N. and Heinrich M. 2009. *Garcinia mangostana* L.: A phytochemical and pharmacological review. *Phytotherapy research*. 23, 1047-1065.
- Panchatcharam M., Miriyala S., Gayathri V.S. and Suguna L. 2006. Curcumin improves wound healing by modulating collagen and decreasing reactive oxygen species. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 290, 87-96.
- Penn J.W., Grobbelaar A.O. and Rolfe K.J. 2012. The role of the TGF-beta family in wound healing, burns and scarring: a review. *International Journal of Burns and Trauma*. 2, 18-28.
- Perobelli S.M., Galvani R.G., Gonçalves-Silva T., Xavier C.R., Nóbrega A. and Bonomo A. 2015. Plasticity of neutrophils reveals modulatory capacity. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 48, 665-675.
- Phan T.K.T., Shahbazzadeh F., Pham T.T.H., Kihara T. 2018. Alpha-mangostin inhibits the migration and invasion of A549 lung cancer cells. *PeerJ*. 6, e5027.
- Park J.E., Abrams M.J., Efron P.A. and Barbul A. 2013. Excessive nitric oxide impairs wound collagen accumulation. *Journal of Surgical Research*. 183, 487-492.
- Phunpee S., Suktham K., Surassmo S., Jarussophon S., Rungnim C., Soottitantawat A., et al. 2018. Controllable encapsulation of a-mangostin with quaternized b-cyclodextrin grafted chitosan using high shear mixing. *International Journal of Pharmaceutics*. 538, 21-29.
- Prasad R., Kumar D., Kant V., Tandan S.K. and Kumar D. 2017. Curcumin enhanced cutaneous wound healing by modulating cytokines and transforming growth factor in excision wound model in rats. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 6, 2263-2273.

- Pushpa V.H., Suresha R.N., Jyoti M.B., Kalabharathi H.L. and Satish A.M. 2016. Evaluation of anti-inflammatory activity of fresh turmeric powder (*Curcuma longa*) in acute inflammation. National Journal of Basic Medical Sciences. 1, 229-231.
- Rackova L., Kostalova D., Bezakova L., Fialova S., Bauerova K., Toth J. and et al. 2009. Comparative study of two natural antioxidants, curcumin and *Curcuma longa* extract. Journal of Food and Nutrition Research. 48, 148-152.
- Rafiee L., Hajhashemi V. and Javanmard S.H. 2019. Maprotiline inhibits COX2 and iNOS gene expression in lipopolysaccharide-stimulated U937 macrophages and carrageenan-induced paw edema in rats. Central European Journal of Immunology. 44, 15-22.
- Rizk M., Witte M.B. and Barbul A. 2004. Nitric oxide and wound healing. World Journal of Surgery. 28, 301-306.
- Saaristo A., Tammela T., Farkkila A., Karkkainen M., Suominen E., Yla-Herttuala S. and et al. 2006. Vascular endothelial growth factor-C accelerates diabetic wound healing. The American Journal of Pathology. 169, 1080-1087.
- Sadeghi H., Mostafazadeh M., Sadeghi H., Naderian M., Barmak M.J., Talebianpoor M.S. and et al. 2014. *In vivo* anti-inflammatory properties of aerial parts of *Nasturtium officinale*. Pharmaceutical Biology. 52, 169-174.
- Salem A., Assaf M., Helmy A., Nofal A., Ibrahim S., Eldeeb F. and et al. 2009. Role of vascular endothelial growth factor in keloids: a clinicopathologic study. International Journal of Dermatology. 48, 1071-1077.
- Samuagam L., Sia C.M., Akowuah G.A., Okechukwu P.N. and Yim H.S. 2013. The effect of extraction conditions on total phenolic content and free radical scavenging capacity of selected tropical fruits' peel. Health and the Environment Journal. 4, 80-102.

- Sanabria-Rios D.J., Rivera-Torres Y., Rosario J., Gutierrez R., Torres-García Y., Montano N. and et al. 2015. Chemical conjugation of 2-hexadecynoic acid to C5 curcumin enhances its antibacterial activity against multi-drug resistant bacteria. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 25, 5067-5071.
- Savari R., Shafiei S., Galehdari H. and Kesmati M. 2019. Expression of VEGF and TGF beta genes in skin wound healing process induced using phenytoin in male rats. *Jundishapur Journal of Health Sciences*. 11, 1-5.
- Selders G.S., Fetz A.E., Radic M.Z. and Bowlin G.L. 2017. An overview of the role of neutrophils in innate immunity, inflammation and host-biomaterial integration. *Regenerative Biomaterials*. 4, 55-68.
- Schierwagen C., Bylund-Fellenius A. and Lundberg C. 1990. Improved method for quantification of tissue PMN accumulation measured by myeloperoxidase activity. *Journal of Pharmacological Methods*. 23, 179-186.
- Schmid P., Itin P., Cherry G., Bi C. and Cox D.A. 1998. Enhanced expression of transforming growth factor-beta type I and type II receptors in wound granulation tissue and hypertrophic scar. *The American Journal of Pathology*. 152, 485-493.
- Scolamiero G., Pazzini C., Bonafè F., Guarnieri C., Muscari C. 2018. Effects of a-mangostin on viability, growth and cohesion of multicellular spheroids derived from human breast cancer cell lines. *International Journal of Medical Sciences*. 15, 23-30.
- Sharafudheen J., Gopkrishnan S., Aneesh P. and Mukkadan J.K. 2015. Anti inflammatory and antinociceptive activity of areca nut water extract. *International Journal of Innovative Pharmaceutical Sciences and Research*. 3, 278-284.
- Sharafudheen J., Gopalakrishnan S., Mukkadan J.K. and Vizhi K. 2018. Anti-Bacterial, Anti-inflammatory and anti-nociceptive activities of areca nut components (arecoline and polyphenol). *International Journal of Science and Research Methodology*. 10, 85-96.



- Silva-Comar F.M., Wiirzler L.A.M., Silva-Filho S.E., Kummer R., Pedroso R.B., Spironello R.A. and et al. 2014. Effect of estragole on leukocyte behavior and phagocytic activity of macrophages. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2014, 1-7.
- Slavkovsky R., Kohlerova R., Tkacova V., Jiroutova A., Tahmazoglu B., Velebny V. and et al. 2011. Zucker diabetic fatty rat: A new model of impaired cutaneous wound repair with type II diabetes mellitus and obesity. *Wound Repair and Regeneration*. 19, 515-525.
- Sodata P., Juntavee A., Juntavee N., Peerapattana J. 2017. Optimization of Adhesive Pastes for Dental Caries Prevention. *American Association of Pharmaceutical Scientists*. 18, 3087-3096.
- Song M.Y., Yim J.Y., Yim J.M., Kang I.J., Rho H.W., Kim H.S. and et al. 2011. Curcumin to decrease nitric oxide production during the induction of antitumor responses by IL-2. *Journal of Immunotherapy*. 34, 165-174.
- Suckoe M.A., Gobbett T.A. and Peterson R.G. 2017. Wound healing delay in the ZDSD rat. *In Vivo*. 31, 55-60.
- Tarasuk M., Songprakhon P., Chimma P., Sratongno P., Na-Bangchang K. and Yenchitsomanus P. 2017. Alpha-mangostin inhibits both dengue virus production and cytokine/chemokine expression. *Virus Research*. 240, 180-189.
- Tatiya-aphiradee N., Chatuphonprasert W. and Jarukamjorn K. 2019. Anti-inflammatory effect of *Garcinia mangostana* Linn. pericarp extract in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*-induced superficial skin infection in mice. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 111, 705-713.
- Tewtrakul S., Wattanapiromsakul C., and Mahabusarakam W. 2009. Effects of compounds from *Garcinia mangostana* on inflammatory mediators in RAW264.7 macrophage cells. *Journal of Ethnopharmacology*. 121, 379-382.

- Tsuji S., Iharada A., Taniuchi S., Hasui M. and Kaneko K. 2012. Increased production of nitric oxide by phagocytic stimulated neutrophils in patients with chronic granulomatous disease. *Journal of Pediatric Hematology/Oncology*. 34, 500-502.
- Tucureanu M.M., Rebleanu D., Constantinescu C.A., Deleanu M., Voicu G., Butoi E. and et al. 2018. Lipopolysaccharide-induced inflammation in monocytes/macrophages is blocked by liposomal delivery of G<sub>i</sub>-protein inhibitor. *International Journal of Nanomedicine*. 20, 63-76.
- Volk S.W., Wang Y., Mauldin E.A., Liechty K.W. and Adams S.L. 2011. Diminished type III collagen promotes myofibroblast differentiation and increases scar deposition in cutaneous wound healing. *Cells Tissues Organs*. 194, 25-37.
- Wang R., Ghahary A., Shen Q., Scott P.G., Roy K. and Tredget E.E. 2000. Hypertrophic scar tissues and fibroblasts produce more transforming growth factor-beta1 mRNA and protein than normal skin and cells. *Wound Repair and Regeneration*, 8, 128-137.
- Wang X.J., Han G., Owens P., Siddiqui Y. and Li AG. 2006. Role of TGF beta-mediated inflammation in cutaneous wound healing. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*. 11, 112-117.
- Wang F., Gao N., Yin J. and Yu F.X. 2012. Reduced innervation and delayed re innervation after epithelial wounding in type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats. *The American Journal of Pathology*. 181, 2058-2066.
- Wang J.J., Sanderson B.J. and Zhang W. 2012. Significant anti-invasive activities of alpha-mangostin from the mangosteen pericarp on two human skin cancer cell lines. *Anticancer Research*. 32, 3805-3816.
- Wang T., Gu Q., Zhao J., Mei J., Shao M., Pan Y. and et al. 2015. Calcium alginate enhances wound healing by up-regulating the ratio of collagen types I/III in diabetic rats. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*. 8, 6636-6645.

- Wang J. 2018. Neutrophils in tissue injury and repair. *Cell and Tissue Research*. 371, 531-539.
- Wang T. and Chen J. 2019. Effects of curcumin on vessel formation insight into the pro and antiangiogenesis of curcumin. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2019, Article ID 1390795.
- Wetzler C., Kampfer H., Stallmeyer B., Pfeilschifter J. and Frank S. 2000. Large and sustained induction of chemokines during impaired wound healing in the genetically diabetic mouse: prolonged persistence of neutrophils and macrophages during the late phase of repair. *Journal of Investigative Dermatology*. 115, 245-253.
- Widowati W., Darsono L., Suherman J., Fauziah N., Maesaroh M. and Erawijantari P.P. 2016. Anti-inflammatory effect of mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) peel extract and its compounds in LPS-induced RAW264.7 cells. *Natural Product Sciences*. 22, 147-153.
- Wilgus T.A., Ferreira A.M., Oberyszyn T.M., Bergdall V.K. and DiPietro L.A. 2008. Regulation of scar formation by vascular endothelial growth factor. *Laboratory Investigation*. 88, 579-590.
- Wilgus T.A., Roy S. and McDaniel J.C. 2013. Neutrophils and wound repair: positive actions and negative reactions. *Advances in Wound Care*. 2, 379-388.
- Wu Y., Zhang Q., Ann D.K., Akhondzadeh A., Duong H.S. Messadi D.V. and et al. 2004. Increased vascular endothelial growth factor may account for elevated level of plasminogen activator inhibitor-1 via activating ERK1/2 in keloid fibroblasts. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 286, C905-C912.
- Wu W.S., Wang F.S., Yang K.D., Huang C.C. and Kuo Y.R. 2006. Dexamethasone Induction of Keloid Regression through Effective Suppression of VEGF Expression and Keloid Fibroblast Proliferation. *Journal of Investigative Dermatology*. 126, 1264-1271.

- Wu N.C. and Wang J.J. 2014. Curcumin attenuates liver warm ischemia and reperfusion-induced combined restrictive and obstructive lung disease by reducing matrix metalloprotease 9 activity. *Transplantation Proceedings*. 46, 1135-1138.
- You J., Sun J., Ma T., Yang Z., Wang X., Zhang Z. and et al. 2017. Curcumin induces therapeutic angiogenesis in a diabetic mouse hindlimb ischemia model via modulating the function of endothelial progenitor cells. *Stem Cell Research and Therapy*. 8, 1-10.
- Yu C.O.L., Leung K.S., Fung K.P., Lam F.F.Y., Ng E.S.K., Lau K.M. and et al. 2017. The characterization of a full-thickness excision open foot wound model in n5 streptozotocin (STZ)-induced type 2 diabetic rats that mimics diabetic foot ulcer in terms of reduced blood circulation, higher C-reactive protein, elevated inflammation, and reduced cell proliferation. *Experimental Animals*. 66, 259-269.
- Zhang W., Yang F., Wang Y., Jiao F., Zhang H., Wang L. and et al. 2019. Inhibition of HDAC6 attenuates LPS-induced inflammation in macrophages by regulating oxidative stress and suppressing the TLR4-MAPK/NF-kB pathways. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 117, 109166
- Zhao F., Gong Y., Hu Y., Lu M., Wang J., Dong J. and et al. 2014. Curcumin and its major metabolites inhibit the inflammatory response induced by lipopolysaccharide: Translocation of nuclear factor-kB as potential target. *Molecular Medicine Reports*. 11, 3087-3093.

## ภาคผนวก

ตารางที่ 24 Chemical profiles of Ya-Samarn-Phlae and its four components using liquid chromatography–mass spectrometry (LC-MS).

RT	Compound Label	MFG Formula (Mass)	E-YaSP	T-YaSP	YaSP	CL	GM	OS	AC
3.028	(-)-Glyceollin I	C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> O <sub>5</sub> (338.116)	+	-	-	+	-	-	-
22.349	(+)-Arniconone	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O (218.167)	+	-	-	+	-	-	-
4.306	(+)-Tephrosin A	C <sub>24</sub> H <sub>26</sub> O <sub>7</sub> (426.166)	-	-	-	-	+	-	-
2.751	(+)-Warfarin	C <sub>19</sub> H <sub>16</sub> O <sub>4</sub> (308.106)	-	-	-	+	-	-	-
2.106	(10S)-Juvenile hormone III acid diol	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O <sub>4</sub> (270.184)	+	-	-	-	-	-	-
20.377	(3beta,8beta)-3-Hydroxy7(11)-eremophilin-12, 8-olide	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O <sub>3</sub> (250.157)	-	+	-	-	-	-	-
7.036	1-(3-Methylbutanoyl)-6-apiosylglucose	C <sub>16</sub> H <sub>28</sub> O <sub>11</sub> (396.163)	-	-	-	-	+	-	-
27.675	1,7-Dihydroxy-3,6-dimethoxy-2,8-diprenylxanthone	C <sub>25</sub> H <sub>28</sub> O <sub>6</sub> (424.190)	-	+	-	-	-	-	-

ตารางที่ 24 (Continued)

RT	Compound Label	MFG Formula (Mass)	E-YaSP	T-YaSP	YaSP	CL	GM	OS	AC
11.512	10,11-dihydroxy stearic acid	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>4</sub> (316.263)	-	-	-	-	-	+	-
21.555	10E-heptadecen-8 -ynoic acid	C <sub>17</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub> (264.209)	+	-	-	-	-	-	-
25.497	11,12-dihydroxy arachidic acid	C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> O <sub>4</sub> (344.293)	-	-	-	-	-	+	+
8.714	11-HpOME	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>4</sub> (314.245)	-	-	-	-	-	+	-
38.245	12-oxo-10Z -octadecenoic acid	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>3</sub> (296.236)	-	-	-	-	-	+	-
31.648	12R-HETrE	C <sub>20</sub> H <sub>34</sub> O <sub>3</sub> (322.249)	-	-	-	-	-	+	-
21.226	16-phenoxy tetranor Prostaglandin E2	C <sub>22</sub> H <sub>28</sub> O <sub>6</sub> (388.188)	-	-	+	-	-	-	-
38.230	16Z-octadecenoic acid	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub> (282.257)	-	-	-	-	-	+	+

ตารางที่ 24 (Continued)

RT	Compound Label	MFG Formula (Mass)	E-YaSP	T-YaSP	YaSP	CL	GM	OS	AC
3.031	1-Hydroxyacorenone	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O <sub>3</sub> (250.157)	+	-	-	+	-	-	-
25.750	1-Isomangostin	C <sub>24</sub> H <sub>26</sub> O <sub>6</sub> (410.174)	+	-	-	-	+	-	-
27.481	1-Linoleoyl Glycerol	C <sub>21</sub> H <sub>38</sub> O <sub>4</sub> (354.277)	-	-	-	-	-	+	-
31.200	1-Monopalmitin	C <sub>19</sub> H <sub>38</sub> O <sub>4</sub> (330.278)	-	-	-	-	-	+	-
25.749	2,3-Dehydrokieveitone	C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> O <sub>6</sub> (354.111)	+	-	-	-	+	-	-
13.814	2,3-Dihydroabscisic alcohol	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O <sub>3</sub> (252.172)	-	+	+	-	-	-	-
2.041	2,3-dinor Fluprostenol	C <sub>21</sub> H <sub>25</sub> F <sub>3</sub> O <sub>6</sub> (430.160)	-	-	-	-	+	-	-
22.857	2-Methyl-3 -thiophenethiol	C <sub>5</sub> H <sub>6</sub> S <sub>2</sub> (129.991)	-	-	-	-	-	-	+
2.963	3(4->5)-Abeo-4,11 :4,12-diepoxy-3-eudesmanol	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O <sub>3</sub> (252.173)	-	-	-	+	-	-	-



ตารางที่ 24 (Continued)

RT	Compound Label	MFG Formula (Mass)	E-YaSP	T-YaSP	YaSP	CL	GM	OS	AC
2.444	3,4'-Dimethoxyfurano [2,3:7,8]flavones	C <sub>19</sub> H <sub>14</sub> O <sub>5</sub> (322.085)	-	-	-	+	-	-	-
15.778	3,5-Pyridinedicarbo xylic acid, 1,4-dihydro -2, 6- dimethyl-4- (3- nitrophenyl)-, carboxymethyl methyl est	C <sub>18</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> (390.106)	-	+	+	-	-	-	-
19.196	3,5-Pyridinedicarbo xylic acid, 2, 6- dimethyl-4-(3- nitrophenyl)-, mono(2- hydroxyethyl) ester	C <sub>17</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub> (360.096)	-	-	+	-	-	-	-
32.835	3E,13Z-Octadecadienal	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O (264.246)	-	-	-	-	-	+	-
21.720	3-Isomangostin hydrate	C <sub>24</sub> H <sub>28</sub> O <sub>7</sub> (428.183)	-	+	-	-	-	-	-

ตารางที่ 24 (Continued)

RT	Compound Label	MFG Formula (Mass)	E-YaSP	T-YaSP	YaSP	CL	GM	OS	AC
2.686	3alpha-Hydroxy-4, 4- Podocarpatriene	C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> O (216.152)	-  Bisnor-	-	-	+	-	-	-  8,11,13-
2.146	4,11,13,15-Tetra hydroridentin B	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O <sub>4</sub> (268.168)	-	-	-	+	-	-	-
18.674	4-Hydroxy-3,5,4'- trimethoxystilbene	C <sub>17</sub> H <sub>18</sub> O <sub>4</sub> (286.121)	-	+	-	-	-	-	-
27.481	5-(1-hydroxypropan -2-yl)isolongifol	C <sub>18</sub> H <sub>30</sub> O (262.230)	-	-	-	-	-	+	-
19.013	5,7-Dihydroxy-3,6, 8,4'- tetramethoxyflavone	C <sub>31</sub> H <sub>38</sub> O <sub>18</sub> (698.208)	-	+	-	-	-	-	-
3.542	6'',6''-Dimethylpyrano [2'',3'':6',5']-2'-hydroxy -3,4,4'-trimethoxychalcone	C <sub>23</sub> H <sub>24</sub> O <sub>6</sub> (396.158)	-	-	-	-	+	-	-

ตารางที่ 24 (Continued)

RT	Compound Label	MFG Formula (Mass)	E-YaSP	T-YaSP	YaSP	CL	GM	OS	AC
22.476	6,8-Dihydroxy-1,7-diprenylxanthone-2-carboxylic acid	C <sub>24</sub> H <sub>24</sub> O <sub>6</sub> (408.158)	-	+	+	-	-	-	-
32.198	6E,9E-octadecadienoic acid	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub> (280.238)	-	-	-	-	-	+	+
2.196	6-Prenylisocaviunin	C <sub>24</sub> H <sub>26</sub> O <sub>8</sub> (442.162)	-	-	-	-	+	-	-
5.690	7-Hydroxy-3-(4-methoxyphenyl)-4-propyl-2H-1-benzopyran-2-one	C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> O <sub>4</sub> (310.120)	-	-	-	+	-	-	-
25.794	8-Hydroxygalangin 3-methyl ether 8-methylbutyrate	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>7</sub> (384.122)	-	-	-	-	-	+	-

ตารางที่ 24 (Continued)

RT	Compound Label	MFG Formula (Mass)	E-YaSP	T-YaSP	YaSP	CL	GM	OS	AC
32.199	8-methoxy-13-hydroxy-9,11-octadecadienoic acid	C <sub>19</sub> H <sub>34</sub> O <sub>4</sub> (326.246)	-	-	-	-	-	+	-
8.196	9,10-Epoxy-18-hydroxystearate	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>4</sub> (314.246)	-	-	-	-	-	+	-
31.723	9-Hydroxycalabaxanthone	C <sub>24</sub> H <sub>24</sub> O <sub>6</sub> (408.158)	+	-	-	-	+	-	-
15.301	9Z,12Z,15E-octadecatrienoic acid	C <sub>18</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub> (278.225)	-	-	-	-	-	+	-
2.688	Acorusdiol	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O <sub>3</sub> (252.172)	+	-	-	-	-	-	-
18.955	Alpha-12(13)-EpODE	C <sub>18</sub> H <sub>30</sub> O <sub>3</sub> (294.220)	-	-	-	-	-	+	-
18.166	Alpha-9(10)-EpODE	C <sub>18</sub> H <sub>30</sub> O <sub>3</sub> (294.220)	-	-	-	-	-	+	-
10.443	Alpha-mangostin	C <sub>24</sub> H <sub>26</sub> O <sub>6</sub> (410.173)	+	+	+	-	+	-	-

ตารางที่ 24 (Continued)

RT	Compound Label	MFG Formula (Mass)	E-YaSP	T-YaSP	YaSP	CL	GM	OS	AC
22.269	Ambonane	C <sub>19</sub> H <sub>16</sub> O <sub>5</sub> (324.100)	-	-	-	-	+	-	-
28.107	Amoritin	C <sub>31</sub> H <sub>38</sub> O <sub>6</sub> (506.266)	-	+	-	-	-	-	-
8.537	Amorphigenin	C <sub>23</sub> H <sub>22</sub> O <sub>7</sub> (410.137)	-	-	-	-	+	-	-
32.206	Anandamide (18:3, n-6)	C <sub>20</sub> H <sub>35</sub> NO <sub>2</sub> (321.267)	-	-	-	-	-	+	-
4.516	Archangelicin	C <sub>24</sub> H <sub>26</sub> O <sub>7</sub> (426.169)	+	-	-	-	+	-	-
1.606	Arecoline	C <sub>8</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub> (155.095)	+	-	-	-	-	-	+
31.730	Artonin K	C <sub>21</sub> H <sub>18</sub> O <sub>7</sub> (382.107)	+	-	-	-	+	-	-
28.304	Artonin V	C <sub>25</sub> H <sub>26</sub> O <sub>7</sub> (438.169)	-	+	-	-	-	-	-
3.168	Aurmillone	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>6</sub> (368.127)	+	-	-	+	-	-	-
7.964	Benzoylagmatine	C <sub>12</sub> H <sub>18</sub> N <sub>4</sub> O (234.147)	-	-	-	+	-	-	-
20.746	Beta-Dihydrorotenone	C <sub>23</sub> H <sub>24</sub> O <sub>6</sub> (396.158)	+	+	-	-	+	-	-

ตารางที่ 24 (Continued)

RT	Compound Label	MFG Formula (Mass)	E-YaSP	T-YaSP	YaSP	CL	GM	OS	AC
18.727	Bisdemethoxy-curcumin	C <sub>19</sub> H <sub>16</sub> O <sub>4</sub> (308.099)	+	-	+	+	-	-	-
21.214	BMPN-benzoic acid glucuronide	C <sub>21</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> (432.153)	-	+	-	-	-	-	-
16.186	C16 Sphinganine	C <sub>16</sub> H <sub>35</sub> NO <sub>2</sub> (273.266)	-	-	+	-	-	-	-
38.248	C-2 Ceramide	C <sub>20</sub> H <sub>39</sub> NO <sub>3</sub> (341.294)	-	-	-	-	-	+	-
8.557	Chavicol	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O (134.073)	+	-	-	-	-	-	-
2.160	Chlorovulone III	C <sub>20</sub> H <sub>28</sub> O <sub>5</sub> (348.193)	-	-	-	-	-	+	-
25.751	Cholesterol sulfate	C <sub>27</sub> H <sub>46</sub> O <sub>4</sub> S (466.311)	-	+	-	-	-	-	-
5.163	Cicutoxin	C <sub>17</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub> (258.161)	-	-	-	+	-	-	-
3.209	cis-12a-Hydroxyrot-2'-enonic acid	C <sub>23</sub> H <sub>24</sub> O <sub>7</sub> (412.151)	-	-	-	-	+	-	-
22.270	Coumestrol	C <sub>15</sub> H <sub>8</sub> O <sub>5</sub> (268.038)	-	-	-	-	+	-	-

ตารางที่ 24 (Continued)

RT	Compound Label	MFG Formula (Mass)	E-YaSP	T-YaSP	YaSP	CL	GM	OS	AC
7.968	Curcumenol	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub> (234.162)	+	-	-	+	-	-	-
6.983	Curcumin	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>6</sub> (368.127)	+	+	+	+	-	-	-
4.294	Cycloartomunin	C <sub>26</sub> H <sub>24</sub> O <sub>7</sub> (448.151)	+	-	-	-	-	-	-
6.831	Cyperolone	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub> (236.178)	-	-	-	+	-	-	-
24.871	Dehydrodihydro- tenone	C <sub>23</sub> H <sub>22</sub> O <sub>6</sub> (394.142)	+	-	-	-	+	-	-
6.343	Demethoxycurcumin	C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> O <sub>5</sub> (338.115)	+	-	+	+	-	-	-
19.264	Demethyltexasin	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> (270.053)	-	-	-	-	+	-	-
2.889	Desmethyldehydro- nifedipine	C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> (330.085)	+	-	-	-	-	-	-
4.818	Diethyltoluamide	C <sub>12</sub> H <sub>17</sub> NO (191.131)	-	-	-	-	-	+	-
19.903	Dihydroisoalantolactone	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub> (234.161)	-	+	+	-	-	-	-

ตารางที่ 24 (Continued)

RT	Compound Label	MFG Formula (Mass)	E-YaSP	T-YaSP	YaSP	CL	GM	OS	AC
24.779	Dihydro-Omethyl sterigmatocystin	C <sub>19</sub> H <sub>16</sub> O <sub>6</sub> (340.095)	-	+	-	-	-	-	-
24.763	Dihydrorotenone	C <sub>23</sub> H <sub>24</sub> O <sub>6</sub> (396.157)	-	-	+	-	-	-	-
15.803	Disenecionyl cis- khellactone	C <sub>24</sub> H <sub>26</sub> O <sub>7</sub> (426.168)	-	-	-	-	+	-	-
23.844	Disuccinimidyl Suberate	C <sub>16</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> (368.121)	-	+	-	-	-	-	-
27.931	Dulciol B	C <sub>28</sub> H <sub>32</sub> O <sub>6</sub> (464.221)	+	-	-	-	+	-	-
21.033	Eicosanedioic acid	C <sub>20</sub> H <sub>38</sub> O <sub>4</sub> (342.277)	-	-	-	-	-	+	-
20.822	Emmotin A	C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub> (278.152)	-	-	-	-	-	+	-
22.214	Exiguaflavanone M	C <sub>25</sub> H <sub>30</sub> O <sub>7</sub> (442.200)	-	-	-	-	+	-	-
5.302	Farfugin A	C <sub>15</sub> H <sub>18</sub> O (214.136)	-	-	-	+	-	-	-
27.454	Fructoselysine	C <sub>12</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub> (308.159)	-	-	-	-	-	-	+



ตารางที่ 24 (Continued)

RT	Compound Label	MFG Formula (Mass)	E-YaSP	T-YaSP	YaSP	CL	GM	OS	AC
17.962	Furodysin	C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> O (216.151)	+	-	-	-	-	-	-
17.961	Galactosylglycerol	C <sub>9</sub> H <sub>18</sub> O <sub>8</sub> (254.099)	-	-	-	+	-	-	-
3.433	Ganoderic acid beta	C <sub>30</sub> H <sub>44</sub> O <sub>6</sub> (500.315)	+	-	-	-	-	-	-
22.275	Garcinone A	C <sub>23</sub> H <sub>24</sub> O (380.163)	+	-	-	-	+	-	-
28.295	Garcinone E	C <sub>28</sub> H <sub>32</sub> O <sub>6</sub> (464.221)	-	+	-	-	-	-	-
22.469	Gedunin	C <sub>28</sub> H <sub>34</sub> O <sub>7</sub> (482.231)	-	-	-	-	+	-	-
24.608	Genistein	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> (270.054)	-	+	-	-	-	-	-
5.024	Gingerol	C <sub>17</sub> H <sub>26</sub> O <sub>4</sub> (294.183)	-	-	-	+	-	-	-
3.039	Glycyrrhisoflavanone	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>6</sub> (368.126)	-	-	-	+	-	-	-
2.750	Glyinflanin H	C <sub>19</sub> H <sub>16</sub> O <sub>4</sub> (308.104)	+	-	+	-	-	-	-
32.833	Heneicosanedioic acid	C <sub>21</sub> H <sub>40</sub> O <sub>4</sub> (356.293)	-	-	-	-	-	+	-
9.868	Heteroflavanone C	C <sub>23</sub> H <sub>26</sub> O <sub>7</sub> (414.167)	-	-	-	-	+	-	-

ตารางที่ 24 (Continued)

RT	Compound Label	MFG Formula (Mass)	E-YaSP	T-YaSP	YaSP	CL	GM	OS	AC
20.792	Ishwarol	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O (220.183)	-	-	-	+	-	-	-
1.903	Isoathyriol	C <sub>14</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub> (274.047)	-	-	-	-	+	-	-
9.852	Laxiflorin	C <sub>23</sub> H <sub>26</sub> O <sub>7</sub> (414.169)	+	-	-	-	+	-	-
3.019	Lepidine D	C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> (346.144)	+	-	-	-	-	-	-
19.180	Limonen-6-ol -pivalate	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub> (236.178)	-	+	-	-	-	-	-
38.245	Linoleoyl Ethanolamide	C <sub>20</sub> H <sub>37</sub> NO <sub>2</sub> (323.284)	-	-	-	-	-	+	-
35.033	Lupiniol A1	C <sub>25</sub> H <sub>28</sub> O <sub>6</sub> (424.190)	+	-	-	-	+	-	-
6.924	Luteolin 7,3',4' -trimethyl ether	C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> O <sub>6</sub> (328.094)	-	-	-	-	+	-	-
22.672	Mallotochromene	C <sub>24</sub> H <sub>26</sub> O <sub>8</sub> (442.162)	-	+	-	-	-	-	-
17.624	Mangostenol	C <sub>24</sub> H <sub>26</sub> O <sub>7</sub> (426.168)	-	+	-	-	-	-	-

ตารางที่ 24 (Continued)

RT	Compound Label	MFG Formula (Mass)	E-YaSP	T-YaSP	YaSP	CL	GM	OS	AC
25.894	Mangostinone	C <sub>23</sub> H <sub>24</sub> O <sub>5</sub> (380.162)	-	+	-	-	-	-	-
3.233	Melledonal A	C <sub>23</sub> H <sub>28</sub> O <sub>8</sub> (432.177)	-	-	-	-	+	-	-
15.529	Methyl tanshinonate	C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> O <sub>5</sub> (338.116)	-	+	+	-	-	-	-
20.746	Methylophiopogonone A	C <sub>19</sub> H <sub>16</sub> O <sub>6</sub> (340.096)	+	-	-	-	+	-	-
8.110	Methylophiopogonone B	C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> O <sub>5</sub> (326.115)	-	-	-	-	+	-	-
27.859	Mycolipanic acid	C <sub>24</sub> H <sub>48</sub> O <sub>3</sub> (384.359)	-	-	-	-	-	-	+
15.186	Myristicanol B	C <sub>22</sub> H <sub>28</sub> O <sub>7</sub> (404.185)	-	-	+	-	-	-	-
36.398	N-Cyclohexanecarbo nylpentadecylamine	C <sub>22</sub> H <sub>43</sub> NO (337.336)	+	-	-	-	+	+	+
27.858	N-Despropylpergolide	C <sub>16</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> S (272.135)	-	+	-	-	-	-	-
6.537	Neorautenanol	C <sub>21</sub> H <sub>18</sub> O <sub>6</sub> (366.109)	-	-	-	-	+	-	-
1.586	Nigerose (Sakebiose)	C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub> (342.116)	-	-	-	-	-	+	-

ตารางที่ 24 (Continued)

RT	Compound Label	MFG Formula (Mass)	E-YaSP	T-YaSP	YaSP	CL	GM	OS	AC
6.374	Penaresidin B	C <sub>19</sub> H <sub>39</sub> NO <sub>3</sub> (329.292)	-	-	-	-	-	+	-
29.202	Phe4Cl-TyrMe-OH	C <sub>24</sub> H <sub>21</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>7</sub> (484.103)	-	-	+	-	-	-	-
4.152	Phytosphingosine	C <sub>18</sub> H <sub>39</sub> NO <sub>3</sub> (317.292)	-	-	-	-	-	+	-
11.496	Pipenzolate	C <sub>22</sub> H <sub>28</sub> NO <sub>3</sub> (354.207)	-	-	-	-	-	-	+
24.871	Ponganone IV	C <sub>23</sub> H <sub>24</sub> O <sub>6</sub> (396.157)	-	-	-	-	+	-	-
17.148	Ponganone VIII	C <sub>24</sub> H <sub>26</sub> O <sub>7</sub> (426.167)	-	+	-	-	+	-	-
29.353	Prebarbigerone	C <sub>24</sub> H <sub>26</sub> O <sub>6</sub> (410.172)	-	-	-	-	+	-	-
1.690	Procyanidin B1	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>12</sub> (578.140)	-	-	-	-	-	-	+
11.547	Pseudorhodomyrtxin	C <sub>24</sub> H <sub>28</sub> O <sub>7</sub> (428.184)	+	-	-	-	+	-	-
24.859	Psorospermin	C <sub>19</sub> H <sub>16</sub> O <sub>6</sub> (340.095)	-	-	-	-	+	-	-
22.921	Reserpine	C <sub>33</sub> H <sub>40</sub> N <sub>2</sub> O <sub>9</sub> (608.273)	-	+	-	-	-	-	-

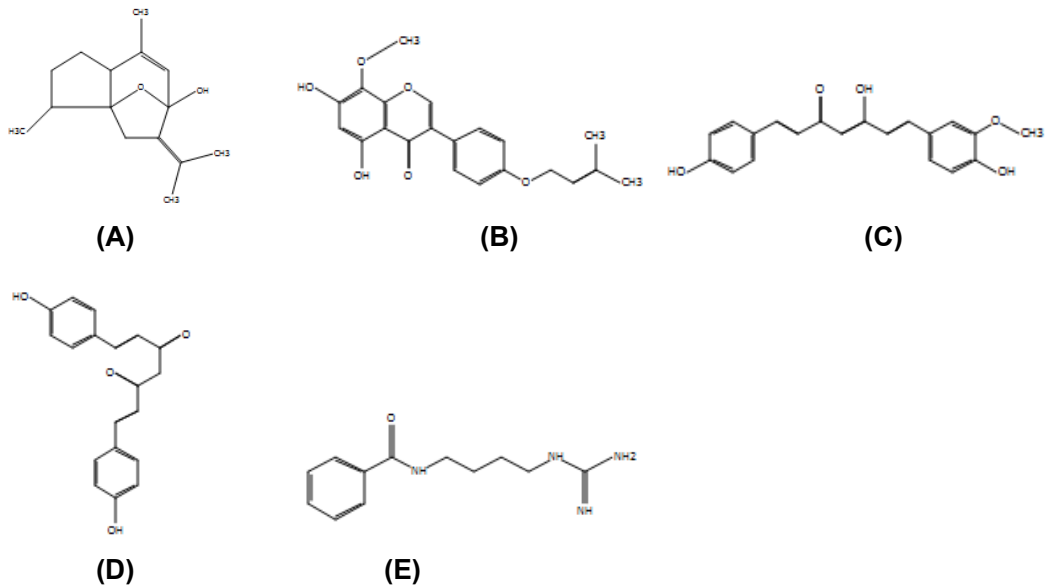
ตารางที่ 24 (Continued)

RT	Compound Label	MFG Formula (Mass)	E-YaSP	T-YaSP	YaSP	CL	GM	OS	AC
25.543	Scarlet Red	C <sub>24</sub> H <sub>20</sub> N <sub>4</sub> O (380.164)	-	+	-	-	-	-	-
6.578	Senecrassidiol 6-Acetate	C <sub>17</sub> H <sub>28</sub> O <sub>3</sub> (280.204)	+	-	-	-	-	-	-
27.478	SQDG (16:0/16:1(9Z))	C <sub>41</sub> H <sub>76</sub> O <sub>12</sub> S (792.507)	-	-	-	-	-	+	-
33.375	Stearoylethanolamide	C <sub>20</sub> H <sub>41</sub> NO <sub>2</sub> (327.312)	-	-	-	-	-	-	+
28.124	Stigmatellin Y	C <sub>29</sub> H <sub>40</sub> O <sub>6</sub> (484.283)	-	-	+	-	-	-	-
2.963	Sugetriol	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O <sub>3</sub> (252.171)	+	-	-	-	-	-	-
17.206	Syringomethyl Reserpate	C <sub>32</sub> H <sub>38</sub> N <sub>2</sub> O <sub>9</sub> (594.260)	+	-	-	-	-	-	-
12.968	Taxodione	C <sub>20</sub> H <sub>26</sub> O <sub>3</sub> (314.189)	-	-	-	-	-	+	-
3.979	Triethyl citrate	C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> O <sub>7</sub> (276.121)	-	-	-	-	-	+	-

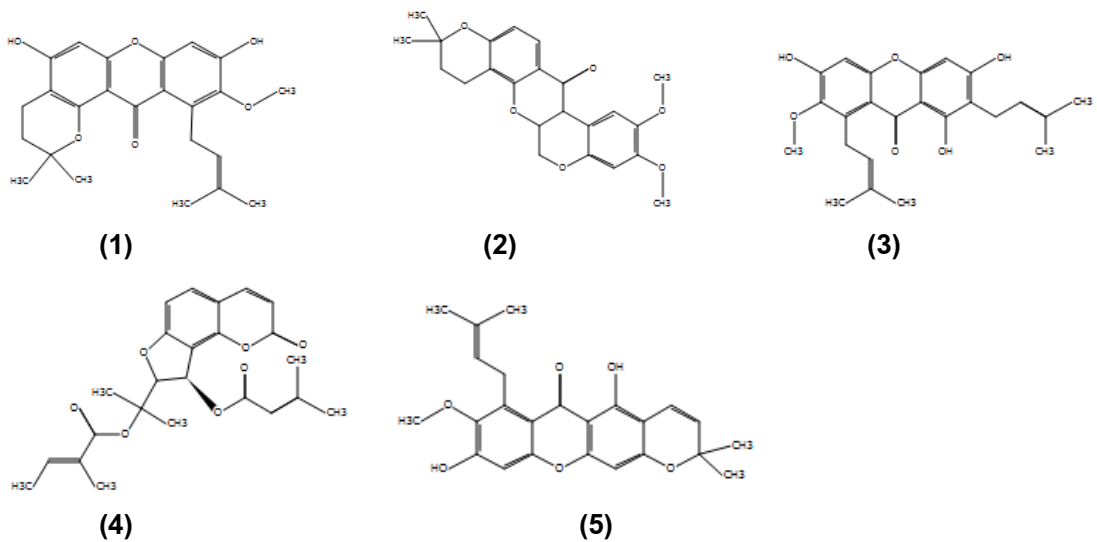
ตารางที่ 24 (Continued)

RT	Compound Label	MFG Formula (Mass)	E-YaSP	T-YaSP	YaSP	CL	GM	OS	AC
25.008	Verimol C	C <sub>18</sub> H <sub>20</sub> O <sub>4</sub> (300.136)	-	+	+	-	-	-	-
1.554	Viscutin 1	C <sub>27</sub> H <sub>26</sub> O <sub>11</sub> (526.149)	-	-	-	-	-	+	-
6.687	Xanthohumol D	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>6</sub> (370.142)	-	-	-	+	-	-	-

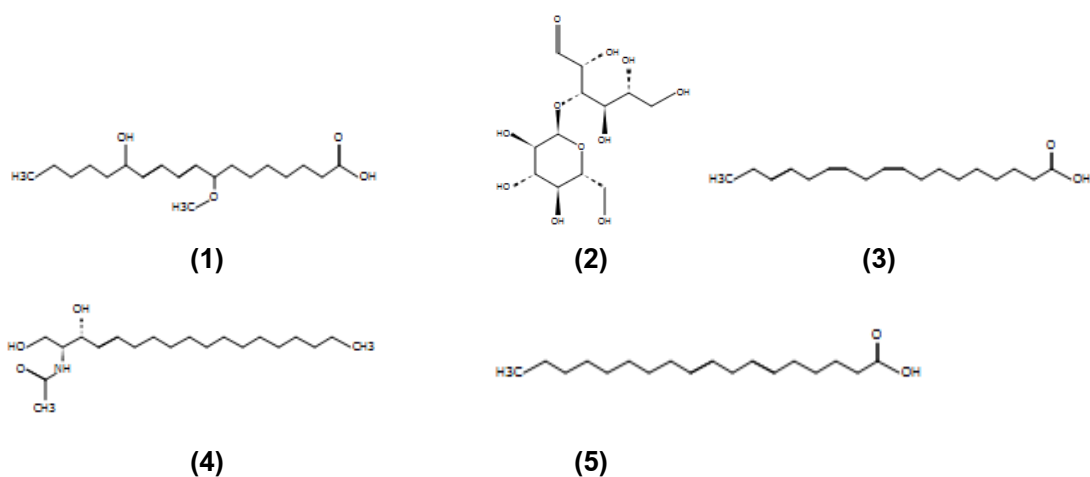
Abbreviations: Ethanol extracted of Ya-Samarn-Phlae (E-YaSP); Traditionally prepared-Ya-Samarn-Phlae (T-YaSP); Ointment base for Ya-Samarn-Phlae tulle-gras dressings (YaSP); *Curcuma longa* (CL); *Garcinia mangostana* (GM); *Oryza sativa* (OS) and *Areca catechu* (AC).



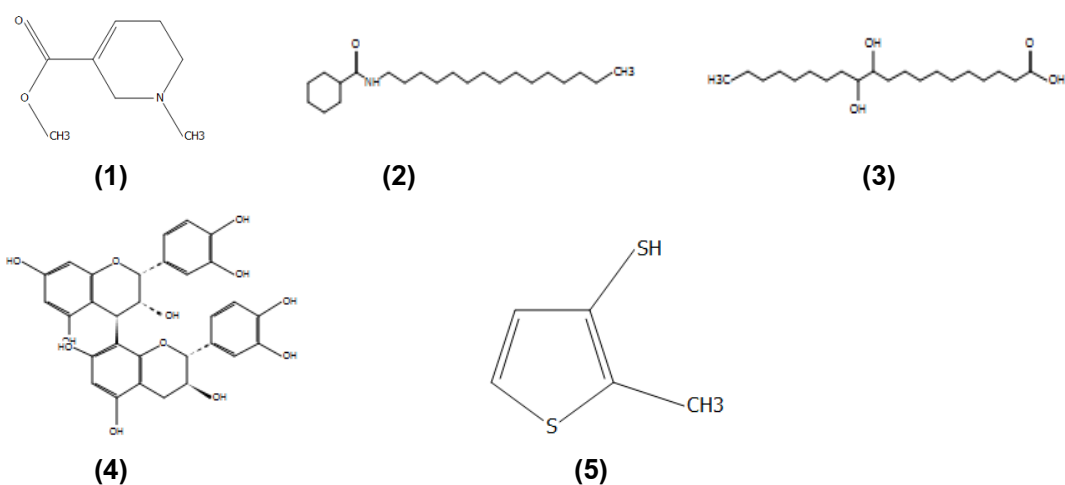
រូបភាព 34 The structures of the identified 5 compounds in ethanol extract from *Curcuma longa* L., including curcumenol (A), aurrillone (B), demethoxycurcumin (C), bisdemethoxycurcumin (C) and benzoylagmatine (E).



រូបភាព 35 The structures of the identified 5 compounds in ethanol extract from *Garcinia mangostana* L., including 1-isomangostin (1), beta-dihydrorotenone (2), alpha-mangostin (3), archangelicin (4) և 9-hydroxycalabaxanthone (5).

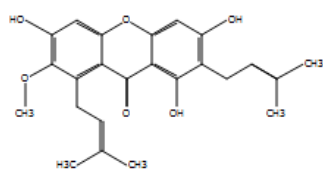


**រូបភាព 36** The structures of the identified 5 compounds in ethanol extract from *Oryza sativa* L., including 8-methoxy-13-hydroxy-9,11-octadecadienoic acid (A), nigerose (sakebiose) (B), 9Z,12Z,15E-octadecatrienoic acid (C), C-2 ceramide (D) and 6E,9E-octadecadienoic acid (E).

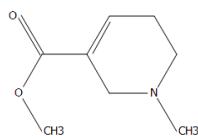


**រូបភាព 37** The structures of the identified 5 compounds in ethanol extract from *Areca catechu* L., including arecoline (1), N-cyclohexanecarbonylpentadecylamine (2), procyanidin B1 (3), 11,12-dihydroxy arachidic acid (4) and 2-Methyl-3-thiophenethiol (5).

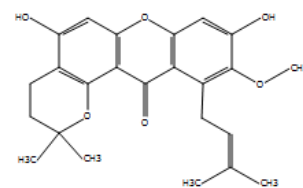




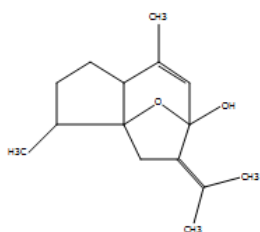
(1)



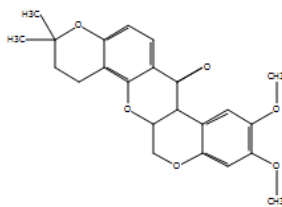
(2)



(3)

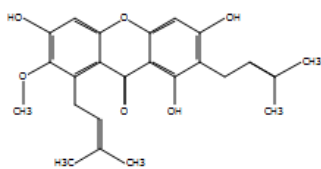


(4)

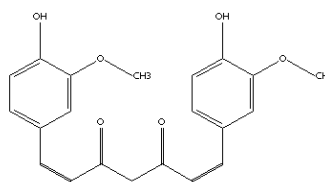


(5)

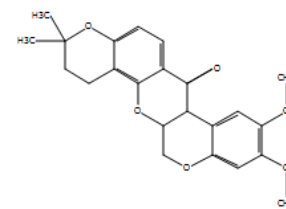
**រូបភាព 38** The structures of the identified 5 compounds in ethanol extract from Ya-Samarn-Phlae, including alpha-mangostin (1), arecoline (2), 1-isomangostin (3), curcumenol (4) and beta-dihydrorotenone (5).



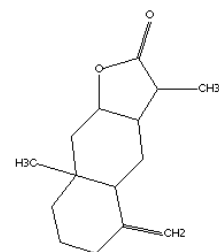
(1)



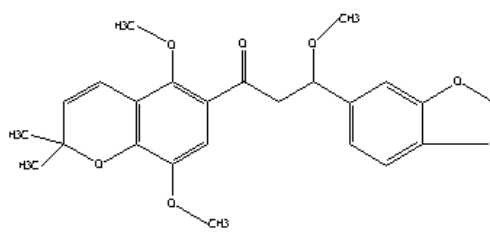
(2)



(3)



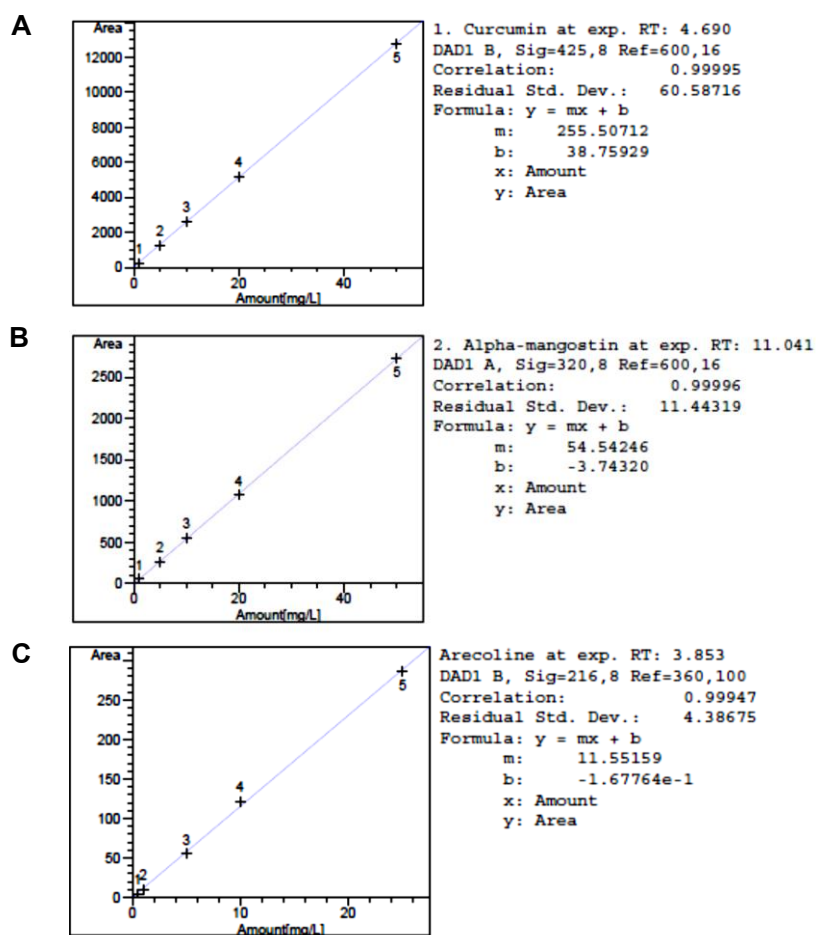
(4)



(5)

**រូបភាព 39** The structures of the identified 5 compounds in T-YaSP including alpha-mangostin (1), curcumin (2), beta-dihydrorotenone (3), dihydroisoalantolactone (4) and ponganone VIII (5).





រូបភាព 41 HPLC calibration curve of curcumin (A), alpha-mangostin (B) and arecoline (C).

## ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นางสาวสินีนางู สันพินิจ

รหัสประจำตัวนักศึกษา 5911430003

## วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
การแพทย์แผนไทยบัณฑิต	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2556
การแพทย์แผนไทยมหาบัณฑิต	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2558

## ทุนการศึกษา

โครงการการสร้างภาคีในการผลิตบัณฑิตระดับปริญญาโท-เอก ระหว่างสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) กับสถาบันการศึกษา ประจำปี 2559

## การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

Sanpinit S., Thisyakorn K. and Chusri S. 2018. Topical application of Ya-Samarn-Phlae ointment promote wound healing in spontaneously diabetic rats (GK/Jcl): A preliminary study. The Thai Journal of Pharmaceutical Sciences. 42, 76-79.

Chokpaisarn J., Yincharoen K., Sanpinit S., Pandian STK., Nandhini JR., Gowrishankar S. et al. 2019. Effects of a traditional Thai polyherbal medicine 'Ya-Samarn-Phlae' as a natural antibiofilm agent against *Pseudomonas aeruginosa*. Microbial Pathogenesis. 128, 354-362.

