ผลของการให้ผงว่านหางจระเข้ทางปากร่วมกับการปลูกถ่ายเซลล์เอนโดทีเลียมโปรเจนนิเตอร์ของมนุษย์ต่อการหายของแผลในหนูนูดไมซ์ที่เป็นเบาหวาน

น.ส.สุพัสนันท์ แก้วศรีสังข์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาสรีรวิทยา สหสาขาวิชาสรีรวิทยา
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2561
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

EFFECTS OF ALOE VERA POWDER ORAL ADMINISTRATION AND HUMAN ENDOTHELIAL PROGENITOR CELL TRANSPLANTATION ON WOUND HEALING OF DIABETIC NUDE MICE.

Miss Supassanan Kaewsrisung

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science in Physiology

Inter-Department of Physiology

Graduate School

Chulalongkorn University

Academic Year 2018

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ผลของการให้ผงว่านหางจระเข้ทางปากร่วมกับการปลูกถ่ายเซลล์เอนโดทีเลียมโปรเจนนิเตอร์ ของมนุษย์ต่อการหายของแผลในหนูนูดไมซ์ที่เป็นเบาหวาน
โดย	น.ส.สุพัสนันท์ แก้วศรีสังข์
สาขาวิชา	สรีรวิทยา
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ศาสตราจารย์ แพทย์หญิงจุไรพร สมบุญวงค์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ศาสตราจารย์ ดร.สุทธิลักษณ์ ปทุมราช ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นายแพทย์นิพัญจน์ อิศรเสนา ณ อยุธยา

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.ธรรมนูญ หนูจักร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ธงชัย สุขเศวต)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ศาสตราจารย์ แพทย์หญิงจุไรพร สมบุญวงค์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ศาสตราจารย์ ดร.สุทธิลักษณ์ ปทุมราช)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นายแพทย์นิพัญจน์ อิศรเสนา ณ อยุธยา)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ปิติ จันทร์วรโชติ)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อัมพร จาริยะพงศ์สกุล)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สุพัสนันท์ แก้วศรีสังข์ : ผลของการให้ผงว่านหางจระเข้ทางปากร่วมกับการปลูกถ่ายเซลล์เอนโดทีเลียมโปรเจนนิเตอร์ ของมนุษย์ต่อการหายของแผลในหนูนูดไมซ์ที่เป็นเบาหวาน. (EFFECTS OF ALOE VERA POWDER ORAL ADMINISTRATION AND HUMAN EN DOTHELIAL PROGENITOR CELL TRANSPLANTATION ON WOUND HEALING O F DIABETIC NUDE MICE.) อ.ที่ปรึกษาหลัก : ศ. พญ.จุไรพร สมบุญวงค์, อ.ที่ปรึกษาร่วม : ศ. ดร.สุทธิลักษณ์ ปทุมราช,ผศ. ดร.นพ.นิพัญจน์ อิศรเสนา ณ อยุธยา

การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการหายของแผลและการเกิดหลอดเลือดใหม่ในหนูนูดไมซ์ที่เป็นเบาหวานหลังจากให้กินว่านหางจระเข้ร่วมกับการปลูกถ่าย EPCs โดยแบ่งหนูเป็น 5 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มควบคุม กลุ่มเบาหวาน กลุ่มเบาหวานที่ได้รับเซลล์เอนโดทีเลียมโปรเจนนิเตอร์ (1×10^6 เซลล์) บริเวณแผล กลุ่มเบาหวานที่ได้รับว่านหางจระเข้ 400 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมต่อวันทางปาก และกลุ่มเบาหวานที่ได้รับเซลล์เอนโดทีเลียมโปรเจนนิเตอร์ (1×10^6 เซลล์) บริเวณแผลร่วมกับการกินว่านหางจระเข้ 400 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมต่อวัน ทำการเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานด้วยสารสเตรปโตโซโตซิน 45 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมทางช่องท้องวันละครั้งติดต่อกันห้าวัน เมื่อครบ 10 สัปดาห์หลังจากเหนี่ยวนำให้หนูเป็นเบาหวาน หนูแต่ละกลุ่มถูกทำให้เกิดแผลชนิดที่ถูกตัดจนถึงชั้นไขมันที่บริเวณผิวหนังทั้งสองข้างจากแนวหลังของหนู ขนาด 0.6×0.6 ตารางเซนติเมตร ในวันที่ 7 และ 14 หลังทำให้เกิดแผล ทำการศึกษาระดับน้ำตาลในเลือดด้วยเครื่องกลูโคมิเตอร์ วัดขนาดแผลและวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Image Pro Plus 6.1 วัดการไหลเวียนของเลือดบริเวณแผลด้วยเครื่องเลเซอร์ดอปเปลอร์โฟลมิเตอร์ ศึกษาการเกิดหลอดเลือดใหม่ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบคอนโฟคอลโดยใช้แสงฟลูออเรสเซ็นต์ ศึกษาการเกิด re-epithelialization ด้วยการย้อมฮีมาท้อกซิลินและอีโอซิน และวัดระดับ VEGF ที่แผลด้วยวิธี ELISA ผลการทดลองพบว่า ทั้งในวันที่ 7 และ 14 หลังทำให้เกิดแผล ค่าระดับน้ำตาลในเลือดของหนูลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติหลังจากได้รับว่านหางจระเข้ กลุ่มที่ได้รับการรักษาด้วยการปลูกถ่ายเซลล์เอนโดทีเลียมโปรเจนนิเตอร์ร่วมกับการกินว่านหางจระเข้ มีการเพิ่มขึ้นของการปิดของแผล การไหลเวียนของเลือดบริเวณแผล การเกิดหลอดเลือดใหม่ การเกิด re-epithelialization และระดับ VEGF อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มเบาหวานที่ไม่ได้รับการรักษา นอกจากนี้ในวันที่ 14 กลุ่มที่ได้รับการรักษาร่วมกันมีการเพิ่มขึ้นของการไหลเวียนของเลือดบริเวณแผลและการเกิดหลอดเลือดใหม่อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับการรักษาด้วย EPCs หรือ Aloe เพียงอย่างเดียว ดังนั้นการศึกษานี้อาจเป็นประโยชน์และเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการรักษาแผลเบาหวานได้

สาขาวิชา สรีรวิทยา ลายมือชื่อนิสิต .....

ปีการศึกษา 2561 ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก .....

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม .....

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม .....

5987217520 : MAJOR PHYSIOLOGY

KEYWORD: Aloe vera, Wound healing, Angiogenesis, Endothelial progenitor cells, Diabetes mellitus

Supassanan Kaewsrisung :

EFFECTS OF ALOE VERA POWDER ORAL ADMINISTRATION AND HUMAN EN DOTHELIAL PROGENITOR CELL TRANSPLANTATION ON WOUND HEALING O F DIABETIC NUDE MICE.. Advisor: Prof. JURAIPORN SOMBOONWONG, M.D. Co-advisor: Prof. SUTHILUK PATUMRAJ, Ph.D.,Asst. Prof. NIPAN ISRASENA, M.D.,Ph.D.

The study aimed to examine the effect of combined treatment with endothelial progenitor cells (EPCs) transplantation and *Aloe vera* oral administration on wound healing and angiogenesis in diabetic mice. Balb/c nude mice were divided into five groups: control group, diabetic group (DM), DM implanted with 1×10^6 cells EPCs group, DM treated with oral *Aloe vera* gel 400 mg/kg/day group and DM treated with combined 1×10^6 cells EPCs and 400 mg/kg/day of *Aloe vera* oral administration group. Diabetes was induced by daily injection of streptozotocin (45 mg/kg, i.p.) for 5 days. Ten weeks after diabetic induction, bilateral full-thickness excision skin wounds (0.6×0.6 cm^2) were created. On day 7 and day 14 post wounding, hypoglycemic effects were detected using glucometer and wound area was analyzed using digital image software (Image Pro Plus). Skin blood perfusion was measured using laser doppler flowmetry and capillary vascularity in the wound bed was determined using confocal fluorescence microscopy. Re-epithelialization was determined in hematoxylin eosin stained and wound tissue VEGF levels was detected by ELISA. The results showed that blood glucose levels were decreased significant after *Aloe vera* treatment. The percentage of wound closure, blood perfusion, capillary vascularity and re-epithelialization were significantly higher in DM treated with combined EPCs and *Aloe vera* oral administration group than the untreated group. ($P<0.05$) Moreover, on day 14 blood flow and capillary vascularity in DM treated with combined group were higher than those treated with EPCs or *Aloe vera* alone. Therefore, this study may be useful and alternative treatment for diabetic ulcers in the future.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Field of Study: Physiology

Academic Year: 2018

Student's Signature .....

Advisor's Signature .....

Co-advisor's Signature .....

Co-advisor's Signature .....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความกรุณาจาก ศ.พญ.จุไรพร สมบุญวงค์ อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก ที่สละเวลาให้คำปรึกษา ความคิดเห็น และแง่คิดที่เป็นประโยชน์ ทั้งยังเป็นแรงผลักดัน ส่งเสริมความคิดเชิงบวก รวมไปถึงเป็นผู้ตรวจทานแก้ไขทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงมา ณ ที่นี้ รวมไปถึง ศ.ดร.สุทธิลักษณ์ ปทุมราช และ ผศ.ดร.นพ.นิพัญจน์ อิศรเสนา ณ อยุธยา อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่ให้คำปรึกษา ความช่วยเหลือ และข้อคิดต่างๆที่มีประโยชน์มากระหว่างดำเนินการวิจัย

ขอขอบคุณ รศ.ภก.ดร.ธงชัย สุขเสวต รศ.ภก.ดร.ปิติ จันทร์วรโชติ และ ผศ.ดร.อัมพร จาริยะพงศ์สกุล ที่ให้เกียรติเป็นประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์และกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้

ขอขอบคุณ นางสาวศุภกานดา สุขแพทย์ สำหรับคำแนะนำและความช่วยเหลือในการทำวิจัยให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี รวมถึงพี่ๆเพื่อนๆภาควิชาสรีรวิทยาทุกคน ที่ให้กำลังใจและช่วยเหลือกันเป็นอย่างดีตลอดระยะเวลาที่ผ่านมา

ขอขอบคุณ นางสาวเนตรชนก ลีลาอดิศร และศูนย์วิจัยสเต็มเซลล์และเซลล์บำบัด คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความช่วยเหลือเรื่อง stem cell ในงานวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณทุนโครงการวิจัยเงินอุดหนุนทั่วไปจากรัฐบาล และทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (RA61/090)

สุพัสนันท์ แก้วศรีสังข์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ง
กิตติกรรมประกาศ ..... จ
สารบัญ ..... ฉ
สารบัญตาราง ..... ฌ
สารบัญรูปภาพ ..... ญ
สารบัญคำย่อ ..... ฐ
บทที่ 1 บทนำ 1
ที่มาและความสำคัญของปัญหา 1
คำถามการวิจัย 2
วัตถุประสงค์ของการวิจัย 3
สมมติฐานของการวิจัย 3
กรอบแนวคิดในการวิจัย 3
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง 4
โรคเบาหวาน (Diabetes mellitus) 4
พยาธิสรีรวิทยาของการเกิดภาวะแทรกซ้อนในผู้ป่วยเบาหวาน (Pathophysiology of diabetic complications) 5
กลไกการเกิดภาวะแทรกซ้อนของหลอดเลือดขนาดเล็กและหลอดเลือดขนาดใหญ่ 5
การหายของแผล (Wound healing) 10
การหายของแผลเบาหวาน 12
แนวทางการรักษาแผลเบาหวาน 12

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Endothelial progenitor cells (EPCs) และบทบาทในการรักษาแผลเบาหวาน.....13
ว่านหางจระเข้ (*Aloe vera*) และบทบาทในการรักษาแผล.....16
กลไกการออกฤทธิ์ของ Aloe vera ต่อการหายของแผล.....18
บทบาทของ Aloe vera ต่อการสร้างหลอดเลือดใหม่ของ endothelial cell.....19
บทบาทของ Vascular endothelial growth factor (VEGF) ต่อการหายของแผลเบาหวาน.....19
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....21
สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง.....21
สัตว์ทดลอง.....21
การแบ่งกลุ่มสัตว์ทดลอง.....21
การเหนี่ยวนำหนูให้เป็นเบาหวานชนิดที่ 1.....25
การเตรียมเซลล์ EPCs (สำหรับ implant ใน wound).....25
การเตรียม Aloe vera.....26
การทำให้เกิดแผลชนิด full-thickness wound model.....26
วิธีการเก็บและวิเคราะห์ข้อมูล.....27
1) ตรวจวัดระดับน้ำตาลในเลือด (Blood glucose levels).....27
2) ศึกษาการปิดของแผล (Wound closure analysis).....27
4) ศึกษาการเกิดหลอดเลือดใหม่บริเวณแผล (Wound angiogenesis).....28
5) ศึกษาทางด้านพยาธิวิทยา (Histopathological study).....30
6) วัดระดับของ VEGF จากเนื้อเยื่อแผลโดยวิธี Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).....31
การวิเคราะห์ข้อมูล (Data analysis).....33
บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล.....34
ผลระดับน้ำตาลในเลือด (Blood glucose levels).....34
ผลการปิดของแผล (Percentage of wound closure).....37

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ผลการไหลเวียนของเลือดบริเวณแผล (Wound blood perfusion) 40
ผลการเกิดหลอดเลือดใหม่ (Angiogenesis) 43
ผลการสร้างเยื่อบุผิวขึ้นมาใหม่ (Re-epithelialization) 46
ผลของระดับ VEGF จากชิ้นเนื้อบริเวณแผล 50
ความสัมพันธ์ของระดับน้ำตาลในเลือด การเกิดหลอดเลือดใหม่ การไหลเวียนของเลือด และระดับ VEGF 53
บทที่ 5 สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ 55
ผลต่อการลดระดับน้ำตาลในเลือด 55
ผลต่อการเกิดหลอดเลือดใหม่และการไหลเวียนของเลือดบริเวณแผล 56
ผลต่อระดับ VEGF 57
ผลต่อการเกิด Re-epithelialization และการปิดของแผล 58
กลไกของผลการให้ว่านหางจระเข้ร่วมกับการปลูกถ่าย EPCs ต่อการเกิดหลอดเลือดใหม่และกระบวนการหายของแผลในหนูที่เป็นเบาหวาน 58
บรรณานุกรม 62
ประวัติผู้เขียน 69

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 ตัวอย่างงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการรักษาแผลด้วย EPCs ในสัตว์ทดลอง 15

ตารางที่ 2 แสดงตัวอย่างงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการรักษาแผลด้วยว่านหางจระเข้ทั้งในสัตว์ทดลองและในคน 17

ตารางที่ 3 แสดงค่าดูดกลืนแสงที่อ่านได้สำหรับนำไปวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน 32

ตารางที่ 4 ระดับน้ำตาลในเลือดของหนูเบาหวานในวันที่ 7 และวันที่ 14 หลังจากให้กินว่านหางจระเข้ ปลูกถ่าย EPCs หรือได้รับร่วมกัน.....35

ตารางที่ 5 แสดงค่า Means ± SD ของผลการปิดของแผลในวันที่ 7 และวันที่ 14 ในหนูเบาหวานที่ให้กินว่านหางจระเข้ ปลูกถ่าย EPCs หรือได้รับร่วมกัน.....38

ตารางที่ 6 แสดงค่า Means ± SD ของการไหลเวียนของเลือดบริเวณแผลในวันที่ 7 และ วันที่ 14 ในหนูเบาหวานที่ให้กินว่านหางจระเข้ ปลูกถ่าย EPCs หรือได้รับร่วมกัน 41

ตารางที่ 7 แสดงค่า Means ± SD ของการเกิดหลอดเลือดใหม่บริเวณแผลในวันที่ 7 และ วันที่ 14 ในหนูเบาหวานที่ให้กินว่านหางจระเข้ ปลูกถ่าย EPCs หรือได้รับร่วมกัน.....44

ตารางที่ 8 แสดงค่า Means ± SD ของร้อยละเยื่อบุผิวที่ขึ้นมาใหม่บริเวณแผล (% re-epithelialization) ในวันที่ 7 และ วันที่ 14 ในหนูเบาหวานที่ให้กินว่านหางจระเข้ ปลูกถ่าย EPCs หรือได้รับร่วมกัน 48

ตารางที่ 9 แสดงค่า Means ± SD ของระดับ VEGF จากชิ้นเนื้อบริเวณแผล ในวันที่ 7 และ วันที่14 ในหนูเบาหวานที่ให้กินว่านหางจระเข้ ปลูกถ่าย EPCs หรือ ได้รับร่วมกัน.....51

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญรูปภาพ

หน้า

รูปที่ 1 แสดงภาพรวมกลไกของภาวะระดับกลูโคสในเลือดสูงที่เหนี่ยวนำให้เกิดของความเสียหายของเซลล์ 6

รูปที่ 2 แสดงภาวะระดับน้ำตาลในเซลล์สูง เพิ่ม polyol pathway flux.....7

รูปที่ 3 แสดงกลไกการผลิตที่เพิ่มขึ้นของสารตั้งต้น AGEs ภายในเซลล์.....8

รูปที่ 4 แสดงผลจากภาวะระดับน้ำตาลในเซลล์สูงที่เหนี่ยวนำให้เกิดการกระตุ้น PKC.....9

รูปที่ 5 แสดงภาวะระดับน้ำตาลในเซลล์สูงเพิ่มการทำงานของ hexosamine pathway 10

รูปที่ 6 แสดงวิธีคำนวณหาขนาดตัวอย่างทั้งหมดจากโปรแกรม G*Power 22

รูปที่ 7 แสดงแผนภาพการออกแบบการทดลอง 24

รูปที่ 8 แสดงรูปร่างของ HUVECs ในระหว่างการเลี้ยงเซลล์ด้วยภาพกำลังขยาย 100 เท่า.....25

รูปที่ 9 แสดงการทำให้หนูเกิดแผลชนิด full-thickness excisional wound ขนาด 0.6×0.6 cm^2 26

รูปที่ 10 แสดงวิธีการวัดขนาดพื้นที่แผลด้วยโปรแกรม Image Pro Plus 6.1.....27

รูปที่ 11 แสดงการวัดการไหลเวียนของเลือดและนำไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม General Report Wizard 28

รูปที่ 12 แสดงหลอดเลือดบริเวณแผลเมื่อเปิดผิวหนังบริเวณหลัง.....29

รูปที่ 13 แสดงวิธีการวัดขนาดของหลอดเลือดด้วยโปรแกรม Image Pro Plus 6.1 29

รูปที่ 14 แสดงการวิเคราะห์ทางพยาธิวิทยา ด้วยการย้อมชิ้นเนื้อแผลด้วย H&E เพื่อดูการเกิด re-epithelialization ในวันที่ 7 หลังทำให้เกิดแผล โดย r คือบริเวณที่มีการสร้าง epithelium ขึ้นมาใหม่เคลื่อนที่มาปกคลุม granulation tissue จากด้านซ้ายและขวาของขอบแผลเข้าสู่กึ่งกลางแผล R คือบริเวณแผลทั้งหมด A คือ granulation tissue และ B คือบริเวณที่มี fibroblast blood supply network collagen fiber และต่อมไขมัน 30

รูปที่ 15 แสดงการคำนวณค่าดูดกลืนแสงที่อ่านได้สำหรับนำไปวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน 32

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

รูปที่ 16 แสดงผลระดับน้ำตาลในเลือดของหนูเบาหวานหลังให้กินว่านหางจระเข้ ปลูกถ่าย EPCs หรือได้รับร่วมกัน ในวันที่ 7 (รูปที่ 16A) และวันที่ 14 (รูปที่ 16B) 36

รูปที่ 17 แสดงการเปลี่ยนแปลงของแผลในวันที่ 0, 7 และ 14 หลังทำให้เกิดแผลในกลุ่มทดลองทั้ง 5 กลุ่ม 37

รูปที่ 18 แสดง % wound closure ในวันที่ 7 (รูปที่ 18A) และ วันที่14 (รูปที่ 18B) ในหนูเบาหวานที่ให้กินว่านหางจระเข้ ปลูกถ่าย EPCs หรือได้รับร่วมกัน.....39

รูปที่ 19 แสดงผลการไหลเวียนของเลือดบริเวณแผลในวันที่ 7 (รูปที่ 19A) และ วันที่ 14 (รูปที่ 19B) ในหนูเบาหวานที่ให้กินว่านหางจระเข้ ปลูกถ่าย EPCs หรือได้รับร่วมกัน.....42

รูปที่ 20 แสดงการเกิดหลอดเลือดใหม่บริเวณแผลในวันที่ 7 และ วันที่ 14 หลังทำให้เกิดแผลในกลุ่มทดลองทั้ง 5 กลุ่ม 43

รูปที่ 21 แสดงการเกิดหลอดเลือดใหม่บริเวณแผลในวันที่ 7 (รูปที่ 21A) และ วันที่ 14 (รูปที่ 21B) ในหนูเบาหวานที่ให้กินว่านหางจระเข้ ปลูกถ่าย EPCs หรือได้รับร่วมกัน.....45

รูปที่ 22 แสดงการสร้างเยื่อบุผิวขึ้นมาใหม่บริเวณแผล (re-epithelialization) ในวันที่ 7 และ วันที่ 14 หลังทำให้เกิดแผลในกลุ่มทดลองทั้ง 5 กลุ่ม (H&E ที่กำลังขยาย 10 เท่า).....47

รูปที่ 23 แสดงร้อยละเยื่อบุผิวที่ขึ้นมาใหม่บริเวณแผล (% re-epithelialization) ของแต่ละกลุ่ม ในวันที่ 7 (รูปที่ 23A) และ วันที่ 14 (รูปที่ 23B) ในหนูเบาหวานที่ให้กินว่านหางจระเข้ ปลูกถ่าย EPCs หรือได้รับร่วมกัน 49

รูปที่ 24 แสดงระดับของ VEGF จากชิ้นเนื้อบริเวณแผล ในวันที่ 7 (รูปที่ 24A) และ วันที่ 14 (รูปที่ 24B) ในหนูเบาหวานที่ให้กินว่านหางจระเข้ ปลูกถ่าย EPCs หรือได้รับร่วมกัน.....52

รูปที่ 25 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง Blood glucose levels และ Blood perfusion ในหนูเบาหวานที่ให้กินว่านหางจระเข้ ปลูกถ่าย EPCs หรือ ได้รับร่วมกัน วิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรโดย Pearson’s correlation 53

รูปที่ 26 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % Capillary vascularity และ Wound blood flow ในหนูเบาหวานที่ให้กินว่านหางจระเข้ ปลูกถ่าย EPCs หรือ ได้ร่วมกัน วิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรโดย Pearson’s correlation 54

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

รูปที่ 27 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง Tissue VEGF levels และ % Capillary vascularity ในหนูเบาหวานที่ให้กินว่านหางจระเข้ ปลูกถ่าย EPCs หรือ ได้รับร่วมกัน วิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรโดย Pearson's correlation.....54

รูปที่ 28 แสดงการสรุปกลไกของการให้ว่านหางจระเข้ทางปากร่วมกับการปลูกถ่าย EPCs 61

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

สารบัญคำย่อ

AGEs	Advanced glycation end products
bFGF	Basic fibroblast growth factor
BSA	Bovine serum albumin
DAG	Diacylglycerol
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EPCs	Endothelial progenitor cells
eNOS	Endothelial nitric oxide synthase
FITC-DX-150	Fluorescein isothiocyanate labeled dextran-150
GADPH	Glyceraldehyde-3-phosephate dehydrogenase
GFAT	Glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase
HbA1c	Hemoglobin A1c
HIF-1α	Hypoxia inducible factor-1α
HUVECs	Human umbilical vein endothelial cells
H&E	Hematoxylin and eosin
IL-1β	Interleukin-1β
IL-6	Interleukin-6

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

MSCs	Mesenchyme stem cells
PARP	Poly (ADP-ribose) polymerase
PDGF	Platelet-derived growth factor
P/S	Penicillin-Streptomycin
RAGE	Receptor of AGEs
ROS	Reactive oxygen species
STZ	Streptozotocin
TGF-β	Transforming growth factors beta
TNFα	Tumor necrosis factor alpha
UDP	Uridine-diphosphate-N-acetylglucosamine
VEGF	Vascular endothelial growth factor

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 1
บทนำ

ที่มาและความสำคัญของปัญหา

โรคเบาหวาน (Diabetes mellitus) เป็นโรคเรื้อรังที่เป็นปัญหาสำคัญทางด้านสาธารณสุขของโลกและมีแนวโน้มที่เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง จากข้อมูลองค์กรอนามัยโลกพบว่าปัจจุบันมีผู้ป่วยเป็นโรคเบาหวานถึง 422 ล้านคนทั่วโลก และมีผู้เสียชีวิตจากโรคเบาหวานประมาณ 1.5 ล้านคน[1] ซึ่งภาวะแทรกซ้อนที่สำคัญในผู้ป่วยเบาหวาน คือแผลหายช้าและการเจริญของเนื้อเยื่อมีความบกพร่อง ซึ่งเกิดจากสาเหตุการขาดเลือดไปเลี้ยงบริเวณแผลโดยเฉพาะในแผลที่เท้าหรือบริเวณ lower limb จัดเป็นความเสียหายอย่างรุนแรง อาจนำไปสู่การถูกตัดเท้าหรือขาและเกิดทุพพลภาพได้ โดยพบว่า ร้อยละ 15 ของผู้ป่วยเบาหวานพบแผลที่เท้าและนำไปสู่การถูกตัดเท้าถึงร้อยละ 84[2] นอกจากนี้ผู้ป่วยที่เป็นแผลเบาหวานยังมีค่าใช้จ่ายในการรักษาที่ค่อนข้างสูงเนื่องจากเป็นโรคเรื้อรังและมีภาวะแทรกซ้อนที่รุนแรง นับเป็นการสูญเสียทางเศรษฐกิจอย่างมาก

ผู้ป่วยเบาหวาน (uncontrolled diabetes) จะมีระดับน้ำตาลในเลือดสูง (hyperglycemia) ผลจากการมีระดับน้ำตาลในเลือดสูงเป็นเวลานานส่งผลให้เกิดภาวะแทรกซ้อนในอวัยวะต่างๆ โดยเฉพาะระบบประสาทและหลอดเลือดส่วนปลาย โดยเกิดการสร้างสาร advanced glycation end products (AGEs) ที่เพิ่มมากขึ้นในเนื้อเยื่อต่างๆทั่วร่างกาย ส่งผลให้เกิดการสูญเสียหน้าที่ของ endothelial cells ที่ผนังหลอดเลือด รวมทั้งมีการลดลงของการสร้างหลอดเลือดใหม่[3] ทำให้มีเลือดไปเลี้ยงที่เนื้อเยื่อลดลง ซึ่งจะส่งผลต่อกระบวนการหายของแผล นอกจากนี้การมีระดับน้ำตาลในเลือดสูง ส่งผลให้ปริมาณและประสิทธิภาพในการทำงานของ endothelial progenitor cells (EPCs) ลดลง[4] ดังนั้นการสูญเสียหน้าที่ของ EPCs อาจลดศักยภาพในการสร้างและฟื้นฟูหลอดเลือดของผู้ป่วยโรคเบาหวานและด้วยเหตุนี้จึงทำให้เกิดแผลเบาหวาน รายงานจากการศึกษาพบว่า endothelial cells ของหลอดเลือดที่บาดเจ็บสามารถถูกซ่อมแซมโดย EPCs ที่สร้างมาจากไขกระดูก ซึ่ง EPCs มีหน้าที่สำคัญในการสร้างหลอดเลือดใหม่ เนื่องจากสามารถ differentiate ไปเป็น endothelial cells ได้ โดยสามารถเข้าไปแทนที่ endothelial cells ที่บาดเจ็บหรือหมดอายุ รวมทั้งสามารถเข้าไปช่วยสร้างแขนงหลอดเลือดใหม่ในภาวะขาดเลือดได้[5] ซึ่งพบว่าการปลูกถ่าย EPCs มี

ประสิทธิภาพในการรักษาแผลเบาหวานโดยช่วยเร่งการปิดของแผลและสร้างหลอดเลือดใหม่เพิ่มขึ้น ทำให้แผลหายได้เร็วขึ้น[6, 7]

ว่านหางจระเข้ เป็นสมุนไพรที่ผู้วิจัยสนใจนำมาศึกษาในครั้งนี้ ซึ่งเป็นสมุนไพรที่ได้รับความสนใจและมีบทบาทอย่างมากในการรักษาแผลนับตั้งแต่โบราณ มีชื่อวิทยาศาสตร์ คือ *Aloe vera* (L.) Burm.f. อยู่ในวงศ์ liliaceae ส่วนที่นำมาใช้ในการรักษาแผลคือ ส่วนของวุ้นใสในใบ โดยมีฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือด[8, 9] ลดการอักเสบ ต้านแบคทีเรีย และต่อต้านอนุมูลอิสระ[10] มีการศึกษาถึงผลของว่านหางจระเข้ต่อการหายของแผลทั้งในคนและในสัตว์ทดลอง และมีหลายงานวิจัยได้รายงานว่าส่วนของวุ้นใสในใบของว่านหางจระเข้มีประสิทธิภาพในการรักษาแผลได้ทั้งในหนูที่เป็นเบาหวานและในหนูที่ไม่เป็นเบาหวาน โดยช่วยให้แผลปิดได้เร็วขึ้น[11-15] และประสิทธิภาพในการรักษาแผลเบาหวานของว่านหางจระเข้นั้นไม่เพียงแต่นำมาใช้ด้วยวิธีการทาแต่ยังนำมาใช้รูปแบบการกินอีกด้วยโดยในปี 1998 Chithra และคณะ ทำการศึกษาผลของการให้ว่านหางจระเข้ทั้งโดยวิธีการกินและการทาในหนูที่เป็นเบาหวานที่ทำให้เกิดแผลแบบ full-thickness excision/incision wounds พบว่า collagen synthesis และ wound contraction เพิ่มขึ้น ส่วนระยะเวลาของ epithelialization ลดลง ส่งผลทำให้แผลหายเร็วขึ้น[11] นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษาใน in vitro พบว่าสารสกัดที่ได้จากว่านหางจระเข้ ได้แก่ β-sitosterol และ aloesin แสดงคุณสมบัติในการสร้างหลอดเลือดใหม่ โดยเพิ่มการเกิด proliferation และ migration ของ Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) ทำให้บาดแผลมีการประสานกันได้เร็วขึ้น[16, 17]

จากที่กล่าวมาข้างต้น จะเห็นได้ว่าทั้งการปลูกถ่าย EPCs และการใช้สมุนไพรว่านหางจระเข้นั้น มีข้อดีคือสามารถรักษาแผลเบาหวาน และ สร้างหลอดเลือดใหม่ได้ อีกทั้งการกินว่านหางจระเข้ ยังสามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดได้อีกด้วย ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาผลของการให้ว่านหางจระเข้ทางปากร่วมกับการปลูกถ่าย EPCs ในการรักษาแผลเบาหวาน ซึ่งยังไม่พบการศึกษาดังกล่าว

คำถามการวิจัย

การกินว่านหางจระเข้ร่วมกับการปลูกถ่าย EPCs มีผลต่อการรักษาแผลเบาหวานและการสร้างหลอดเลือดใหม่หรือไม่ และดีกว่าการให้เพียงอย่างเดียวหรือไม่

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

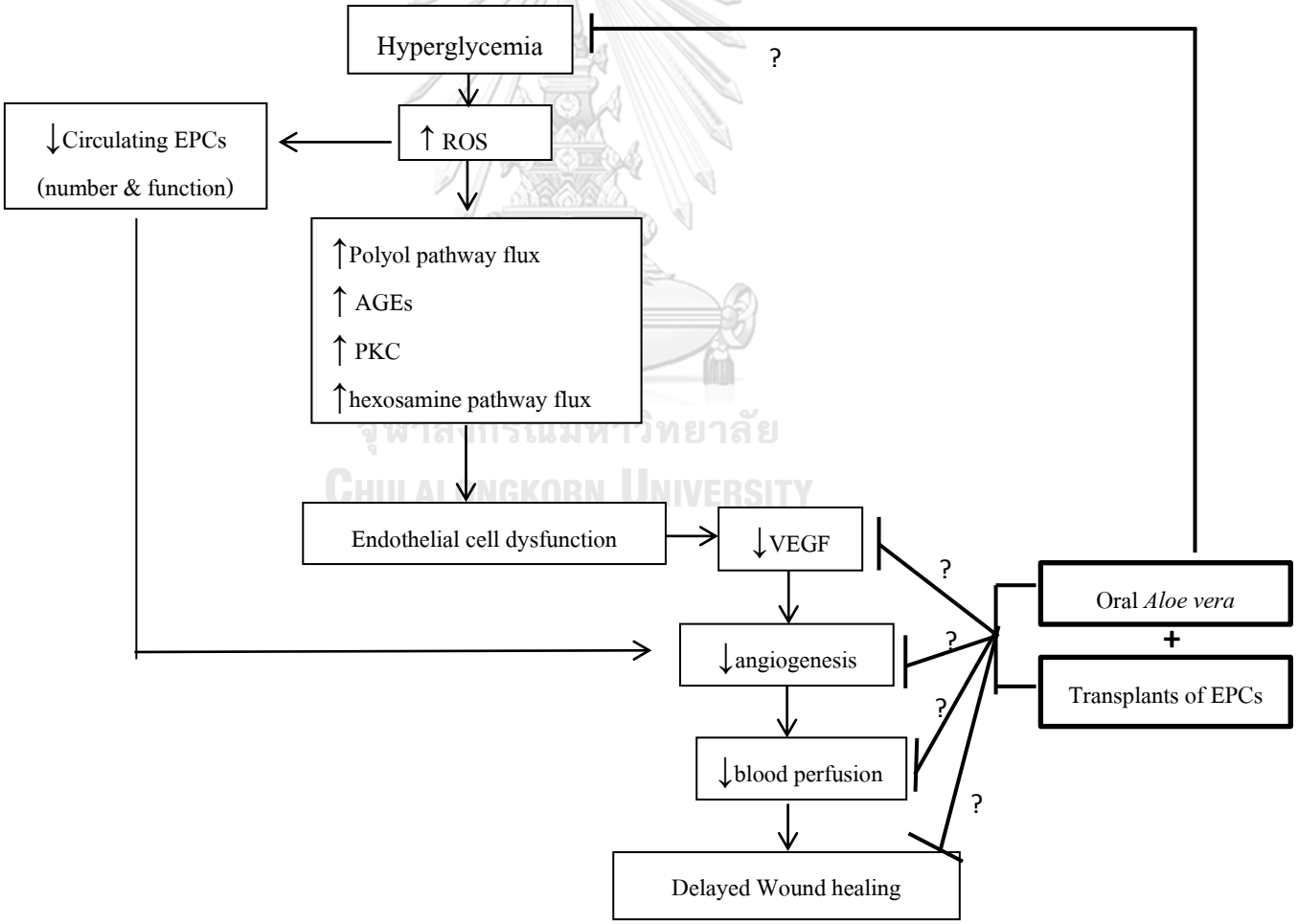
1. ศึกษาการหายของแผลในหนูที่เป็นเบาหวานหลังจากให้กินว่านหางจระเข้ร่วมกับการปลูกถ่าย EPCs

2. ศึกษาการเกิดหลอดเลือดใหม่และการแสดงออกของ VEGF ในหนูที่เป็นเบาหวานหลังจากให้กินว่านหางจระเข้ร่วมกับการปลูกถ่าย EPCs

สมมติฐานของการวิจัย

การกินว่านหางจระเข้ร่วมกับการปลูกถ่าย EPCs มีประสิทธิภาพช่วยให้แผลหายได้เร็วขึ้นและการสร้างหลอดเลือดใหม่ที่เพิ่มขึ้นผ่านการแสดงออกของ VEGF

กรอบแนวคิดในการวิจัย



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 2
ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

โรคเบาหวาน (Diabetes mellitus) [18, 19]

โรคเบาหวานเป็นกลุ่มโรคทางระบบเมแทบอลิซึม ที่พบว่ามีระดับกลูโคสในเลือดสูง ซึ่งเป็นผลมาจากความผิดปกติของเบต้าเซลล์ที่ตับอ่อน ทำให้เกิดการหลั่งอินซูลินไม่เพียงพอต่อความต้องการของร่างกาย ซึ่งโดยปกติแล้วอินซูลินออกฤทธิ์ในการนำกลูโคสไปยังเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ของร่างกาย เมื่อมีความผิดปกติดังกล่าว จึงทำให้ร่างกายไม่สามารถนำกลูโคสมาใช้เป็นพลังงานได้ ส่งผลให้ระดับกลูโคสในเลือดสูงขึ้น ในผู้ป่วยที่มีภาวะกลูโคสสูงเป็นเวลานาน ทำให้อวัยวะต่างๆ เกิดการเปลี่ยนแปลงที่ผิดปกติ และนำมาซึ่งโรคแทรกซ้อนต่างๆได้ โดยโรคเบาหวานแบ่งออกได้เป็น 4 ชนิด ดังนี้

1. โรคเบาหวานชนิดที่ 1 (Type 1 Diabetes) มักพบในเด็กหรือผู้ที่มีอายุน้อย ส่วนใหญ่น้อยกว่า 30 ปี เกิดจากตับอ่อนผลิตอินซูลินไม่ได้เลยหรือผลิตได้น้อยมาก เนื่องจากเบต้าเซลล์ที่ตับอ่อนถูกทำลาย ส่วนใหญ่เกิดจาก autoimmune ผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 1 มักมีรูปร่างผอม ถึงแม้จะรับประทานจุแต่ไม่อ้วน เพราะร่างกายเผาผลาญไขมันตามส่วนต่างๆ ของร่างกาย เพื่อนำมาใช้เป็นพลังงานแทนน้ำตาล สำหรับการรักษาจำเป็นต้องใช้อินซูลินในการฉีดเข้าร่างกายทางผิวหนังเพื่อควบคุมระดับน้ำตาลในกระแสเลือด

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

2. โรคเบาหวานชนิดที่ 2 (Type 2 Diabetes) เกิดจากมีความผิดปกติในการหลั่งอินซูลินของเบต้าเซลล์จากตับอ่อน (insulin secretory defect) ร่วมกับการที่ร่างกายมีภาวะดื้อต่ออินซูลิน (insulin resistance) โรคเบาหวานชนิดที่ 2 เป็นโรคเรื้อรังที่มีอัตราเพิ่มสูงขึ้นในปัจจุบัน ส่วนใหญ่พบในคนอายุมาก และอาจเกิดในคนอายุน้อยที่มีรูปร่างอ้วน

3. โรคเบาหวานชนิดที่เกิดจากสาเหตุอื่น ๆ (Other Specific Types of Diabetes) พบได้น้อยมาก มีรายงานว่าน้อยกว่าร้อยละ 3 ของผู้ป่วยเบาหวานทั้งหมด สาเหตุได้แก่ ความผิดปกติทางพันธุกรรมของเบต้าเซลล์หรือการออกฤทธิ์ของอินซูลิน โรคของตับอ่อน และการใช้ยาหรือสารเคมี เช่น ยากลุ่มสเตียรอยด์ เป็นต้น

4. โรคเบาหวานในหญิงตั้งครรภ์ (Gestational Diabetes Mellitus) เป็นโรคเบาหวานที่ได้รับการวินิจฉัยครั้งแรกในขณะตั้งครรภ์ หรือความผิดปกติของความทนต่อกลูโคสที่เกิดขึ้นก่อนการตั้งครรภ์ แต่ไม่เคยได้รับการวินิจฉัยมาก่อน ในช่วงระหว่างการตั้งครรภ์จะมีฮอร์โมนจากรกซึ่งมีฤทธิ์ต้านอินซูลินเป็นผลให้ร่างกายตอบสนองต่ออินซูลินลดลง ถ้าไม่สามารถเพิ่มการสร้างอินซูลินให้เพียงพอจะทำให้เกิดเป็นโรคเบาหวานในขณะตั้งครรภ์ได้และภายหลังคลอดส่วนใหญ่เบาหวานจะหายไป

พยาธิสรีรวิทยาของการเกิดภาวะแทรกซ้อนในผู้ป่วยเบาหวาน (Pathophysiology of diabetic complications)

ภาวะระดับกลูโคสในเลือดสูงเป็นเวลานานในผู้ป่วยเบาหวาน ทำให้เกิดความผิดปกติในระบบหลอดเลือด มีผลทำให้เกิดการเสื่อมของเส้นประสาทและหลอดเลือดแดง ซึ่งเป็นสาเหตุชักนำให้เกิดแผลเบาหวานและภาวะแทรกซ้อนต่างๆ ได้ดังนี้[20]

1. ภาวะแทรกซ้อนของหลอดเลือดขนาดเล็ก (Microvascular complication) ซึ่งเกิดการหนาตัวของ basement membrane ของหลอดเลือดฝอย และ endothelial cell dysfunction ทำให้หลอดเลือดตีบแคบลง เช่น ภาวะแทรกซ้อนทางตา ไต และ ระบบประสาท

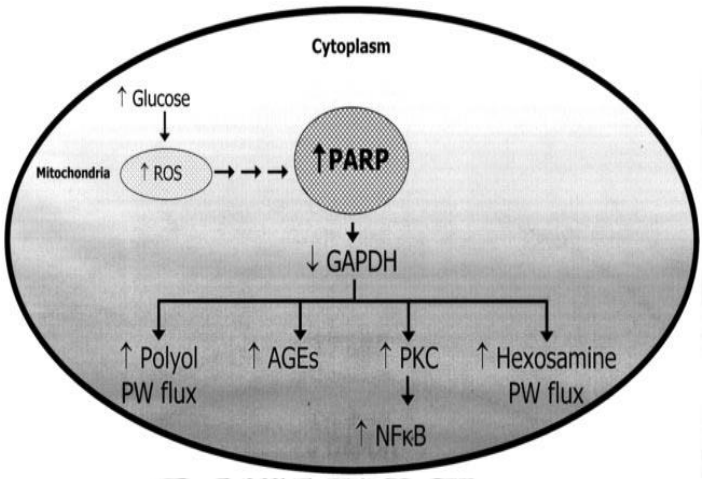
2. ภาวะแทรกซ้อนของหลอดเลือดแดงขนาดใหญ่ (Macrovascular complication) เกิดจากการแข็งตัวของหลอดเลือด (arteriosclerosis) ทำให้หลอดเลือดขนาดใหญ่เกิดการอุดตัน เช่น ภาวะแทรกซ้อนที่ทำให้เกิดโรคทางหลอดเลือดสมอง หลอดเลือดหัวใจ และ หลอดเลือดส่วนปลาย เช่น หลอดเลือดที่ไปเลี้ยงที่ขาหรือเท้า ทำให้มีการอุดตันของหลอดเลือด เกิดเป็นเนื้อตายขึ้นได้

กลไกการเกิดภาวะแทรกซ้อนของหลอดเลือดขนาดเล็กและหลอดเลือดขนาดใหญ่ [20-22]

กลไกภาพรวมของการเกิดความเสียหายต่อเซลล์จากภาวะกลูโคสในเลือดสูง (รูปที่ 1) เมื่อระดับกลูโคสในเลือดสูงขึ้น กลูโคสสามารถที่จะแพร่ผ่านเข้าไปในเซลล์และอวัยวะบางชนิดได้โดยไม่ต้องอาศัยอินซูลิน ได้แก่ brain, red blood cell, retina lens, intestine cell, vascular cell และ glomerulus และเมื่อระดับกลูโคสภายในเซลล์สูงจะเหนี่ยวนำให้เซลล์และเนื้อเยื่อเกิดการบาดเจ็บโดย mitochondria เพิ่มการผลิตสาร reactive oxygen species (ROS) ซึ่งก่อให้เกิดความเสียหายต่อโมเลกุลและเนื้อเยื่อต่างๆของร่างกาย โดยไปกระตุ้น PARP (Poly (ADP-ribose) polymerase) ทำให้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

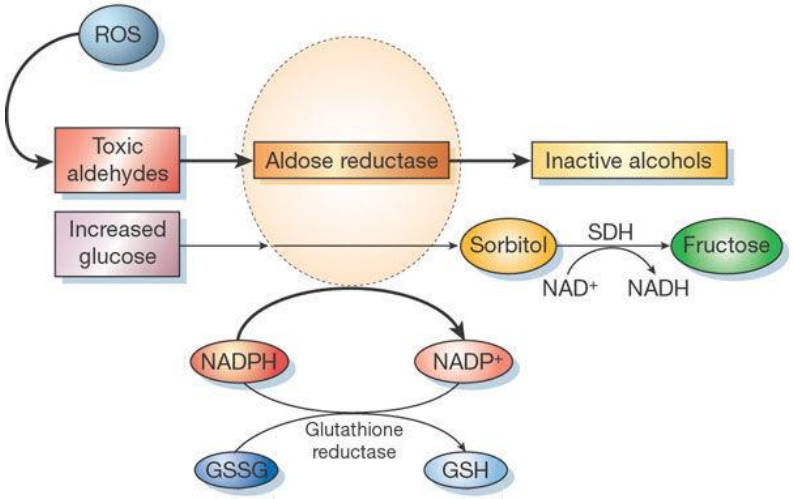
การทำงานของ GADPH (Glyceraldehyde-3-phosephate dehydrogenase) ลดลง ส่งผลให้เกิดการกระตุ้นกลไกต่างๆ ดังต่อไปนี้



รูปที่ 1 แสดงภาพรวมกลไกของภาวะระดับกลูโคสในเลือดสูงที่เหนี่ยวนำให้เกิดของความเสียหายของเซลล์ (Brownlee M., 2005)

1. Increased flux through the polyol pathway

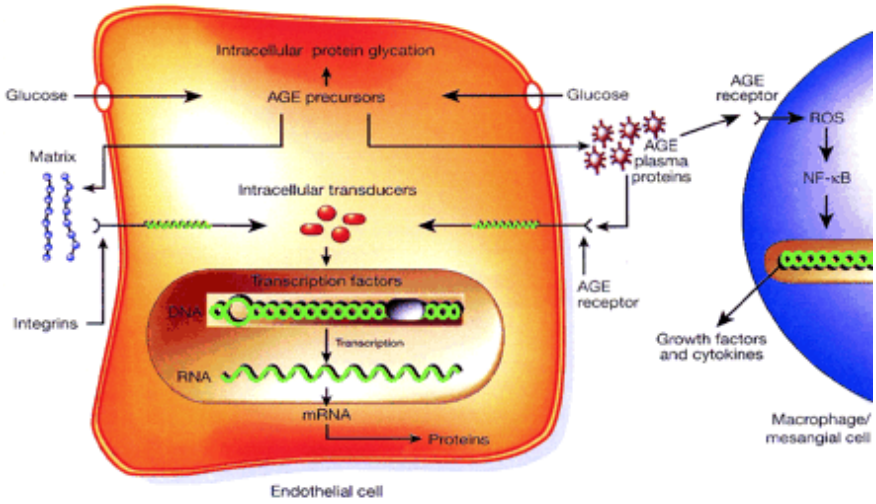
กลไกการเพิ่ม polyol pathway flux จากภาวะระดับกลูโคสในเซลล์สูง (รูปที่ 2) เมื่อระดับกลูโคสในเซลล์สูงขึ้น กลูโคสจะถูกเปลี่ยนให้เป็น sorbitol โดยเอนไซม์ aldose reductase และ sorbitol ถูกเปลี่ยนเป็น fructose โดยเอนไซม์ sorbitol dehydrogenase โดยมี NADPH เป็น cofactor ซึ่ง sorbitol มีขนาดโมเลกุลใหญ่ ไม่สามารถผ่านกลับออกมาจากเซลล์ได้ จึงเกิดการสะสม ซึ่งเป็นสาเหตุให้เกิดภาวะแทรกซ้อนจากโรคเบาหวาน โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่ ตา ไต และเส้นประสาท นอกจากนี้การเพิ่มของ sorbital ยังมีผลลดระดับ NADPH ซึ่งส่งผลให้เอนไซม์ต่างๆที่ต้องอาศัย NADPH ทำงานลดลง เช่น การทำงานของ glutathione ที่ต้องอาศัย NADPH เป็น cofactor ของเอนไซม์ glutathione reductase โดยจะเปลี่ยน oxidized glutathione disulfide (GSSG) ไปเป็น reduced glutathione (GSH) ซึ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ดังนั้นการลดลงของ NADPH จะทำให้สารต้านอนุมูลอิสระ glutathione ลดลง จึงเพิ่ม oxidative stress ภายในเซลล์ ส่งผลให้มีการทำลายเซลล์ต่างๆ อีกด้วย



รูปที่ 2 แสดงภาวะระดับน้ำตาลในเซลล์สูง เพิ่ม polyol pathway flux (Brownlee M., 2005)

2. Intracellular production of advanced glycosylated end products (AGEs) precursors

กลไกการผลิตที่เพิ่มขึ้นของสารตั้งต้น AGEs ภายในเซลล์ จากภาวะระดับกลูโคสในเซลล์สูง (รูปที่ 3) เมื่อระดับกลูโคสในเซลล์สูงขึ้น ทำให้เกิดปฏิกิริยาการเติมกลูโคสให้กับโมเลกุลของโปรตีน (protein glycation reaction) เพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้มีสารผลิตภัณฑ์สุดท้ายจากปฏิกิริยาไกลเคชันคือ AGEs ที่เพิ่มมากขึ้นในเนื้อเยื่อต่างๆ ทั่วร่างกาย โดยสาร AGEs มีผลเปลี่ยนแปลง basement membrane ให้หนาตัวขึ้น โดยเฉพาะ collagen type I และ IV จึงลดความยืดหยุ่นของหลอดเลือดและส่งผลให้หน้าที่ของเซลล์บุหลอดเลือดเสียไป นอกจากนี้สารตั้งต้นของ AGEs แพร่กระจายออกจากเซลล์และปรับเปลี่ยนการไหลเวียนโปรตีนในเลือด เช่น albumin ทำให้สามารถจับกับตัวรับ RAGE (receptor of AGEs) บนเยื่อหุ้มเซลล์ที่บริเวณต่างๆ ส่งผลต่อการแสดงออกของยีน การหลั่งสารอนุมูลอิสระ pro-inflammatory cytokines และ growth factor ซึ่งนำไปสู่พยาธิสภาพและความผิดปกติของหลอดเลือด



รูปที่ 3 แสดงกลไกการผลิตที่เพิ่มขึ้นของสารตั้งต้น AGEs ภายในเซลล์

(Brownlee M., 2005)

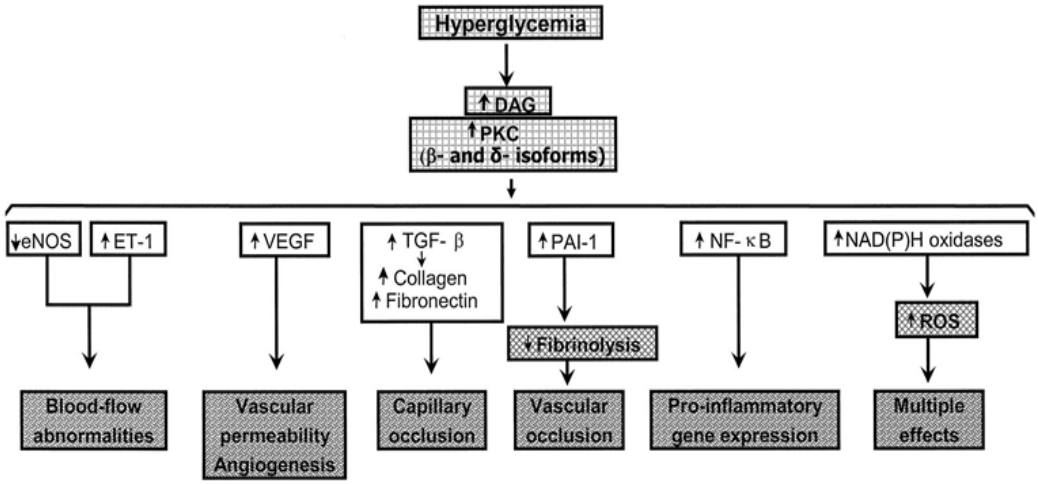
3. Protein kinase C (PKC) activation

กลไกที่ทำให้เกิดการกระตุ้น PKC จากภาวะระดับกลูโคสในเซลล์สูง (รูปที่ 4) ระดับกลูโคสในเซลล์สูง จะกระตุ้นการสังเคราะห์ diacylglycerol (DAG) ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญที่กระตุ้นให้เกิดไอโซฟอร์มของ PKC เมื่อ PKC ถูกกระตุ้นจะมีผลต่อการแสดงออกของยีน ซึ่งส่งผลต่างๆ เช่น

- การสร้าง vasodilator หรือ endothelial nitric oxide synthase (eNOS) ลดลง ในขณะที่ vasoconstrictor หรือ endothelin-1 ผลิตเพิ่มขึ้น ทำให้ blood flow ลดลง ซึ่งส่งผลให้เกิด peripheral neuropathy ในผู้ป่วยเบาหวานได้

- การเพิ่มขึ้นของ VEGF ที่ผิดปกติ โดยเพิ่มขึ้นเพียงบางแห่ง เช่น retina และ kidney ส่งผลให้เกิดการซึมผ่านผนังหลอดเลือด หรือการรั่วไหลของของเหลวออกภายนอกหลอดเลือด และการสร้างหลอดเลือดใหม่ที่เพิ่มขึ้นมากกว่าปกติ แต่ที่บริเวณผิวหนัง เมื่อเกิดแผล VEGF กลับลดลง ส่งผลให้เกิดการสร้างหลอดเลือดใหม่บริเวณผิวหนังลดลงทำให้แผลหายช้า

- การกระตุ้นการทำงานของสารกลุ่ม pro-inflammatory transcriptional factor คือ NFKB ส่งต่อการแสดงออกของยีนที่ก่อให้เกิดการอักเสบ

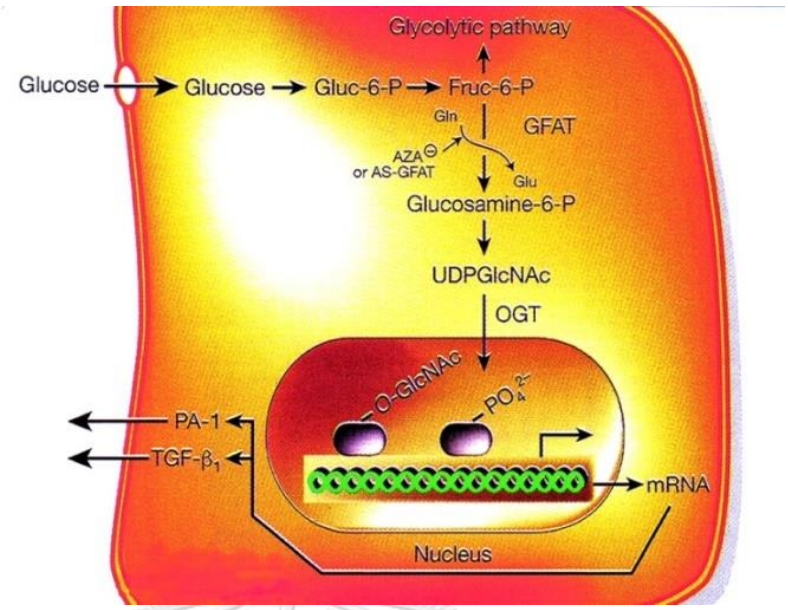


รูปที่ 4 แสดงผลจากภาวะระดับน้ำตาลในเซลล์สูงที่เหนี่ยวนำให้เกิดการกระตุ้น PKC (Brownlee M., 2005)

4. Increased hexosamine pathway activity

กลไกการเพิ่มการทำงานของ hexosamine pathway จากภาวะระดับกลูโคสในเซลล์สูง (รูปที่ 5) เมื่อระดับกลูโคสภายในเซลล์สูง กลูโคสส่วนใหญ่จะถูกเผาผลาญผ่านกระบวนการ glycolysis เริ่มจากการสังเคราะห์ glucose-6-phosphate โดยจัดโครงสร้างของ G6P ให้เป็น fructose-6-phosphate และเข้าสู่กระบวนการ glycolysis และบางส่วนของ fructose-6-phosphate ถูกเปลี่ยนเป็น glucosamine-6-phosphate โดยเอนไซม์ GFAT (glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase) และผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ได้คือ UDP (uridine diphosphate)-N-acetyl glucosamine ซึ่งมีผลกระตุ้นการแสดงออกของยีนที่ก่อให้เกิดภาวะแทรกซ้อนจากโรคเบาหวาน เช่น transforming growth factor beta-1 และ plasminogen activator inhibitor-1 ซึ่งทั้งสองตัวนี้ทำให้เกิดการอุดตันของหลอดเลือด

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



รูปที่ 5 แสดงภาวะระดับน้ำตาลในเซลล์สูงเพิ่มการทำงานของ hexosamine pathway (Brownlee M., 2005)

การหายของแผล (Wound healing) [23, 24]

โดยทั่วไปแล้วเมื่อผิวหนังได้รับบาดเจ็บ ร่างกายจะมีการตอบสนองโดยมีกลไกการหายของแผลเกิดขึ้นได้เองโดยธรรมชาติ ซึ่งแบ่งออกได้เป็น 4 ระยะคือ hemostasis phase, inflammatory phase, proliferative phase และ remodeling phase ซึ่งแต่ละระยะมีช่วงเวลาที่คาบเกี่ยวกัน

1. Hemostasis phase เมื่อเกิดการบาดเจ็บของผิวหนังหรือเกิดบาดแผลขึ้น จะเกิดการฉีกขาดของหลอดเลือด และมีเลือดออกจากร่างกาย ทำให้เกิดการหดตัวของหลอดเลือดและมีการรวมตัวของเกล็ดเลือดที่บริเวณแผล เพื่อสร้างเป็น fibrin clot ซึ่งอยู่ในรูปของ meshwork มาปกคลุมแผลในระยะแรกเพื่อให้เลือดหยุดไหล และเกล็ดเลือดยังหลั่ง growth factor และสารอีกหลายชนิด มากระตุ้นทำให้กระบวนการของการหายของแผลให้ดำเนินต่อไป โดยตัวที่สำคัญได้แก่ platelet-derived growth factor (PDGF) และ transforming growth factors beta (TGF-β)

2. Inflammatory phase เริ่มเกิดขึ้นภายใน 10-30 นาทีหลังจากเกิดบาดแผลถึงประมาณวันที่ 3-5 หลังจากได้รับการบาดเจ็บ โดยมีการชุมนุมของเซลล์เม็ดเลือดขาวจำนวนมากมาบริเวณที่เกิดแผลเพื่อป้องกันการติดเชื้อ โดยในระยะแรกเป็นเซลล์เม็ดเลือดขาว ได้แก่ neutrophils และต่อมาจะถูกแทนด้วย macrophage นอกจาก macrophage จะทำหน้าที่เก็บกินเชื้อโรคแล้ว ยังเป็น

เป็นเซลล์ที่มีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการหายของแผล โดยทำการหลั่ง growth factor อีกจำนวนมาก ซึ่งมีผลเหนี่ยวนำให้ fibroblast มายังบาดแผลและเกิดการแบ่งตัวจำนวนมากขึ้น เป็นการเริ่มต้นในการเข้าสู่ระยะ proliferative ต่อไป นอกจากนี้ macrophage ยังมีการหลั่งสารไซโตไคน์ที่ก่อให้เกิดการอักเสบ เช่น TNFα, IL-1β และ IL-6 เป็นต้น ซึ่งส่งผลให้บริเวณแผลมีอาการปวด บวม แดง ร้อน หลอดเลือดบริเวณแผลขยายตัว (vasodilatation) และมี permeability เพิ่มขึ้น ซึ่งนำไปสู่การบวมเกิดขึ้น

3. Proliferative phase เป็นระยะเวลาในช่วง 4-24 วันหลังจากได้รับการบาดเจ็บ โดยในระยะนี้ร่างกายจะสร้างเนื้อเยื่อขึ้นมาใหม่ทดแทนเนื้อเยื่อที่หายไป โดยเซลล์ที่สำคัญได้แก่ endothelial cell และ fibroblast โดยบาดแผลจะมีการเกิด fibroplasia, angiogenesis, re-epithelialization และ wound contraction

3.1 fibroplasia คือ การแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของ fibroblast บริเวณแผล ถูกกระตุ้นโดย growth factors ที่หลั่งมาจากกระบวนการ hemostasis (โดยเฉพาะ PDGF และ TGF-β) โดย fibroblast ทำการสร้าง extracellular matrix ขึ้นมาใหม่ประกอบไปด้วย collagen เป็นส่วนใหญ่ และสาร glycoprotein ต่างๆ เช่น fibronectins, laminin และ hyaluronic acid

3.2 angiogenesis คือ การสร้างหลอดเลือดขึ้นใหม่จากหลอดเลือดเดิมที่มีอยู่แล้ว หลอดเลือดใหม่จำนวนมากที่เกิดขึ้น ถูกกระตุ้นจากภาวะ tissue hypoxia โดย endothelial cell เกิดการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนและเคลื่อนย้ายจากบริเวณอื่นมายังบริเวณแผล ซึ่งกระบวนการนี้ถูกกระตุ้นโดย growth factor ที่หลั่งมาจาก macrophage, fibroblast และ platelets ซึ่ง growth factor ที่สำคัญ คือ vascular endothelial growth factor

3.3 re-epithelialization คือ การที่ขอบแผลค่อยๆสมานชิดติดกัน โดย keratinocyte ที่บริเวณขอบบาดแผลเคลื่อนตัวเข้าสู่บาดแผล โดยทำการแบ่งและงอกขยายตัวแล้วเคลื่อนที่มาปกคลุม granulation tissue และเมื่อคลุมบาดแผลหมดแล้ว keratinocyte และ fibroblast จะสร้าง laminin และ collagen type IV เพื่อเป็น basement membrane ใหม่ และค่อยๆหนาตัวขึ้นเป็นชั้นต่างๆ จนเป็นผิวหนังปกติ

3.4 wound contraction คือ การหดรั้งตัวของขอบแผลเข้าสู่ศูนย์กลาง โดย fibroblast จะเคลื่อนไปที่ขอบของแผล เปลี่ยนเป็น myofibroblast ซึ่งจะมีพลังในการดึงขอบแผลให้เข้าหากัน

ทำให้แผลมีขนาดเล็กลง

4. Remodeling phase เริ่มประมาณ 20 วันหลังการเกิดบาดแผลและดำเนินต่อไปได้ตั้งแต่หลายเดือนไปจนถึงหลายปีขึ้นอยู่กับบาดแผลนั้นๆ ระยะนี้แผลจะมีความแข็งแรงขึ้น โดยมีการเกิด collagen cross link และมีการเกิดแผลเป็น (scar) ซึ่งจะมีเลือดมาเลี้ยงบริเวณแผลลดลง การสร้าง collagen ลดลง และมีการทำลายของ collagen มากขึ้น จนถึงภาวะสมดุลของการสร้างและทำลาย collagen ทำให้ scar นิ่มลง แบนลง เรียบและ มีสีจาง

ทั้งนี้ในกระบวนการ wound healing ในหนูมีระยะเช่นเดียวกับมนุษย์ต่างกันที่การเกิด wound contraction เนื่องจากในหนูจะมีชั้นของกล้ามเนื้อใต้ผิวหนังที่เรียกว่า panniculus carnosus ซึ่งไม่พบในมนุษย์ มีหน้าที่ช่วยในการหดตัวของผิวหนังอย่างรวดเร็วหลังจากเกิดแผล จึงทำให้แผลปิดได้เร็วกว่าในผิวหนังของมนุษย์[25]

การหายของแผลเบาหวาน

ผู้ป่วยเบาหวานจะพบว่ามีการบกพร่องของกระบวนการหายของแผล โดยพบว่ามีการแทรกซึมของเซลล์อักเสบลดลง โดยเฉพาะ neutrophils และ macrophage ที่พบว่าลดลงทั้งจำนวนและหน้าที่ อีกทั้ง macrophage นี้ยังมีความสำคัญในการผลิต growth factor คือ VEGF ดังนั้นอาจส่งผลการลดลงในการสร้างหลอดเลือดใหม่ได้อีกด้วย[26]

ในระยะ proliferative phase พบว่า endothelial cell สูญเสียหน้าที่ไป ทำให้มีการสร้างหลอดเลือดใหม่ และความหนาแน่นของเส้นเลือดฝอยลดลง นำไปสู่การไหลเวียนเลือดที่ไม่ดี นอกจากนี้ในแผลเบาหวานยังพบว่า มีการลดลงของการสังเคราะห์และการวางตัวคอลลาเจน การผลิต growth factor ที่สำคัญ เช่น TGF-β, bFGF และ VEGF การโยกย้ายและการเจริญของ keratinocytes และ fibroblast ทั้งหมดนี้นำไปสู่การหายของแผลที่ล่าช้า[27-29]

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

แนวทางการรักษาแผลเบาหวาน [30]

การรักษาแผลเบาหวานที่เท้าที่เป็นมาตรฐานในปัจจุบัน มีแนวทางคือ ในการดูแลรักษาเบื้องต้นเมื่อเกิดแผลจากของมีคมหรือแผลขีดข่วน ควรล้างแผลให้สะอาดด้วยน้ำอุ่น และสบู่ เช็ดให้แห้ง และใส่ยาฆ่าเชื้อ เช่น เบตาดีนเจือจาง ปิดแผลด้วยผ้าปิดแผลที่แห้งและผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ไม่ควรใช้พลาสเตอร์ปิดแผลโดยตรง สำหรับการดูแลรักษาด้วยแพทย์ ในการทำแผลหากมีหนองหรือ

เนื้อตายต้องกรีดเปิดแผลให้กว้างเพื่อระบายหนองออก ตัดเนื้อเน่าตายออก ล้างด้วยน้ำเกลือ แล้วปิดแผลด้วยผ้าปิดแผลชุบด้วยน้ำเกลือหรือน้ำเกลือผสมน้ำยาเบตาดีน ทำแผล 2-4 ครั้งต่อวัน ตามด้วยการใช้วัสดุทางการแพทย์ปิดแผลไว้ เช่น แผ่นใยสังเคราะห์หรือน้ำยาช่วยกระตุ้นการหายของแผล ทำแผลต่อเนื่องจนกว่าแผลจะแดงดีซึ่งเหมาะแก่การทำการปลูกถ่ายผิวหนังหรือจนกว่าแผลจะหาย และในขณะเดียวกันผู้ป่วยต้องคุมระดับน้ำตาลในเลือด ปรับพฤติกรรมการกินและการดำรงชีวิตควบคู่ไปด้วย

การรักษาแผลเบาหวาน นอกจากจะใช้ระยะเวลาในการรักษาที่นานกว่าปกติแล้ว ยังมีหลายปัจจัยที่ก่อให้เกิดความยุ่งยากในการดูแลรักษาแผลเบาหวาน เช่น การติดเชื้อที่แผล และหากระบบเลือดไหลเวียนไปที่แผลไม่ดีเท่าที่ควรอาจทำให้เกิดภาวะเนื้อตายได้ ซึ่งล้วนแล้วแต่ทำให้เกิดการสิ้นเปลืองทรัพยากร เสียเวลา เสียค่าใช้จ่ายจำนวนมาก และเกิดความเบื่อหน่ายต่อการรักษาทั้งผู้ให้บริการและผู้รับบริการอีกด้วย ดังนั้นในปัจจุบันจึงมีการวิจัยเพื่อพัฒนากระบวนการรักษาแผลเบาหวานขึ้นมาจำนวนมาก เช่น การใช้ยารักษา การใช้สมุนไพร และการใช้เซลล์บำบัด

Endothelial progenitor cells (EPCs) และบทบาทในการรักษาแผลเบาหวาน

EPCs เป็นเซลล์ต้นกำเนิดของหลอดเลือด ซึ่งมีหน้าที่สำคัญในการสร้างหลอดเลือดใหม่ เนื่องจาก EPCs สามารถ differentiate ไปเป็น endothelial cells ที่สามารถทำงานได้และสร้างหลอดเลือดใหม่ได้[28] EPCs เป็นเซลล์ที่สร้างมาจากไขกระดูกและสามารถแยกได้จาก bone marrow umbilical cord blood และ peripheral blood[31]

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

โรคเบาหวานเหนี่ยวนำทำให้หลอดเลือดบาดเจ็บและสูญเสียหน้าที่ไป ซึ่งมีความสัมพันธ์กับภาวะ oxidative stress เนื่องจากในภาวะน้ำตาลในเลือดสูง ทำให้มีสาร ROS ที่มากเกินไป โดยสาร ROS นี้จะไปลดจำนวนและหน้าที่ของ EPCs[4] ดังนั้นการสูญเสียหน้าที่ของ EPC อาจลดศักยภาพในการงอกใหม่ของหลอดเลือดของผู้ป่วยโรคเบาหวานและทำให้เกิดแผลเบาหวาน มีการศึกษาในโรคเบาหวานชนิดที่ 1 และ ชนิดที่ 2 พบว่า EPCs มีการลดจำนวนลงและเสียหน้าที่ไป[32, 33] โดยในปี 2004 Lomans และคณะ ได้ทำการศึกษาจำนวนของ EPCs ในกระแสเลือดของผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 1 พบว่าลดลงร้อยละ 44 และประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเกิด endothelial tube formation ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับคนปกติ[32] และในปี 2002 Tepper และคณะ ได้ทำการศึกษาจำนวนของ EPCs ในกระแสเลือดของผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2

พบว่าลดลงถึงร้อยละ 48 โดยจำนวนของ EPCs แปรผกผันกับระดับ hemoglobin A1c (HbA1c) และความสามารถในการสร้างหลอดเลือดลดลงถึง 2.5 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับ EPCs จากกระแสเลือดของคนปกติ[33] และจากการศึกษาใน in vitro พบว่า EPCs ที่ได้รับ high glucose (25 mmol/l) มีเกิดการชราหรือเสื่อมสภาพไปของเซลล์เพิ่มขึ้น การเกิด migration และ tube formation ของ Epcs ลดลง[34] จากรายงานดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า EPCs ในผู้ป่วยโรคเบาหวานมีความผิดปกติ ซึ่งอาจส่งผลต่อการการหายของบาดแผลในผู้ป่วยเบาหวานและการเกิดภาวะแทรกซ้อนของหลอดเลือดส่วนปลายในผู้ป่วยเบาหวานได้ ดังนั้นการให้การรักษาด้วย EPCs จึงน่าจะมีประโยชน์ต่อการหายของแผล

มีงานวิจัยจำนวนมากพบว่าการรักษาโดยการปลูกถ่าย EPCs ช่วยส่งเสริมการสร้างหลอดเลือดใหม่และการหายของแผล ดังตารางที่ 1

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ตารางที่ 1 ตัวอย่างงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการรักษาแผลด้วย EPCs ในสัตว์ทดลอง

Researchers	**Animal/ subject**	**Wound model**	**Method**	**Results**
Shu et al., 2005[35]	Non-diabetic nude mice	full-thickness excision wound	EPCs treatment (BMMNCs) Dose: 1×10^5 cells	↑wound closure ↑recruitment of monocytes/ macrophages ↑angiogenesis
Kim et al., 2010[6]	STZ-induced diabetic nude mice	full-thickness excision wound	EPCs treatment (CD34-positive cells) Dose: 1×10^6 cells	↑wound closure ↑ proliferation of keratinocytes and fibroblast
Asai et al., 2013[7]	db/db rat	full-thickness excision wound	EPCs treatment (BMMNCs) Dose: 5×10^4 cells	↑wound closure ↑angiogenesis ↑VFGF&bFGF expression
Sukpat et al., 2013[36]	STZ-induced diabetic nude mice	full-thickness excision wound	EPCs+MSCs treatment (HUVEC) Dose: 0.5×10^6 cells EPCs	↑wound closure ↑angiogenesis ↑VFGF expression ↓ neutrophil infiltration ↓MDA
Ackermann et al., 2014[37]	STZ-induced diabetic nude mice	full-thickness incision wound	EPCs +VEGF+ bFGF +PDGF treatment (HUVEC) Dose: 2×10^6 cells EPCs	↑wound closure ↑rate of re-epithelialization ↑angiogenesis ↑tensile strength

MSCs = mesenchyme stem cells

bFGF = basic fibroblast growth factor

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ว่านหางจระเข้ (*Aloe vera*) และบทบาทในการรักษาแผล

ว่านหางจระเข้มีชื่อทางพฤกษศาสตร์ว่า *Aloe Vera* (L.) Burm.f. อยู่ในวงศ์ Liliaceae เป็นไม้ล้มลุก สูงประมาณ 60-100 เซนติเมตร ใบเป็นแบบใบเดี่ยว สีเขียว โคนใบมีขนาดใหญ่ ปลายใบแหลม ขอบใบหยักมีหนามเล็กๆ สีขาว เนื้อภายในใบมีเมือกเหนียว ลักษณะเป็นวุ้นใสสีเขียวอ่อน และมียางใสไม่มีสี ถิ่นกำเนิดมาจากแถบชายฝั่งทะเลเมดิเตอร์เรเนียนและตอนใต้ของทวีปแอฟริกา[38] สารออกฤทธิ์ในว่านหางจระเข้ได้มาจากส่วนของวุ้นใสในใบโดยมีฤทธิ์ในการลดระดับน้ำตาลในเลือด[8, 9] จากงานวิจัยทางคลินิกในผู้ป่วยโรคเบาหวานจำนวน 36 คน ให้งดยาเบาหวานแล้วเปลี่ยนมารับประทานน้ำว่านหางจระเข้ (*Aloe vera* juice) 1 ช้อนโต๊ะ วันละสองครั้งในตอนเช้าและก่อนนอน เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่า ระดับของกลูโคส และไตรกลีเซอไรด์ในเลือดลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ [8] และในสัตว์ทดลองพบว่า หนู rat ที่ได้รับ *Aloe vera* (300 mg/kg) ในรูป oral administration วันละ 1 ครั้งเป็นเวลา 3 สัปดาห์ ระดับน้ำตาลในเลือดลดลงจนเป็นปกติ ระดับอินซูลิน และ pancreatic islet mass เพิ่มขึ้น[39] โดยกลไกในการลดระดับน้ำตาลในเลือดของว่างหางจระเข้ คือ กระตุ้นการหลั่งอินซูลิน ลดการดูดซึมน้ำตาลกลูโคสที่บริเวณลำไส้เล็ก ป้องกันการทำลายเบต้าเซลล์ของตับอ่อน และฟื้นฟูเบต้าเซลล์ของตับอ่อนที่ถูกทำลายไป[40] นอกจากนี้ว่านหางจระเข้ยังมีฤทธิ์ลดการอักเสบ ต้านแบคทีเรีย และต้านอนุมูลอิสระ[10]

มีหลายงานวิจัยได้ทำการศึกษาถึงผลของว่านหางจระเข้ต่อการหายของแผลทั้งในสัตว์ทดลองและในคน ดังตารางที่ 2

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 2 แสดงตัวอย่างงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการรักษาแผลด้วยว่านหางจระเข้ทั้งในสัตว์ทดลองและในคน

Researchers	**Animal/ subject**	**Wound model**	**Route and Dose**	**Results**
Chithra et al., 1998[11]	STZ-induced diabetic rats	full-thickness excision/incision wound	oral: lyophilized powder dissolved in sterile water topical: fresh *Aloe vera* gel Dose: 30 mg/head	↑wound closure ↑collagen synthesis ↑ wound contraction ↑rate of re-epithelialization
Somboonwong et al., 2000[12]	normal rats	second degree burn wound	topical: lyophilized *Aloe vera* gel Dose: 300 mg/kg BW	↑wound closure ↓ leukocyte adhesion ↑ healing area
Khorasani et al., 2009[13]	burn patients	second degree burn wound of hand or foot	topical: cream (*Aloe vara* gel powder 0.5%)	↑wound closure ↑rate of re-epithelialization & healing
Atiba et al., 2011[15]	db/db rats	full-thickness excision wound	oral: lyophilized powder dissolved in sterile water Dose:30 mg/head	↑wound closure ↑angiogenesis ↑TGF-β1&VEGF expression
Atiba et al., 2011[14]	normal rats (with delayed healing model)	full-thickness excision wound	oral: lyophilized powder dissolved in sterile water Dose: 30 mg/head	↑wound closure ↑fibroblast proliferation ↑collagen deposition ↑angiogenesis ↑TGF-β1& bFGF expression
Abdel-Hamid & Soliman, 2015[41]	normal rats	full-thickness skin burn	topical : *Aloe vera* gel 95% Dose:200 mg/kg BW	↓ inflammation ↑angiogenesis

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาถึงสารออกฤทธิ์ในว่านหางจระเข้ที่มีผลต่อการหายของแผลที่ทำการศึกษาใน in vitro โดยในปี 2001 Choi และคณะ ทำการศึกษาใน in vitro จาก three-dimensional raft culture (ซึ่งเป็นเทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์ที่สร้าง epidermis เทียมจากเซลล์ keratinocytes) พบว่า สารG1G1M1DI2 ที่ได้จากการสกัด glycoprotein จากว่านหางจระเข้ สามารถส่งเสริมการหายของแผล โดยพบว่าเพิ่มการเกิด cell proliferation, migration และ epidermis formation ทำให้บาดแผลประสานกันได้เร็วขึ้น โดยมี proliferation protein marker หลายชนิดที่เพิ่มขึ้นคือ epidermal growth factor receptor, fibronectin receptor, fibronectin, keratin 5/14 และ keratin 1/10 และเมื่อนำสารสกัดนี้มาทำเป็น ointment แล้วนำไปทาที่แผล skin punch wound ของ hairless mice พบว่าส่งเสริม granulation tissue และเพิ่ม epithelialization ทำให้มีการหายของแผลเร็วกว่าในกลุ่มควบคุม[42]

กลไกการออกฤทธิ์ของ Aloe vera ต่อการหายของแผล

มีผู้ทำการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของว่านหางจระเข้ต่อการหายของแผลทั้งในรูปแบบวิธีการกินและการทา โดยในปี 2011 Sargowo และคณะ ทำการศึกษาในหนูที่เหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานชนิดที่ 1 และให้กินว่านหางจระเข้ในปริมาณ 120 mg/kg วันละครั้งทุกวันเป็นเวลาสองสัปดาห์ พบว่าช่วยให้แผลหายได้เร็วขึ้นผ่านการเพิ่มขึ้นของระดับ circulating EPCs, VEGF และ eNOS ซึ่งเป็นปัจจัยที่สำคัญในการเกิดหลอดเลือดใหม่[43] ส่วนในรูปแบบวิธีการทา มีผู้ทำการศึกษาสารสำคัญของว่านหางจระเข้ที่ออกฤทธิ์ ได้แก่ ในงานวิจัยของ Tabandeha และคณะในปี 2014 ทำการศึกษาในหนูที่เหนี่ยวให้เกิดแผลบริเวณผิวหนังชนิด full-thickness excision wound และให้ polysaccharides ทาบริเวณแผล พบว่าสาร Polysaccharides ที่สกัดได้จากว่านหางจระเข้กระตุ้นการแสดงออกของยีน MMP-3 และ TIMP-2 ส่งผลให้มีการสังเคราะห์ extracellular matrix ขึ้นมาใหม่ ส่งผลให้แผลปิดได้เร็วขึ้น[44]และในปี 2017 Wahedi และคณะ พบว่าสาร aloesin ที่สกัดได้จากวุ้นของว่านหางจระเข้ เพิ่มการหายของแผล ทั้งใน in vitro (wound migration และ tube formation assay) โดยช่วยเพิ่มการเกิด cell migration ของ human keratinocyte cell line และเพิ่มการเกิด endothelial cell tube formation ของ HUVECs และจากการศึกษาใน in vivo โดยเหนี่ยวนำให้หนูเกิดแผลชนิด full-thickness excision และให้ aloesin ทาบริเวณแผล พบว่าช่วยเมการเกิดหลอดเลือดใหม่ การวางตัวของ collagen การสร้าง granulation tissue และยังควบคุมการหลั่ง cytokine และ

growth factors ที่สำคัญ(IL-1β, IL-6, TGF-β1 และ TNF-α) ผ่าน MAPK/Rho และ Smad signaling pathways ซึ่งเป็นกลไกสำคัญในการเกิดหลอดเลือดใหม่ และการเจริญของเนื้อเยื่อในกระบวนการหายของแผล[17]

บทบาทของ Aloe vera ต่อการสร้างหลอดเลือดใหม่ของ endothelial cell

ในปี 1999 Moon และคณะ พบว่า β-sitosterol ที่สกัดได้จากวุ้นของว่านหางจระเข้ แสดงคุณสมบัติในการสร้างหลอดเลือดใหม่ จากการศึกษาใน in vitro (wound migration assay) พบว่า β-sitosterol กระตุ้นการเกิด migration ของ HUVECs แล้วเข้าสู่กระบวนการ neovascularization ได้เกือบ ร้อยละ40 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ทำให้บาดแผลประสานกันได้เร็วขึ้น[16]

ในปี 2002 Choi และคณะ พบว่าสารออกฤทธิ์ที่สกัดได้จากวุ้นของว่านหางจระเข้คือ β-sitosterol แสดงคุณสมบัติเร่งการสร้างหลอดเลือดใหม่และซ่อมแซมการสร้างหลอดเลือดใหม่ที่เสียหายได้ใน ischemic/reperfusion model ใน Mongolian gerbil ซึ่ง β-sitosterol จัดเป็น plant-derived angiogenic factor ที่มีคุณประโยชน์ต่อการช่วยสมานแผลเรื้อรัง และเพิ่มการแสดงออกของโปรตีนที่สำคัญที่เกี่ยวข้องกับการสร้างหลอดเลือดใหม่คือ von Willebrand factors, VEGF, VEGF receptor, Flk-1 และ blood vessel matrix laminin[45]

บทบาทของ Vascular endothelial growth factor (VEGF) ต่อการหายของแผลเบาหวาน

VEGF เป็นโปรตีนสื่อสาร (Signal protein) ที่มีบทบาทในการกระตุ้นให้เกิดการสร้างหลอดเลือดใหม่ ถูกหลั่งมาจาก fibroblasts, keratinocytes, macrophages และ endothelial cells พบว่า VEGF มีประสิทธิภาพในการเร่งการเกิด proliferation และ migration ของ endothelial cells[46] โดยในภาวะ hypoxia หรือ ภาวะที่ร่างกายได้รับบาดเจ็บ โปรตีน VEGF จะถูกกระตุ้นให้สร้างเพิ่มขึ้น เหนี่ยวนำให้เกิดการ phosphorylation และกระตุ้น eNOS ในไขกระดูก ส่งผลให้ระดับของ NO เพิ่มขึ้น ซึ่งเป็นสาเหตุให้การเคลื่อนย้ายของ EPCs จากไขกระดูกเข้าสู่กระแสเลือดและ SDF-1α จะช่วยสนับสนุน homing EPCs เหล่านี้ไปยังพื้นที่ได้รับบาดเจ็บเพื่อเข้าสู่กระบวนการ neovasculogenesis หรือ การสร้างหลอดเลือดใหม่[29] แต่ในแผลเบาหวานกลับพบว่าระดับของ VEGF ลดลง โดยในปี 2017 Lin และคณะ ทำการศึกษาในหนูที่เหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานชนิดที่ 1 และทำให้เกิดแผล พบว่าระดับของ HIF-1α และ VEGF ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการรักษาแผลเบาหวานลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งอาจนำไปสู่การบกพร่องในการสร้างเส้นเลือดใหม่ ทำ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ให้แผลหายช้าลงได้[47] และเมื่อนำ VEGF มาใช้ในการรักษาแผลเบาหวานในรูปแบบ topical จากการศึกษาใน in vitro พบว่า VEGF ช่วยกระตุ้นการเกิด migration ของ human keratinocytes และ fibroblasts ส่งผลให้แผลปิดได้เร็วขึ้น และจากการศึกษาใน in vivo พบว่า VEGF ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษาแผลในหนูที่เป็นเบาหวานชนิดที่ 2 ตั้งแต่กำเนิด โดยเพิ่มความแข็งแรงของแผล การสร้างหลอดเลือดใหม่ การสร้างเยื่อบุผิว การสะสมและการวางตัวของคอลลาเจน ส่งผลให้แผลปิดได้เร็วขึ้น[48]

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

- Streptozotocin (STZ) (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, USA)
- Citrate buffer pH 4.5 (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, USA)
- Sodium pentobarbital (Nembutal, CEVA Santé Animal, Libourne, France)
- Fibrin gel (Shanghai RAAS Blood Products Co., Ltd., Shanghai, China)
- Fluorescein isothiocyanate labeled dextran-150 (FITC-DX-150) (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, USA)
- RIPA lysis buffer (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, USA)
- Protease inhibitor (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, USA)

สัตว์ทดลอง

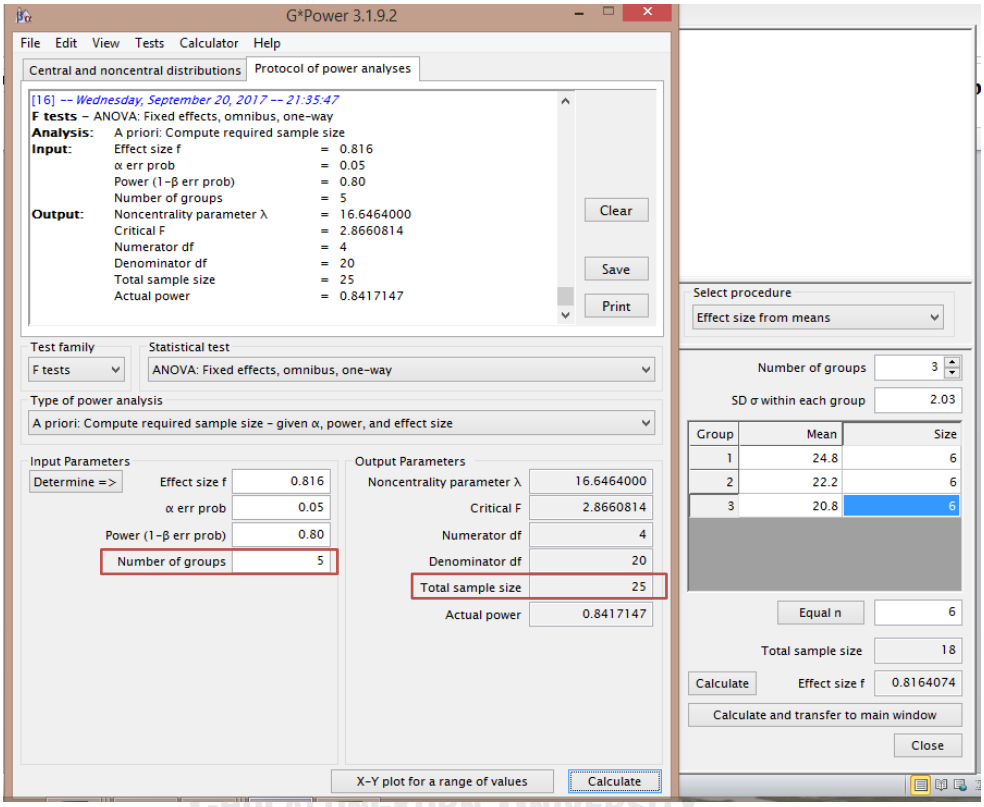
สัตว์ทดลองที่ใช้ในการทดลองนี้คือ หนู nude mice (BALB/c) เพศผู้ อายุ 7-8 สัปดาห์ น้ำหนักประมาณ 20-25 กรัม จากบริษัทโนมูระ สยามอินเตอร์เนชั่นแนลจำกัด ถูกนำมาเลี้ยงในศูนย์สัตว์ทดลอง คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยควบคุมอุณหภูมิห้องให้อยู่ระหว่าง 25±2°C ช่วงเวลาสว่างมืด 12:12 ชั่วโมงต่อวัน มีระบบระบายอากาศและเลี้ยงในกรงที่มีวัสดุรองนอนเป็นขี้เลื่อยสะอาด เลี้ยงจำนวน 1 ตัวต่อกรง เลี้ยงดูด้วยอาหารปกติและน้ำสะอาดอย่างเพียงพอตามความต้องการของสัตว์ทดลอง และหนูทุกตัวมีการปรับตัวให้เหมาะสมต่อสภาพการเลี้ยงใหม่เป็นเวลา 1 สัปดาห์ก่อนทำการทดลอง โดยการทดลองในสัตว์ทดลองได้รับการรับรองจากคณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและใช้สัตว์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เลขที่ใบรับรอง 07/2561

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

การแบ่งกลุ่มสัตว์ทดลอง

เนื่องจากรูปแบบงานวิจัยเป็นการทดลองศึกษาผลของว่านหางจระเข้ในการรักษาแผลในหนูที่เป็นเบาหวาน โดยมีการศึกษาทางพยาธิวิทยา เพื่อดูการเกิด re-epithelialization ดังนั้นขนาดตัวอย่างจึงอ้างอิงจากการศึกษาอื่นก่อนหน้านี้ที่มีลักษณะใกล้เคียงกัน[11] ใช้โปรแกรม G*Power ใน

การกำหนดขนาดตัวอย่าง และจำนวนกลุ่มของสัตว์ทดลอง ในงานวิจัยจะแบ่งออกเป็น 5 กลุ่ม ผลลัพธ์จากการคำนวณได้ขนาดตัวอย่างทั้งหมดเท่ากับ 25 ตัว จึงแบ่งกลุ่มสัตว์ทดลองให้มีจำนวน 5 ตัวต่อกลุ่ม (รูปที่ 6) เนื่องจากมีความจำเป็นในการศึกษาการหายของแผลใน 2 ช่วงเวลาคือ 7 และ 14 วัน จึงต้องใช้หนูจำนวนทั้งหมด 10 ตัวต่อกลุ่ม ดังนั้นในงานวิจัยชิ้นนี้จึงจำเป็นต้องใช้หนูทั้งหมด 50 ตัว



รูปที่ 6 แสดงวิธีคำนวณหาขนาดตัวอย่างทั้งหมดจากโปรแกรม G*Power

โดยสัตว์ทดลองแบ่งออกเป็น 5 กลุ่ม ดังต่อไปนี้

1) กลุ่มควบคุมที่ได้รับ fibrin gel (Control + fibrin gel) (N=10) ได้แก่หนูที่ฉีด citrate buffer (45 mg/kg) โดยฉีดทางช่องท้องวันละครั้งติดต่อกัน 5 วัน และทำ wound model จากนั้นให้ fibrin gel ที่บริเวณ wound bed แล้วเลี้ยงตามปกติจนถึงวันที่นำมาทำการศึกษา

* Fibrin gel เป็นเสมือน vehicle ของ EPCs ซึ่งประกอบไปด้วย 20 µl fibrinogen และ 20 µl thrombin

2) กลุ่มหนูเบาหวานที่ได้รับ fibrin gel (DM + fibrin gel) (N=10) ได้แก่หนูที่ถูกเหนี่ยวนำ

ให้เป็นเบาหวานชนิดที่ 1 โดยการฉีด STZ (45 mg/kg) ทางช่องท้องวันละครั้งติดต่อกัน 5 วันและทำ wound model จากนั้นให้ fibrin gel ที่บริเวณ wound bed แล้วเลี้ยงตามปกติจนถึงวันที่นำมาทำการศึกษา

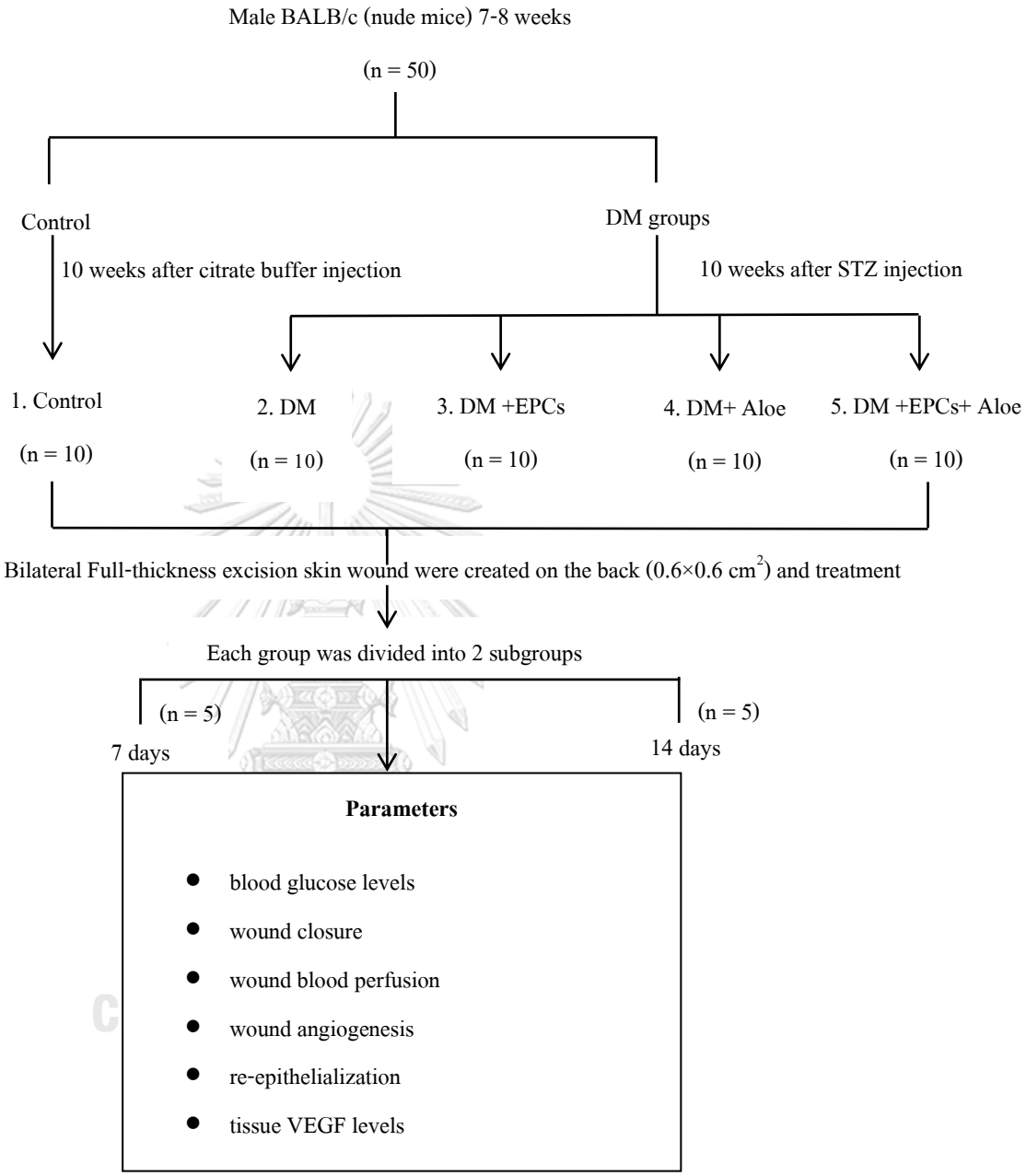
3) กลุ่มหนูเบาหวานที่ได้รับ fibrin gel และ EPCs (DM + fibrin gel + EPCs) (N=10) โดยทำการฉีด STZ (45 mg/kg) ทางช่องท้องวันละครั้งติดต่อกัน 5 วัน และทำ wound model จากนั้นให้ fibrin gel ที่มีเซลล์ EPCs ปริมาณ $1x10^6$ cells ที่บริเวณ wound bed แล้วเลี้ยงตามปกติจนถึงวันที่นำมาทำการศึกษา[36]

4) กลุ่มหนูเบาหวานที่ได้รับ fibrin gel และ Aloe vera (DM + fibrin gel + *Aloe vera*) (N=10) โดยทำการฉีด STZ (45 mg/kg) ทางช่องท้องวันละครั้งติดต่อกัน 5 วัน และทำ wound model จากนั้นให้ fibrin gel ที่บริเวณ wound bed ร่วมกับให้กิน *Aloe vera* ในขนาด 400 mg/kg/day โดยแบ่งให้กินวันละ 2 ครั้ง ทุกวันจนถึงวันที่นำมาศึกษา

5) กลุ่มหนูเบาหวานที่ได้รับ fibrin gel และ EPCs และ Aloe vera (DM + fibrin gel + EPCs + *Aloe vera*) (N=10) โดยทำการฉีด STZ (45 mg/kg) ทางช่องท้องวันละครั้งติดต่อกัน 5 วัน และทำ wound model จากนั้นให้ fibrin gel ที่มีเซลล์ EPCs ปริมาณ $1x10^6$ cells ที่บริเวณ wound bed ร่วมกับให้กิน *Aloe vera* ในขนาด 400 mg/kg/day โดยแบ่งให้กินวันละ 2 ครั้ง ทุกวันจนถึงวันที่นำมาศึกษา

*หนูทุกกลุ่มถูกแบ่งเป็นกลุ่มย่อยเพื่อนำมาศึกษาเมื่อครบ 7 และ 14 วัน (N=5 ในแต่ละกลุ่ม) หลังจากทำ wound model เพื่อทำการเก็บข้อมูลและวิเคราะห์ผลดังนี้

- ระดับน้ำตาลในเลือด (blood glucose levels)
- การปิดของแผล (wound closure)
- การไหลเวียนของเลือดที่แผล (wound blood perfusion)
- การเกิดหลอดเลือดใหม่ที่แผล (wound angiogenesis)
- ด้านพยาธิวิทยาเพื่อดูการสร้างเนื้อเยื่อบุผิวขึ้นมาใหม่ (histopathological study; re-epithelialization)
- ระดับของ VEGF จากเนื้อเยื่อแผล (tissue VEGF levels)



รูปที่ 7 แสดงแผนภาพการออกแบบการทดลอง

การเตรียมสาร STZ เพื่อเหนี่ยวนำหนูให้เป็นเบาหวานชนิดที่ 1

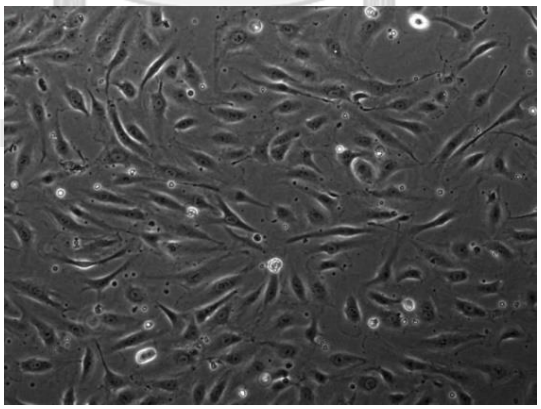
เตรียมสาร STZ (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, USA) ในปริมาณ 45 mg/kg ละลายใน 0.05M citrate buffer pH 4.5 (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, USA) ซึ่งใช้ฉีดทางช่องท้องของหนูวันละครั้งติดต่อกัน 5 วัน โดยเตรียมใหม่วันต่อวัน[36]

การเหนี่ยวนำหนูให้เป็นเบาหวานชนิดที่ 1

อดอาหารสัตว์ทดลองเป็นเวลา 6-8 ชั่วโมง แล้วนำมาชั่งน้ำหนักเพื่อคำนวณหาปริมาณสาร STZ ที่จะใช้ฉีด โดยใช้ STZ ในปริมาณ 45 mg/kg ละลายใน 0.05M citrate buffer pH 4.5 ซึ่งฉีดทางช่องท้องหนูวันละครั้งติดต่อกัน 5 วัน หลังจากเหนี่ยวนำให้หนูเป็นเบาหวานไปแล้ว 2 สัปดาห์นับจากวันสุดท้ายของการฉีด STZ ทำการตรวจน้ำตาลในเลือดหลังจากที่สัตว์ทดลองกินอาหารไปแล้ว 2 ชั่วโมง (two-hour postprandial blood sugar) ด้วยเครื่อง glucometer โดยสัตว์ทดลองที่อยู่ในเกณฑ์ต้องมีระดับน้ำตาลในเลือดสูงกว่า 200 mg/dl[36] จึงนำเข้ากลุ่มการทดลอง จากนั้นรอจนครบ 8 สัปดาห์ ซึ่งเป็นระยะเวลาที่ก่อให้เกิดความผิดปกติที่หลอดเลือดและภาวะแทรกซ้อนที่เกิดขึ้นจากโรคเบาหวาน[49, 50] แล้วจึงนำมาทำการทดลองต่อไป

การเตรียมเซลล์ EPCs (สำหรับ implant ใน wound)

โดยเซลล์ human EPCs ที่นำมาใช้ในงานวิจัยคือ HUVECs (ATCC, Manassas, USA) (รูปที่ 8) ได้รับความอนุเคราะห์จากหน่วยวิจัยห้องปฏิบัติการเซลล์ต้นกำเนิดและเซลล์บำบัด คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยเซลล์ HUVECs ทำการเพาะเลี้ยงด้วย endothelial cell growth medium 2 (Lonza Group Ltd, Basel, Switzerland) ผสมกับ penicillin-streptomycin (P/S) 1% เลี้ยงในตู้ incubator 5% CO_2 ที่ 37°C



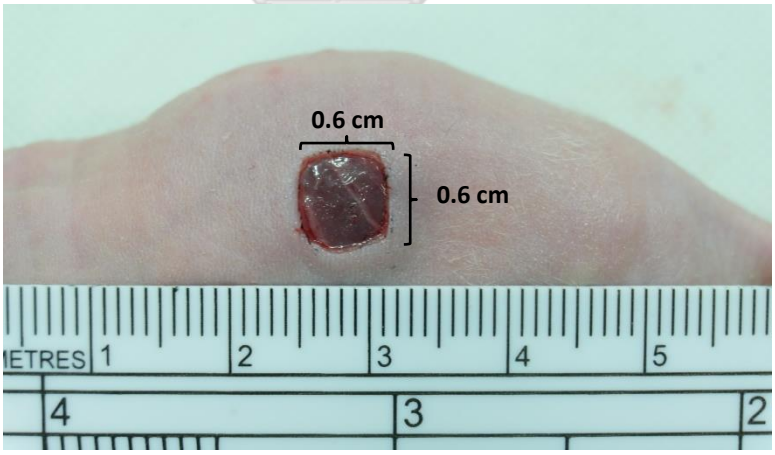
รูปที่ 8 แสดงรูปร่างของ HUVECs ในระหว่างการเลี้ยงเซลล์ด้วยภาพกำลังขยาย 100 เท่า

การเตรียม Aloe vera

โดยการผสม *Aloe vera* ชนิด powder ในขนาด 400 mg/kg/day (Naturex Inc., South Hackensack, USA) ละลายในน้ำกลั่นปริมาณ 0.2 ml โดยแบ่งให้กินวันละ 2 ครั้ง ทุกวันหลังจากที่ทำให้เกิดแผลจนถึงวันที่นำมาศึกษา (7 และ14 วัน) โดยเตรียมใหม่ทุกครั้งก่อนให้หนูกิน[11] *Aloe vera* powder ที่นำมาใช้ สกัดจาก Aloe barbadensis fresh leave มีโลหะหนักปนเปื้อน <10 ppm วัดปริมาณสารออกฤทธิ์ด้วยเทคนิค HPLC และ Batch No. คือ C313/011/A16

การทำให้เกิดแผลชนิด full-thickness wound model

เมื่อครบ 10 สัปดาห์หลังเหนี่ยวนำให้เกิดเบาหวาน ทำการสลบหนูทดลองด้วย sodium pentobarbital 55 mg/kg ทางช่องท้อง โดยการ swab ด้วย alcohol จากนั้นทำให้เกิดแผลชนิดที่ถูกตัดจนถึงชั้นไขมันที่บริเวณผิวหนังทั้งสองข้างจากแนวหลังของหนู (bilateral full-thickness excisional wound) ขนาด 0.6×0.6 cm^2 (รูปที่ 9) จากนั้นใส่ fibrin gel ที่ประกอบไปด้วย 20 µl fibrinogen และ 20 µl thrombin หรือ fibrin gel ที่มี EPCs ตามการแบ่งกลุ่มเบื้องต้นที่บริเวณ wound bed แล้วปิดด้วย tegaderm เมื่อครบ 7 และ 14 วันหลังจากทำ wound model เก็บข้อมูลวิเคราะห์ผลต่อไป[36]



รูปที่ 9 แสดงการทำให้หนูเกิดแผลชนิด full-thickness excisional wound ขนาด 0.6×0.6 cm^2

วิธีการเก็บและวิเคราะห์ข้อมูล

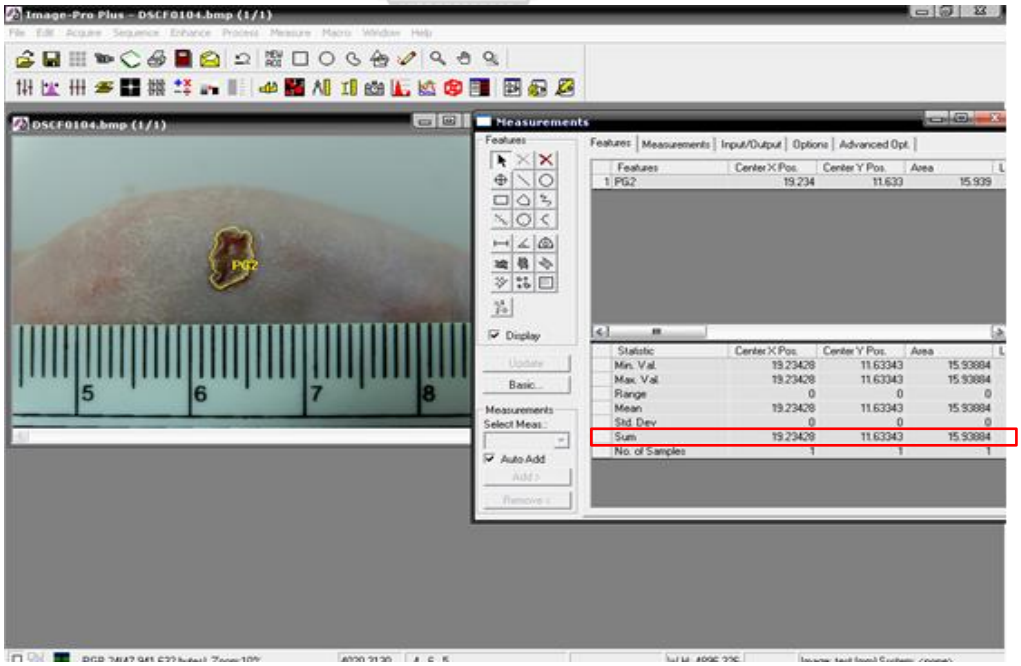
1) ตรวจวัดระดับน้ำตาลในเลือด (Blood glucose levels)

ทำการตรวจระดับน้ำตาลในเลือดก่อนทำให้เกิดแผล และเมื่อครบ 7 และ 14 วัน หลังทำให้เกิดแผลโดยตรวจหลังจากที่หนูกินอาหารไปแล้ว 2 ชั่วโมง (two-hour postprandial blood sugar) ด้วยเครื่อง glucometer โดยใช้เลือด 1 หยด ที่เก็บจากหลอดเลือดดำที่ปลายหางของหนูแล้วหยดลงบนแผ่น control strip สำหรับเสียบเข้าเครื่อง

2) ศึกษาการปิดของแผล (Wound closure analysis)

เมื่อครบ 7, 14 วันหลังทำให้เกิดแผล ทำการสลบหนูด้วย sodium pentobarbital 55 mg/kg ทางช่องท้อง ทำการถ่ายภาพขนาดของแผลด้วยกล้องดิจิตอล (Fujifilm XA2, Tokyo, Japan) แล้วนำมาวัดขนาดพื้นที่แผลด้วยโปรแกรม Image Pro Plus 6.1 (รูปที่ 10) โดยหาอัตราการปิดของแผล (percentage of wound closure) ซึ่งคำนวณได้จาก

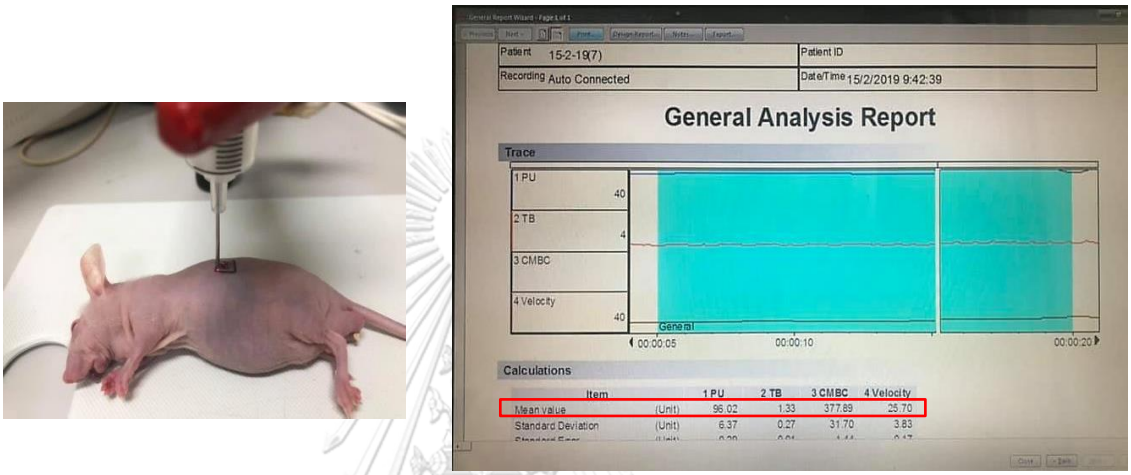
$$\% \text{ wound closure} = \frac{\text{area of the original wound - area of the actual wound}}{\text{area of the original wound}} \times 100$$



รูปที่ 10 แสดงวิธีการวัดขนาดพื้นที่แผลด้วยโปรแกรม Image Pro Plus 6.1

3) ศึกษาการไหลเวียนของเลือดบริเวณแผล (Wound blood perfusion)

เมื่อครบ 7 และ 14 วันหลังทำให้เกิดแผล วัดการไหลเวียนของเลือด 8 ตำแหน่งรอบพื้นที่ของแผล ด้วยเครื่อง laser doppler flowmetry โดยวาง probe ห่างจากบริเวณแผลประมาณ 1 mm และวัดแต่ละตำแหน่งนาน 15 วินาที นำไปวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม General Report Wizard ซึ่งจะแสดงออกมาในหน่วย Perfusion Unit (PU) (รูปที่ 11)



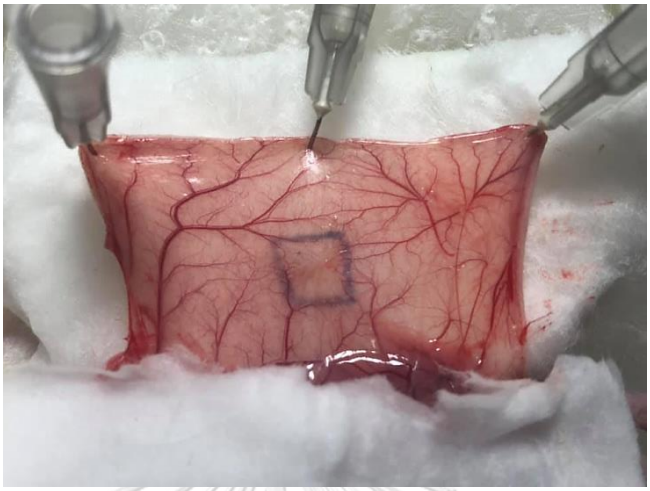
รูปที่ 11 แสดงการวัดการไหลเวียนของเลือดและนำไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม General Report Wizard

4) ศึกษาการเกิดหลอดเลือดใหม่บริเวณแผล (Wound angiogenesis)

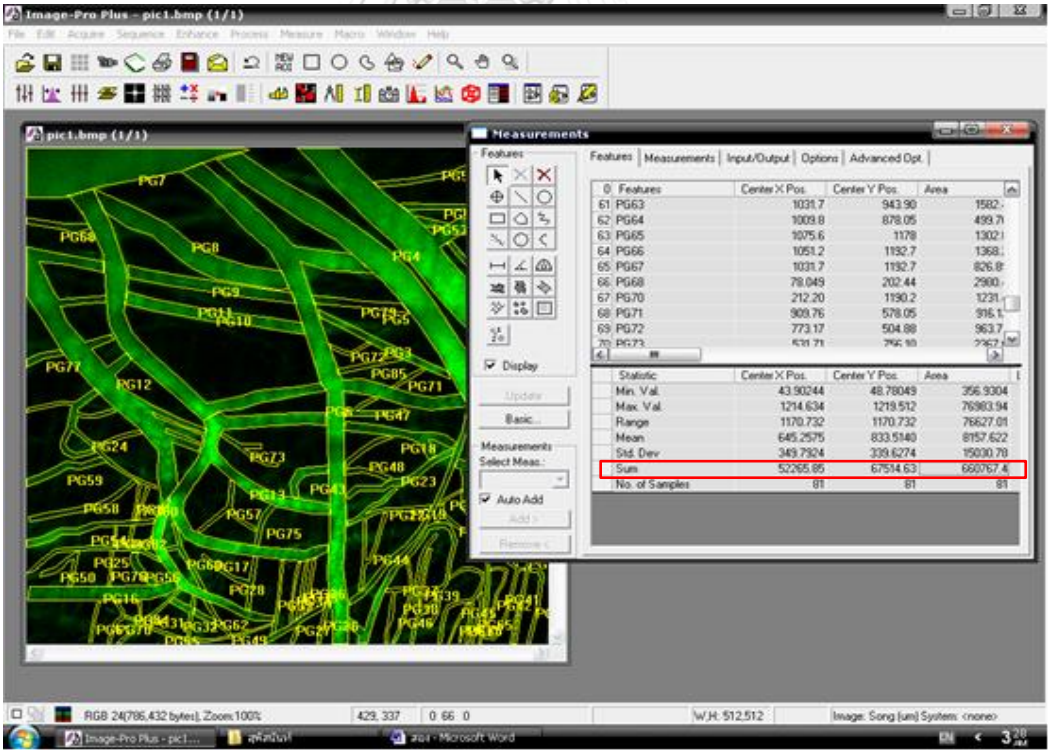
เมื่อครบ 7 และ 14 วันหลังทำให้เกิดแผล หลังจากวัดการไหลเวียนของเลือดบริเวณแผลเสร็จ นำหนูมาตรวจสอบการเกิดหลอดเลือดใหม่โดยจัดหนูให้อยู่ในท่านอนหงายและทำการสอด polyethylene catheter ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.28 mm เข้าทาง right jugular vein สำหรับฉีดสาร fluorescein isothiocyanate labeled dextran-150 (FITC-DX-150, Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, USA) ในปริมาณ 0.1 ml เพื่อ label plasma จากนั้นใช้กรรไกรเปิดผิวหนังบริเวณหลังของหนูออกและนำไปวางที่ stage (รูปที่ 12) เพื่อบันทึกผลการเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือดขนาดเล็ก โดยใช้หัวขนาด 10x ภาพของหลอดเลือดจะถูกบันทึกโดย video camera และ video recorder ซึ่งจะต่อกับ fluorescence microscope โดยข้อมูลวีดิโอที่บันทึกได้จะแสดงผลออกทางหน้าจอและจะนำมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Image Pro Plus 6.1 (รูปที่ 13) เพื่อหา percentage of capillary vascularity[36] โดย capillary ต้องมีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาดเล็กกว่า 15 µm

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

$$\% \text{ Capillary vascularity} = \frac{\text{Number of pixels within the capillaries}}{\text{Total number of pixels within the selected area}} \times 100$$



รูปที่ 12 แสดงหลอดเลือดบริเวณแผลเมื่อเปิดผิวหนังบริเวณหลัง

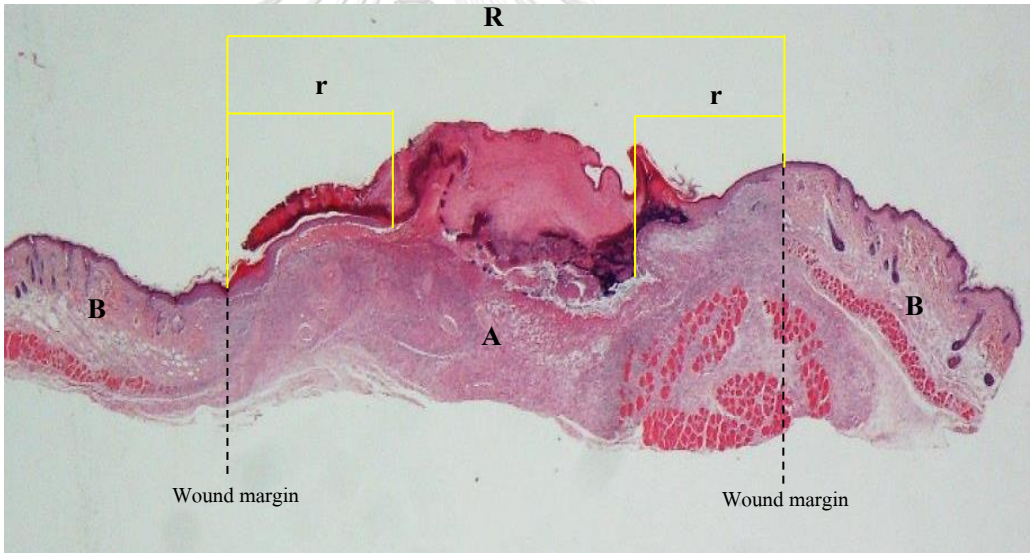


รูปที่ 13 แสดงวิธีการวัดขนาดของหลอดเลือดด้วยโปรแกรม Image Pro Plus 6.1

5) ศึกษาทางด้านพยาธิวิทยา (Histopathological study)

เมื่อครบ 7 และ 14 วันหลังทำให้เกิดแผล ทำการเก็บชิ้นเนื้อบริเวณแผลด้านซ้ายขนาด 0.6 x 0.6 cm^2 นำชิ้นเนื้อแผลแช่ใน 10% formaldehyde เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และทำ paraffin-embedded tissue จากนั้นนำมาตัดที่ความหนา 4 μm ทำการย้อมด้วย hematoxylin eosin (H&E) เพื่อดูการเกิด re-epithelialization โดยใช้กล้อง Stereo type microscope (Nikon SMZ800, Japan) (รูปที่ 14) และนำไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Image Pro Plus 6.1 เพื่อหา percentage of re-epithelialization ซึ่งคำนวณได้จาก

$$\% \text{ re-epithelialization} = \frac{\text{Distance covered by epithelium (r)} \times 100}{\text{Distance from the original (R)}}$$



รูปที่ 14 แสดงการวิเคราะห์ทางพยาธิวิทยา ด้วยการย้อมชิ้นเนื้อแผลด้วย H&E เพื่อดูการเกิด re-epithelialization ในวันที่ 7 หลังทำให้เกิดแผล โดย r คือบริเวณที่มีการสร้าง epithelium ขึ้นมาใหม่เคลื่อนที่มาปกคลุม granulation tissue จากด้านซ้ายและขวาของขอบแผลเข้าสู่กึ่งกลางแผล R คือบริเวณแผลทั้งหมด A คือ granulation tissue และ B คือบริเวณที่มี fibroblast blood supply network collagen fiber และต่อมไขมัน

6) วัดระดับของ VEGF จากเนื้อเยื่อแผลโดยวิธี Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

เมื่อครบ 7 และ 14 วันหลังทำให้เกิดแผล ทำการวัดปริมาณ VEGF จากเนื้อเยื่อแผล โดยเก็บเนื้อเยื่อบริเวณแผลด้านขวาของหนูที่อุณหภูมิ –80°C และเมื่อต้องการหาโปรตีน นำชิ้นเนื้อปริมาณ 50 mg มาทำการสกัดโปรตีนโดยการบดชิ้นเนื้อและใส่ RIPA lysis buffer (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, USA) ทำการย่อยด้วย Protease inhibitor (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, USA) จากนั้นนำไปทำ sonication และนำมาปั่นที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บในรูปแบบของ supernatant เพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนจากชิ้นเนื้อ และ ระดับของ VEGF ด้วยวิธี Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit by R&D system

6.1 การหาปริมาณโปรตีนจากชิ้นเนื้อ

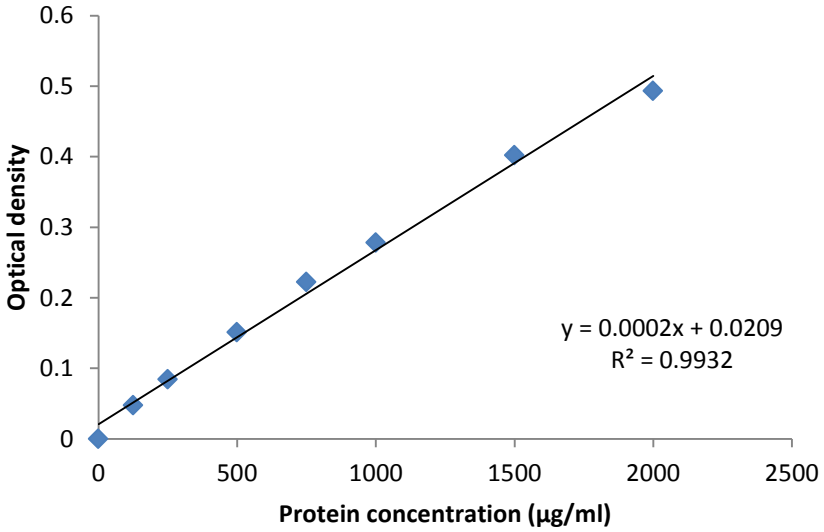
นำโปรตีนที่สกัดได้จากชิ้นเนื้อในรูปของ supernatant มาวิเคราะห์ด้วยชุดน้ำยา Microplate BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA) โดยใช้สารละลาย bovine serum albumin (BSA) เป็นสารละลายโปรตีนมาตรฐานสำหรับทำกราฟมาตรฐาน (standard curve) โดยนำตัวอย่างโปรตีนที่สกัดได้จากชิ้นเนื้อ และสารละลายมาตรฐานอย่างละ 9 µl/well เติมลงไปตรงกลาง plate ตามด้วยสารละลาย compatibility 4 µl/well จากนั้นปิด plate นำไปทำการผสมด้วย plate shaker และ incubate ที่ 37° C ทิ้งไว้นาน 15 นาที จากนั้นเติม BCA working reagent 260 µl/well และนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 562 nm ด้วยเครื่อง micropalte reader นำค่าที่อ่านได้ไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Microsoft excel โดยปริมาณของโปรตีนแสดงในหน่วย ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (µg/ml) (ตารางที่ 3 และ รูปที่ 15)

โดยปริมาณโปรตีนที่หาได้ในแต่ละชิ้นเนื้อแผลจะถูกนำไปใช้ในการคำนวณระดับของ VEGF ซึ่งจะแสดงในหน่วยพิโคกรัมต่อมิลลิกรัมโปรตีน (pg/mg protein)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ตารางที่ 3 แสดงค่าดูดกลืนแสงที่อ่านได้สำหรับนำไปวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน

Protein (µg/ml)	Optical density			
	I	II	average	corrected
2000	0.606	0.612	0.609	0.4935
1500	0.509	0.526	0.518	0.402
1000	0.388	0.399	0.394	0.278
750	0.333	0.343	0.338	0.223
500	0.263	0.27	0.267	0.151
250	0.199	0.201	0.200	0.085
125	0.160	0.166	0.163	0.0475
0	0.114	0.117	0.116	0



รูปที่ 15 แสดงการคำนวณค่าดูดกลืนแสงที่อ่านได้สำหรับนำไปวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน

6.2 การวัดระดับของ VEGF ด้วยวิธี ELISA

ทำการเตรียม plate โดยเติม capture antibody 100 µl/well ทำการปิด plate และ บ่มทิ้งไว้ค้างคืน ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นทำการล้าง plate ด้วย wash buffer 400 µl/well ทำซ้ำสามครั้ง แล้วทำการ block plate ด้วย reagent diluent 400 µl/well บ่มเป็นระยะเวลาอย่างน้อย 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง และล้าง plate ด้วย wash buffer 400 µl/well ซ้ำอีกสามครั้ง

เติมโปรตีนที่สกัดได้จากชิ้นเนื้อ และสารละลายมาตรฐานอย่างละ 100 µl/well ลง plate ปิด plate และ บ่มเป็นระยะ 2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง ล้าง plate ด้วย wash buffer 400 µl/well ซ้ำอีกสามครั้ง แล้วเติม detection Antibody 100 µl/well ปิด plate และบ่มเป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง ล้าง plate ด้วย wash buffer 400 µl/well ซ้ำอีกสามครั้ง จากนั้นเติม streptavidin-HRP 100 µl/well ปิด plate และบ่มเป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้องในที่มืด ล้าง plate ด้วย wash buffer 400 µl/well ซ้ำอีกสามครั้ง เติม substrate solution 100 µl/well ปิด plate และบ่มเป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้องในที่มืด แล้วเติม stop Solution 50 µl/well ตบ plate อย่างเบาๆ เพื่อให้สารผสมกัน และนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 450 ถึง 570 nm ด้วยเครื่อง micropalte reader นำค่าที่อ่านได้ไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Graph pad prism โดยระดับของ VEGF จากชิ้นเนื้อแผล จะแสดงในหน่วยพิโคกรัมต่อมิลลิกรัมโปรตีน (pg/mg protein)

การวิเคราะห์ข้อมูล (Data analysis)

ผลการทดลองถูกแสดงออกโดยค่า mean ± SD ทำการวิเคราะห์ข้อมูลในแต่ละกลุ่มด้วยวิธี one-way ANOVA และทำการเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มการทดลองด้วย Bonferroni's post hoc multiple test ซึ่งค่าแตกต่างถือว่ามีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p<0.05$) โดยกำหนดให้

* $p < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม Control ** $p < 0.01$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม Control

# $p < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม DM ## $p < 0.01$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม DM

† $p < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม DM + EPCs †† $p < 0.01$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม DM + EPCs

ð $p < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม DM + Aloe ðð $p < 0.01$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม DM + Aloe

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 4
ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

การวิจัยครั้งนี้เป็นการศึกษาการหายของแผลและการเกิดหลอดเลือดใหม่ในหนูที่เป็นเบาหวานหลังจากให้กินว่านหางจระเข้ร่วมกับการปลูกถ่าย EPCs โดยแบ่งผลการทดลองออกเป็น 6 ส่วน ดังนี้

ผลระดับน้ำตาลในเลือด (Blood glucose levels)

ทั้งในวันที่ 7 และ 14 หลังทำให้เกิดแผลพบว่า ผลของระดับน้ำตาลในเลือดในกลุ่ม DM และ DM+EPCs เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่ม Control แต่กลุ่มที่ได้รับว่านหางจระเข้คือ กลุ่ม DM+Aloe และกลุ่ม DM+EPCs+Aloe พบว่าระดับน้ำตาลในเลือดไม่ต่างกับกลุ่ม Control นอกจากนี้ผลของระดับน้ำตาลในเลือดในกลุ่ม DM+Aloe และกลุ่ม DM+EPCs+Aloe หลังจากที่ได้รับว่านหางจระเข้ ระดับน้ำตาลในเลือดลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่ม DM และกลุ่ม DM+EPCs ดังแสดงในตารางที่ 4 และ รูปที่ 16

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 4 ระดับน้ำตาลในเลือดของหนูเบาหวานในวันที่ 7 และวันที่ 14 หลังจากให้กินว่านหางจระเข้ ปลูกถ่าย EPCs หรือได้รับร่วมกัน

Group	**Blood glucose levels (mg/dl)**	
	Day 7	**Day 14**
Control	105.00 ± 10.09	113.60 ± 6.97
	N=5	N=5
DM	317.00 ± 36.97 **	384.75 ± 20.54 **
	N=5	N=4
DM + EPCs	313.20 ± 27.70 **	307.00 ± 34.64 **
	N=5	N=5
DM + Aloe	197.80 ± 26.48 #,†	148.60 ± 32.95 ##,††
	N=5	N=5
DM + EPCs +Aloe	179.60 ± 23.20 #,†	140.60 ± 13.40 ##,††
	N=5	N=5

** $p < 0.01$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม Control

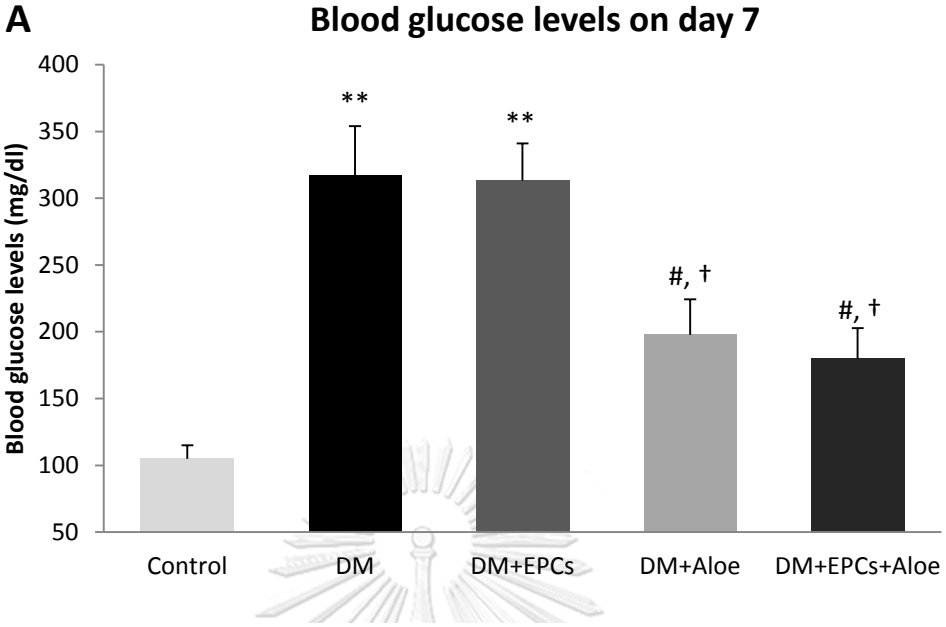
# $p < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม DM

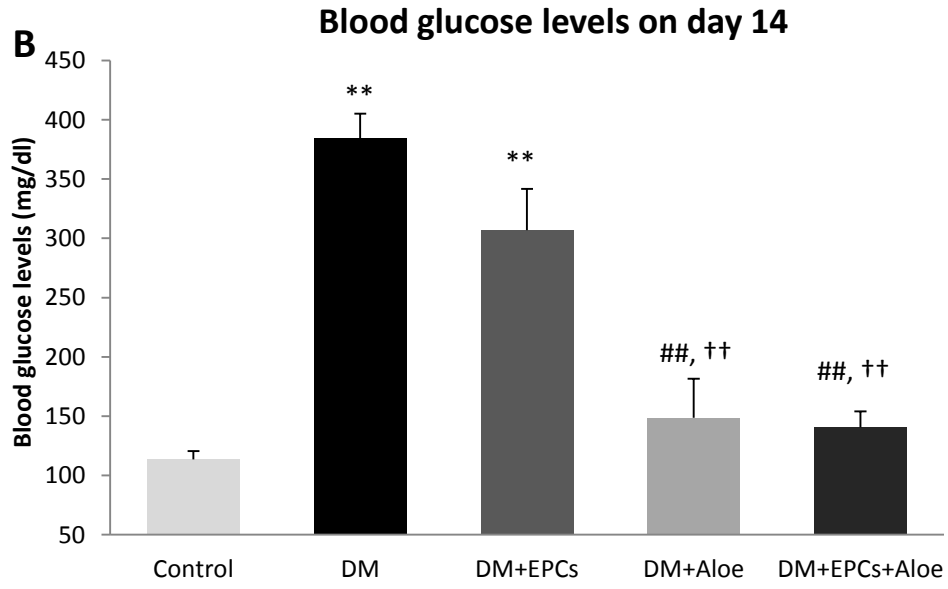
$p < 0.01$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม DM

† $p < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม DM + EPCs

†† $p < 0.01$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม DM + EPCs

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University





รูปที่ 16 แสดงผลระดับน้ำตาลในเลือดของหนูเบาหวานหลังให้กินว่านหางจระเข้ ปลูกถ่าย EPCs หรือได้รับร่วมกัน ในวันที่ 7 (รูปที่ 16A) และวันที่ 14 (รูปที่ 16B)

** $p < 0.01$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม Control

$p < 0.01$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม DM

# $p < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม DM

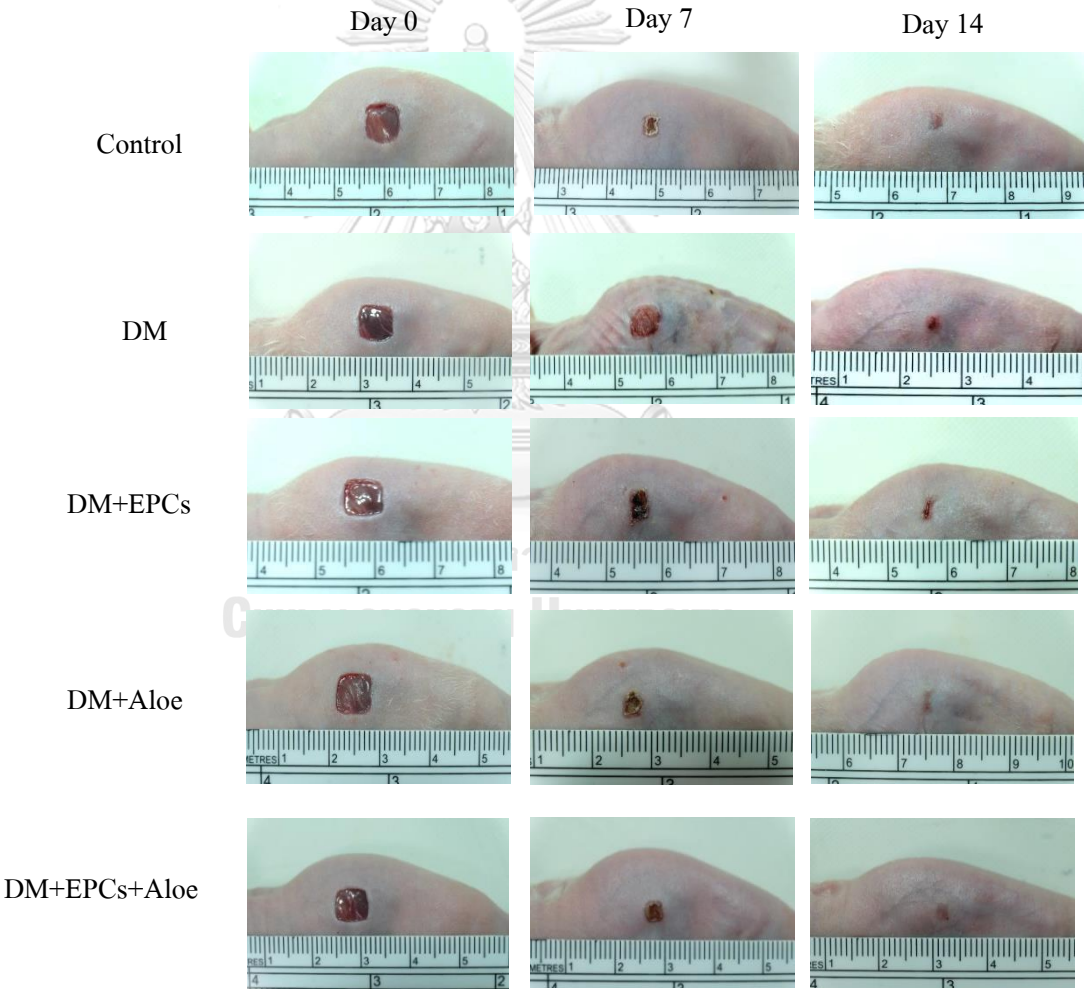
†† $p < 0.01$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม DM + EPCs

† $p < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม DM + EPCs

ผลการปิดของแผล (Percentage of wound closure)

ทั้งในวันที่ 7 และ 14 หลังทำให้เกิดแผลพบว่า กลุ่ม DM มีการปิดของแผลน้อยกว่ากลุ่ม Control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และกลุ่มที่ได้รับการรักษาทั้งสามกลุ่มได้แก่ กลุ่มเบาหวานที่ได้รับ EPCs หรือ Aloe หรือทั้งสองอย่างร่วมกัน มีการปิดของแผลไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่ม Control

นอกจากนี้กลุ่มที่ได้รับการรักษาทั้งสามกลุ่มมีการปิดของแผลเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่ม DM และไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างการรักษาทั้งสามกลุ่ม ดังแสดงในตารางที่ 5 และ รูปที่ 18



รูปที่ 17 แสดงการเปลี่ยนแปลงของแผลในวันที่ 0, 7 และ 14 หลังทำให้เกิดแผลในกลุ่มทดลองทั้ง 5 กลุ่ม

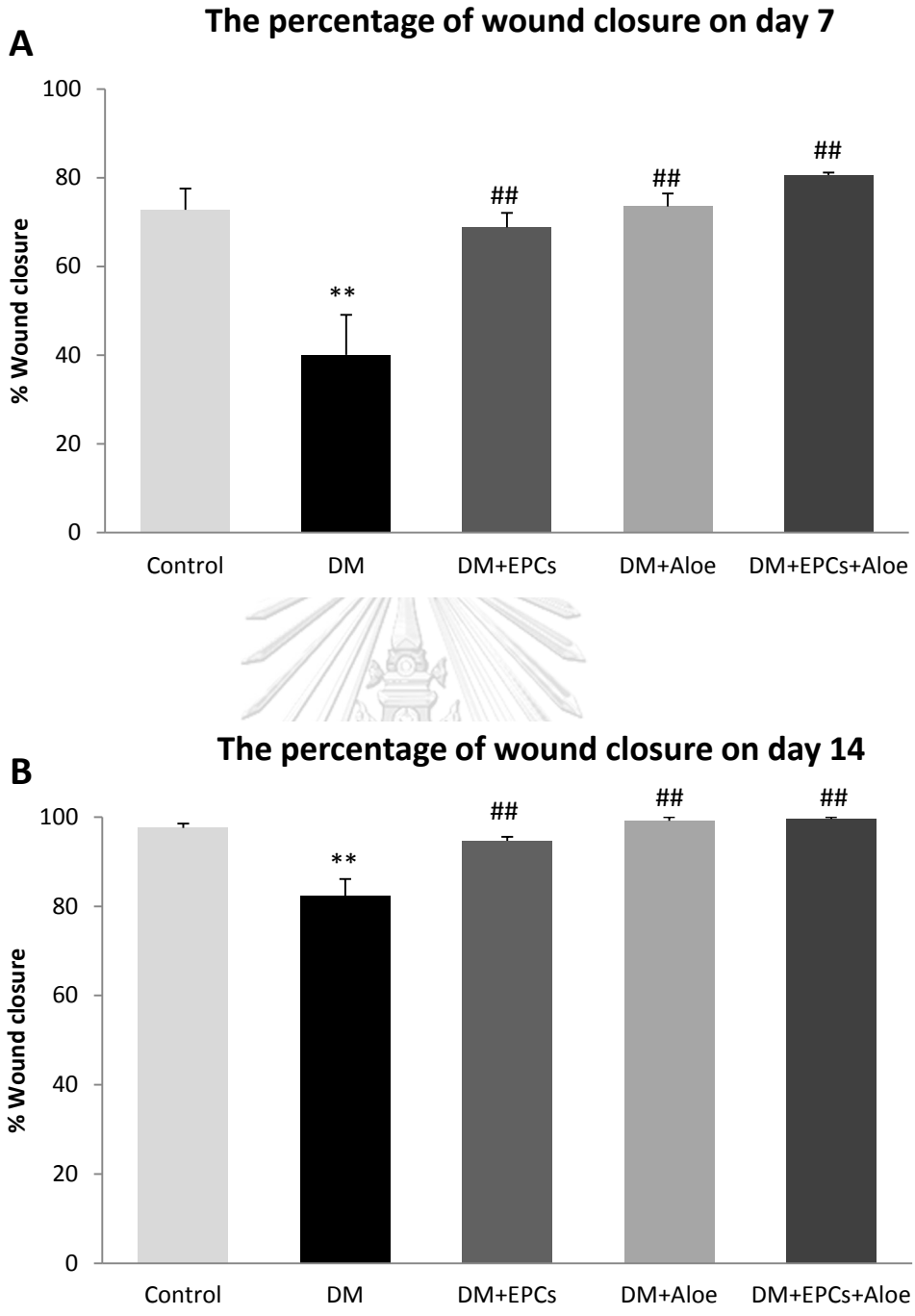
ตารางที่ 5 แสดงค่า Means ± SD ของผลการปิดของแผลในวันที่ 7 และวันที่ 14 ในหนูเบาหวานที่ให้กินว่านหางจระเข้ ปลูกถ่าย EPCs หรือได้รับร่วมกัน

Group	**%Wound Closure**	
	Day 7	**Day 14**
Control	72.80 ± 4.80	97.60 ± 0.98
	N=5	N=5
DM	40.07 ± 9.02 **	82.25 ± 3.84 **
	N=5	N=5
DM + EPCs	68.80 ± 3.31 ##	94.70 ± 0.89 ##
	N=5	N=5
DM + Aloe	73.52 ± 2.95 ##	99.20 ± 0.80 ##
	N=5	N=5
DM + EPCs +Aloe	80.60 ± 0.60 ##	99.60 ± 0.40 ##
	N=5	N=5

** $p < 0.01$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม Control

$p < 0.01$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม DM

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY



รูปที่ 18 แสดง % wound closure ในวันที่ 7 (รูปที่ 18A) และ วันที่14 (รูปที่ 18B) ในหนูเบาหวานที่ให้กินว่านหางจระเข้ ปลูกถ่าย EPCs หรือได้รับร่วมกัน

** $p < 0.01$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม Control

$p < 0.01$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม DM

ผลการไหลเวียนของเลือดบริเวณแผล (Wound blood perfusion)

ทั้งในวันที่ 7 และ 14 หลังทำให้เกิดแผลพบว่า กลุ่ม DM มีการไหลเวียนของเลือดลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่ม Control แต่กลุ่มที่ได้รับการรักษาทั้งสามกลุ่มได้แก่ กลุ่มเบาหวานที่ได้รับ EPCs หรือ Aloe หรือทั้งสองอย่างร่วมกัน มีการไหลเวียนของเลือดบริเวณแผลไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่ม Control

และในวันที่ 7 ในกลุ่มที่ได้รับการรักษาทั้งสามกลุ่ม มีการไหลเวียนของเลือดบริเวณแผลเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่ม DM นอกจากนี้กลุ่มที่ได้รับ Aloe ร่วมกับ EPCs มีการไหลเวียนของเลือดบริเวณแผลเพิ่มขึ้นอย่างนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ EPCs เพียงอย่างเดียว ดังแสดงในตารางที่ 6 และ รูปที่ 19A

ในวันที่ 14 หลังทำให้เกิดแผลพบว่า กลุ่ม Control และกลุ่มเบาหวานที่ได้รับการรักษาทั้งสามกลุ่ม มีการไหลเวียนของเลือดบริเวณแผลเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่ม DM นอกจากนี้กลุ่มที่ได้รับ Aloe ร่วมกับ EPCs มีการไหลเวียนของเลือดบริเวณแผลเพิ่มขึ้นอย่างนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ EPCs หรือ Aloe เพียงอย่างเดียว ดังแสดงในตารางที่ 6 และ รูปที่ 19B

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ตารางที่ 6 แสดงค่า Means ± SD ของการไหลเวียนของเลือดบริเวณแผลในวันที่ 7 และ วันที่ 14 ในหนูเบาหวานที่ให้กินว่านหางจระเข้ ปลูกถ่าย EPCs หรือได้รับร่วมกัน

Group	Wound blood perfusion	
	Day 7	**Day 14**
Control	122.10 ± 8.65	113.60 ± 4.48
	N=5	N=5
DM	87.70 ± 3.21**	79.00 ± 5.74 **
	N=5	N=4
DM + EPCs	116.60 ± 5.59 ##	110.70 ± 5.53 ##
	N=5	N=5
DM + Aloe	122.00 ± 2.05 ##	109.60 ± 1.69 ##
	N=5	N=5
DM + EPCs + Aloe	140.80 ± 0.37 ##,†	132.80 ± 3.99 ##,†,ð
	N=5	N=5

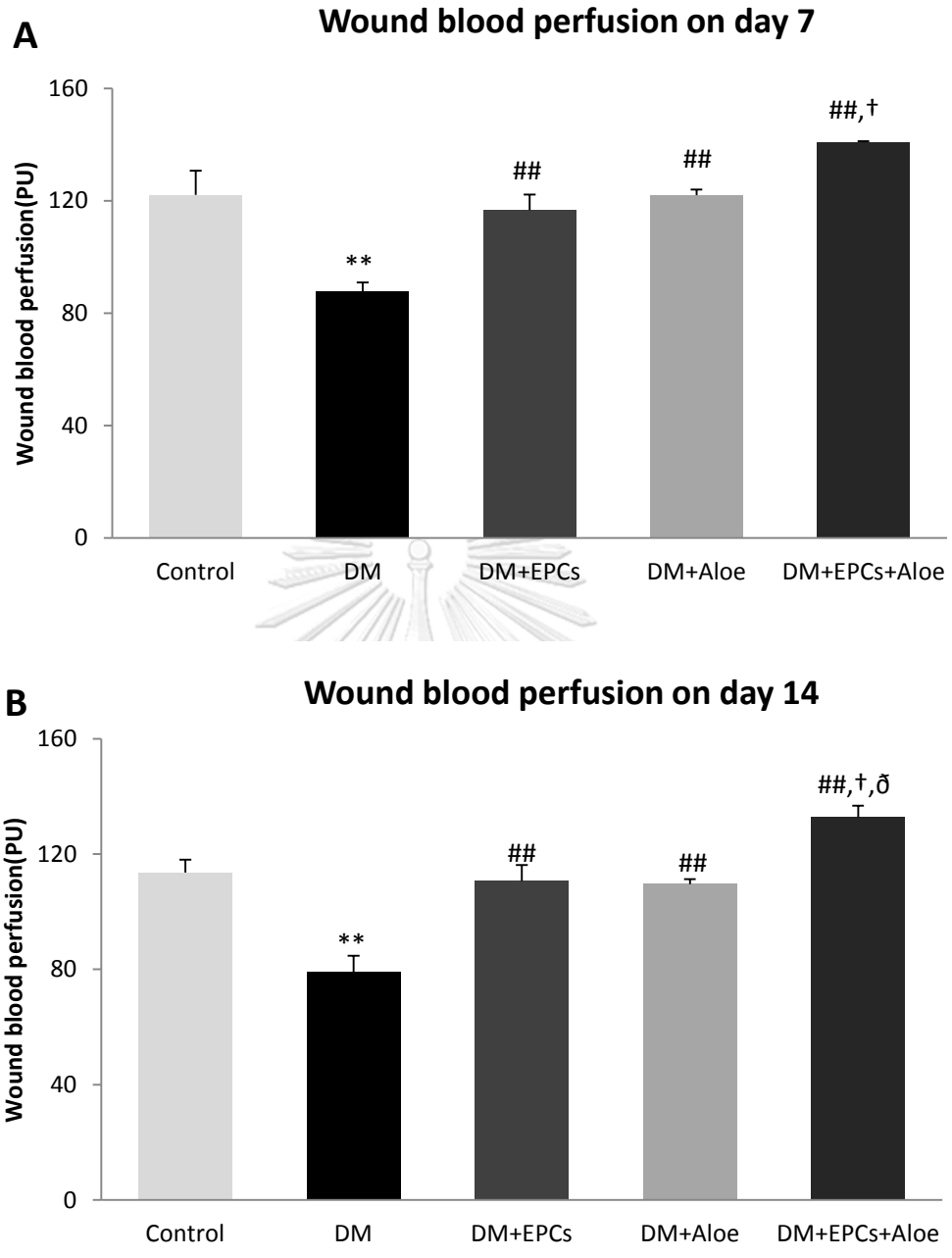
** $p < 0.01$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม Control

$p < 0.01$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม DM

† $p < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม DM + EPCs

ð $p < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม DM + Aloe

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



รูปที่ 19 แสดงผลการไหลเวียนของเลือดบริเวณแผลในวันที่ 7 (รูปที่ 19A) และ วันที่ 14 (รูปที่ 19B) ในหนูเบาหวานที่ให้กินว่านหางจระเข้ ปลูกถ่าย EPCs หรือได้รับร่วมกัน

** $p < 0.01$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม Control

$p < 0.01$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม DM

† $p < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม DM + EPCs

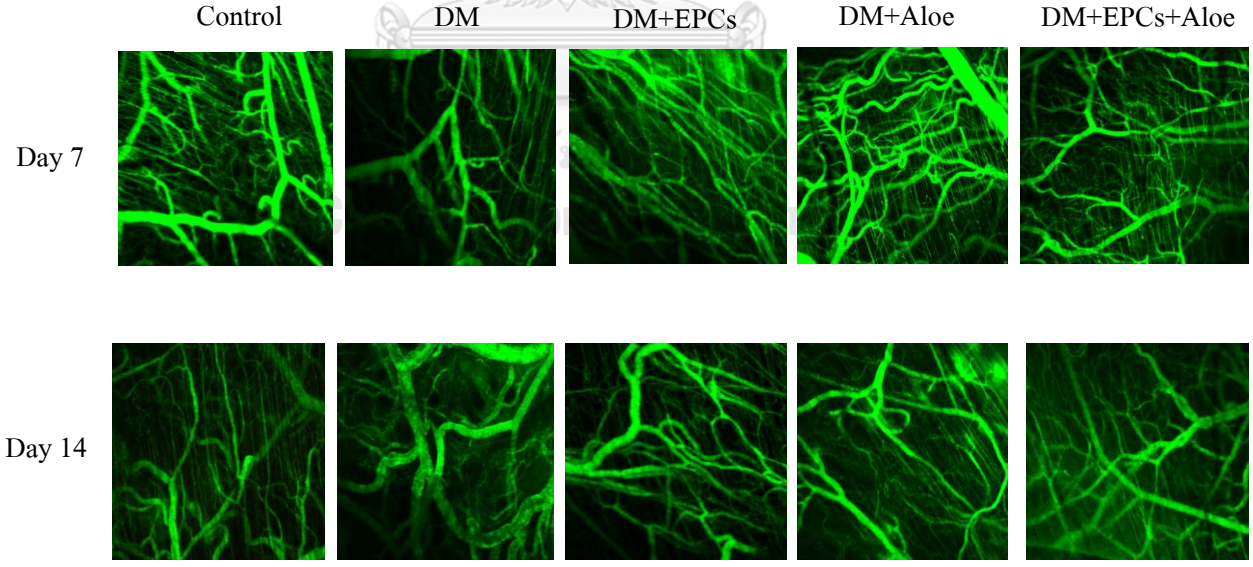
ð $p < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม DM + Aloe

ผลการเกิดหลอดเลือดใหม่ (Angiogenesis)

ทั้งในวันที่ 7 และ 14 หลังทำให้เกิดแผลพบว่า กลุ่ม DM มีการเกิดหลอดเลือดใหม่บริเวณแผลลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่ม Control แต่กลุ่มที่ได้รับการรักษาทั้งสามกลุ่ม ได้แก่กลุ่มเบาหวานที่ได้รับ EPCs หรือ Aloe หรือทั้งสองอย่างร่วมกัน มีการเกิดหลอดเลือดใหม่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่ม Control

และในวันที่ 7 ในกลุ่มที่ได้รับการรักษาทั้งสามกลุ่ม มีการเกิดหลอดเลือดใหม่บริเวณแผลเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่ม DM นอกจากนี้ในกลุ่มที่ได้รับ Aloe ร่วมกับ EPCs มีการเกิดหลอดเลือดใหม่เพิ่มขึ้นอย่างนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ EPCs เพียงอย่างเดียว ดังแสดงในตารางที่ 7 และ รูปที่ 21A

ในวันที่ 14 หลังทำให้เกิดแผลพบว่า กลุ่ม Control และกลุ่มเบาหวานที่ได้รับการรักษาทั้งสามกลุ่ม มีการเกิดหลอดเลือดใหม่บริเวณแผลเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่ม DM นอกจากนี้กลุ่มที่ได้รับ Aloe ร่วมกับ EPCs มีการเกิดหลอดเลือดใหม่เพิ่มขึ้นอย่างนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ EPCs หรือ Aloe เพียงอย่างเดียว ดังแสดงในตารางที่ 7 และ รูปที่ 21B



รูปที่ 20 แสดงการเกิดหลอดเลือดใหม่บริเวณแผลในวันที่ 7 และ วันที่ 14 หลังทำให้เกิดแผลในกลุ่มทดลองทั้ง 5 กลุ่ม

ตารางที่ 7 แสดงค่า Means ± SD ของการเกิดหลอดเลือดใหม่บริเวณแผลในวันที่ 7 และ วันที่ 14 ในหนูเบาหวานที่ให้กินว่านหางจระเข้ ปลูกถ่าย EPCs หรือได้รับร่วมกัน

Group	% Capillary vascularity	
	Day 7	**Day 14**
Control	55.49 ± 2.31	37.60 ± 2.77
	N=5	N=5
DM	26.39 ± 1.36 **	17.50 ± 3.07 **
	N=4	N=4
DM + EPCs	47.20 ± 2.53 #	31.61 ± 1.52 #
	N=5	N=5
DM + Aloe	51.68 ± 6.98 ##	33.35 ± 1.69 #
	N=5	N=5
DM + EPCs +Aloe	67.23 ± 4.05 ##,†	48.22 ± 3.97 ##,††,ð
	N=5	N=5

** $p < 0.01$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม Control

$p < 0.01$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม DM

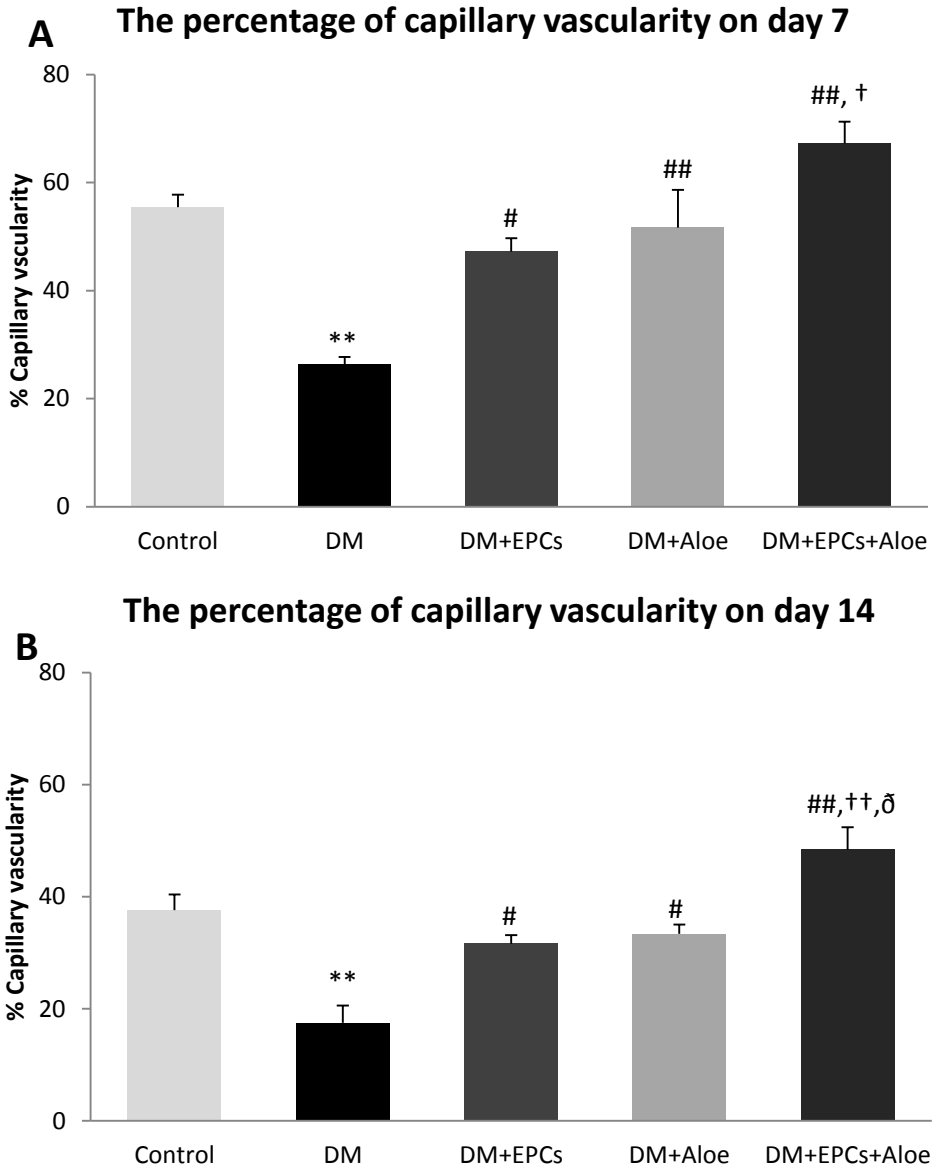
# $p < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม DM

†† $p < 0.01$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม DM + EPCs

† $p < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม DM + EPCs

ð $p < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม DM + Aloe

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



รูปที่ 21 แสดงการเกิดหลอดเลือดใหม่บริเวณแผลในวันที่ 7 (รูปที่ 21A) และ วันที่ 14 (รูปที่ 21B) ในหนูเบาหวานที่ให้กินว่านหางจระเข้ ปลูกถ่าย EPCs หรือได้รับร่วมกัน

** $p < 0.01$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม Control

$p < 0.01$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม DM

# $p < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม DM

†† $p < 0.01$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม DM + EPCs

† $p < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม DM + EPCs

ð $p < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม DM + Aloe

ผลการสร้างเยื่อบุผิวขึ้นมาใหม่ (Re-epithelialization)

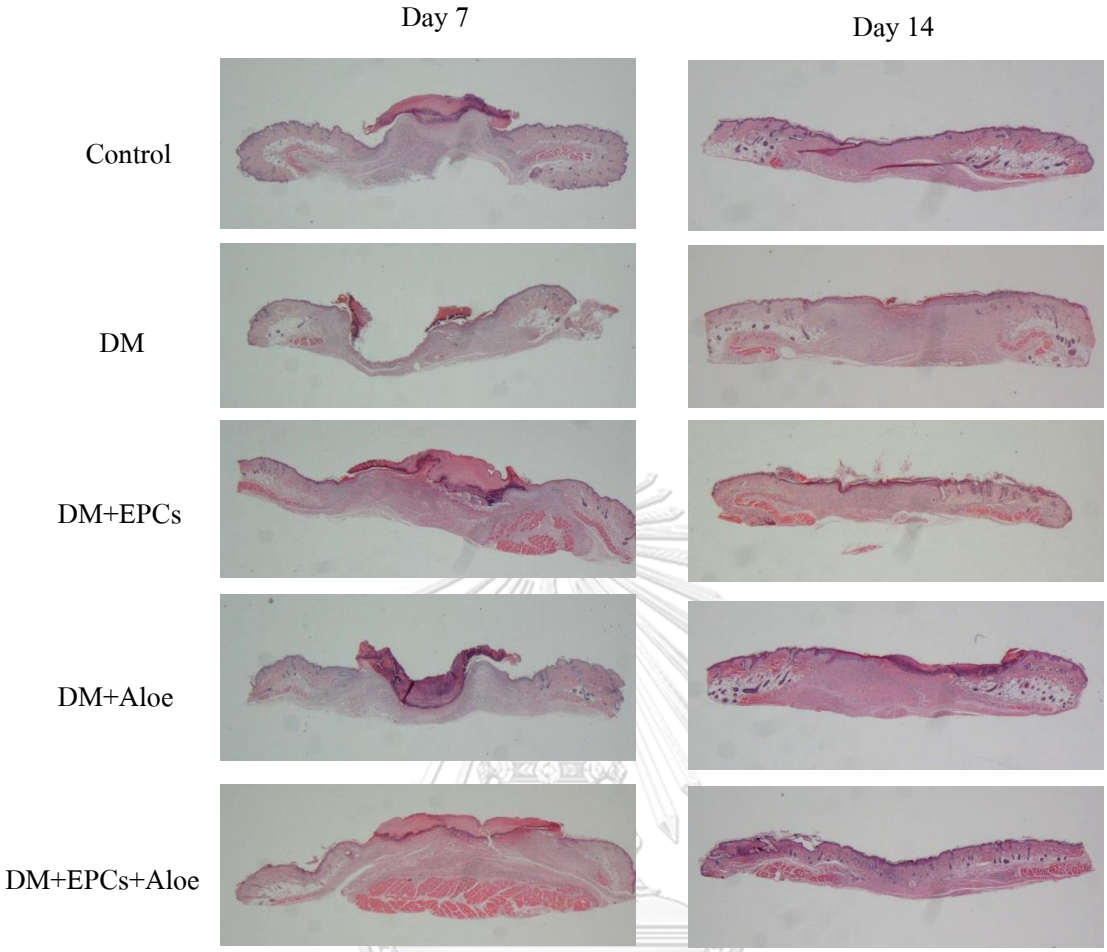
ในวันที่ 7 หลังทำให้เกิดแผลพบว่า กลุ่ม DM มีการสร้างเยื่อบุผิวลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่ม Control แต่กลุ่มที่ได้รับการรักษาทั้งสามกลุ่มได้แก่ กลุ่มเบาหวานที่ได้รับ EPCs หรือ Aloe หรือ ทั้งสองอย่างร่วมกัน มีการสร้างเยื่อบุผิวขึ้นมาใหม่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่ม Control

และในกลุ่มที่ได้รับการรักษาทั้งสามกลุ่ม มีการสร้างเยื่อบุผิวขึ้นมาใหม่บริเวณแผลเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่ม DM แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มที่ได้รับการรักษาทั้งสามกลุ่ม ดังแสดงในตารางที่ 8 และ รูปที่ 23A

ส่วนของในวันที่ 14 หลังทำให้เกิดแผลพบว่า ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงในตารางที่ 8 และ รูปที่ 23B

นอกจากนี้จากภาพของชิ้นเนื้อแผล จะเห็นได้ว่าทั้งในวันที่ 7 และ 14 กลุ่มเบาหวานที่ได้รับทั้งสองอย่างร่วมกัน มีส่วนของ epidermis, granulation tissue, hair follicle, sebaceous glands และ blood supply network ที่สมบูรณ์มากกว่ากลุ่มอื่นๆ(รูปที่ 22)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



รูปที่ 22 แสดงการสร้างเยื่อบุผิวขึ้นมาใหม่บริเวณแผล (re-epithelialization) ในวันที่ 7 และ วันที่ 14 หลังทำให้เกิดแผลในกลุ่มทดลองทั้ง 5 กลุ่ม (H&E ที่กำลังขยาย 10 เท่า)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

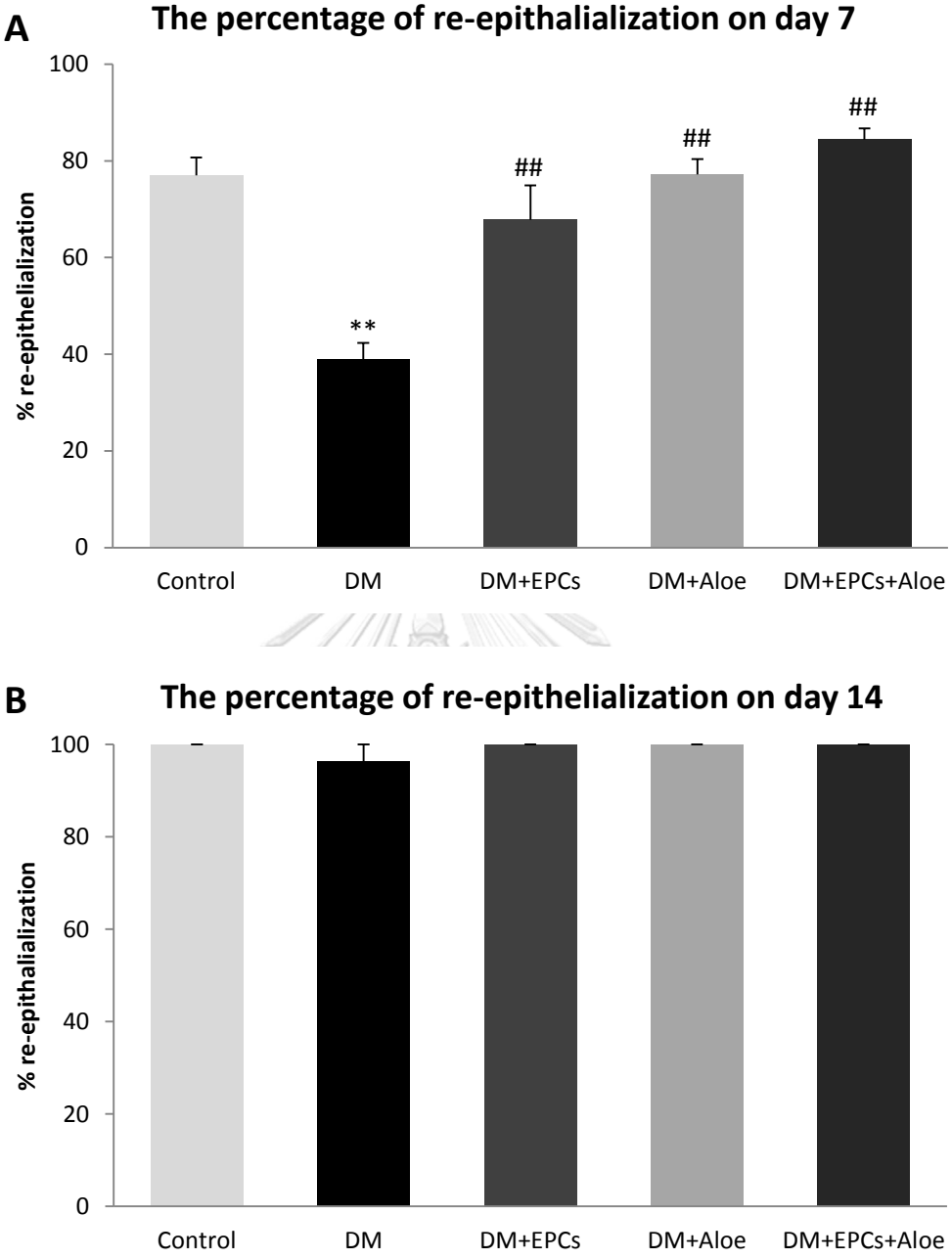
ตารางที่ 8 แสดงค่า Means ± SD ของร้อยละเยื่อบุผิวที่ขึ้นมาใหม่บริเวณแผล (% re-epithelialization) ในวันที่ 7 และ วันที่ 14 ในหนูเบาหวานที่ให้กินว่านหางจระเข้ ปลูกถ่าย EPCs หรือได้รับร่วมกัน

Group	**% Re-epithelialization**	
	Day 7	**Day 14**
Control	77.00 ± 3.70	100.00 ± 0.00
	N=5	N=5
DM	39.00 ± 3.36 **	96.25 ± 3.75
	N=5	N=4
DM + EPCs	67.80 ± 7.14 ##	100.00 ± 0.00
	N=5	N=5
DM + Aloe	77.20 ± 3.20 ##	100.00 ± 0.00
	N=5	N=5
DM + Aloe + EPCs	84.40 ±2.31 ##	100.00 ± 0.00
	N=5	N=5

** $p < 0.01$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม Control

$p < 0.01$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม DM

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY



รูปที่ 23 แสดงร้อยละเยื่อบุผิวที่ขึ้นมาใหม่บริเวณแผล (% re-epithelialization) ของแต่ละกลุ่ม ในวันที่ 7 (รูปที่ 23A) และ วันที่ 14 (รูปที่ 23B) ในหนูเบาหวานที่ให้กินว่านหางจระเข้ ปลูกถ่าย EPCs หรือได้รับร่วมกัน

** $p < 0.01$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม Control

$p < 0.01$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม DM

ผลของระดับ VEGF จากชิ้นเนื้อบริเวณแผล

ในวันที่ 7 หลังทำให้เกิดแผลพบว่า กลุ่ม DM มีระดับของ VEGF ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่ม Control แต่กลุ่มที่ได้รับการรักษาทั้งสามกลุ่มได้แก่ กลุ่มเบาหวานที่ได้รับ EPCs หรือ Aloe หรือทั้งสองอย่างร่วมกัน มีระดับของ VEGF ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่ม Control

นอกจากนี้ในกลุ่มเบาหวานที่ได้รับการรักษาทั้งสามกลุ่ม มีระดับของ VEGF เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่ม DM แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มที่ได้รับการรักษาทั้งสามกลุ่ม ดังแสดงในตารางที่ 9 และ รูปที่ 24A

และในวันที่ 14 หลังทำให้เกิดแผลพบว่า ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงในตารางที่ 9 และ รูปที่ 24B

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 9 แสดงค่า Means ± SD ของระดับ VEGF จากชิ้นเนื้อบริเวณแผล ในวันที่ 7 และ วันที่14 ในหนูเบาหวานที่ให้กินว่านหางจระเข้ ปลูกถ่าย EPCs หรือ ได้รับร่วมกัน

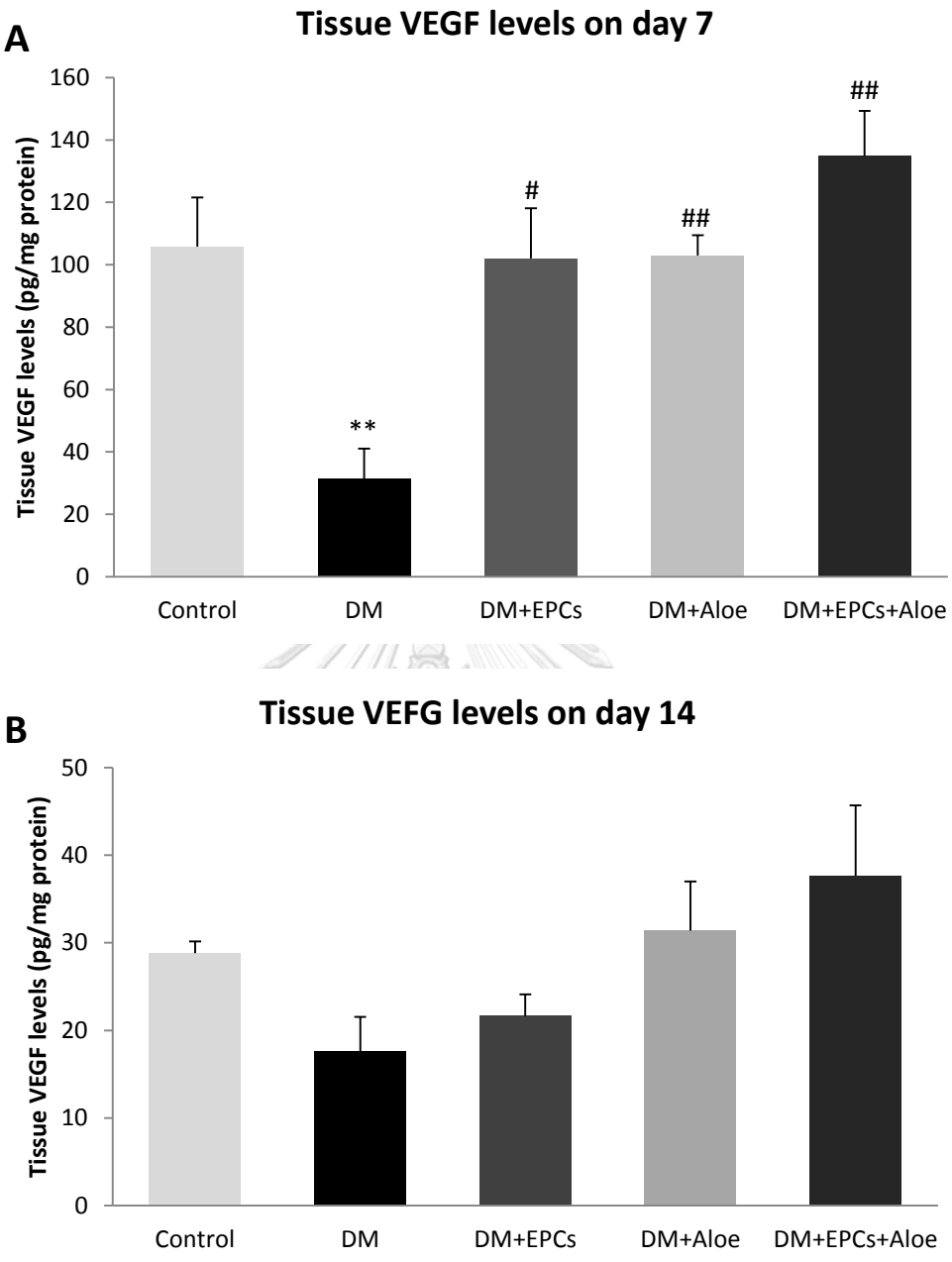
Group	**Tissue VEGF levels (pg/mg protein)**	
	Day 7	**Day 14**
Control	105.79 ± 15.75	28.84 ± 1.32
	N=5	N=5
DM	31.30 ± 9.73 **	17.63 ± 3.91
	N=5	N=4
DM + EPCs	102.05 ± 16.05#	21.62 ± 2.49
	N=5	N=4
DM + Aloe	102.95 ± 6.54 ##	31.41 ± 5.61
	N=5	N=5
DM + Aloe + EPCs	134.80 ± 14.53##	37.64 ± 8.05
	N=5	N=5

** $p < 0.01$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม Control

$p < 0.01$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม DM

# $p < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม DM

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY



รูปที่ 24 แสดงระดับของ VEGF จากชิ้นเนื้อบริเวณแผล ในวันที่ 7 (รูปที่ 24A) และ วันที่ 14 (รูปที่ 24B) ในหนูเบาหวานที่ให้กินว่านหางจระเข้ ปลูกถ่าย EPCs หรือได้รับร่วมกัน

** $p < 0.01$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม Control

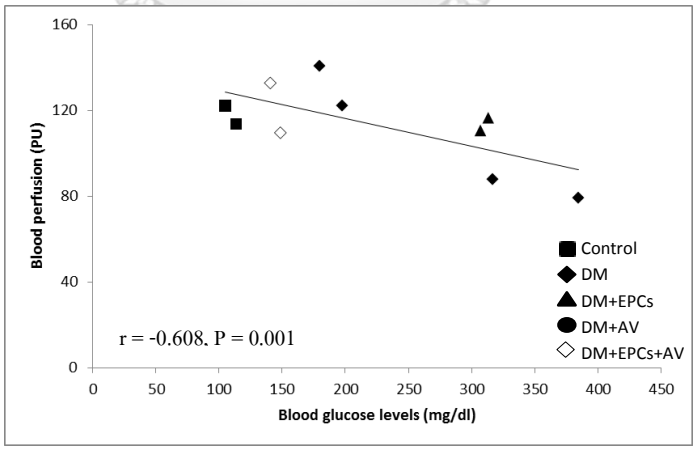
$p < 0.01$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม DM

# $p < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม DM

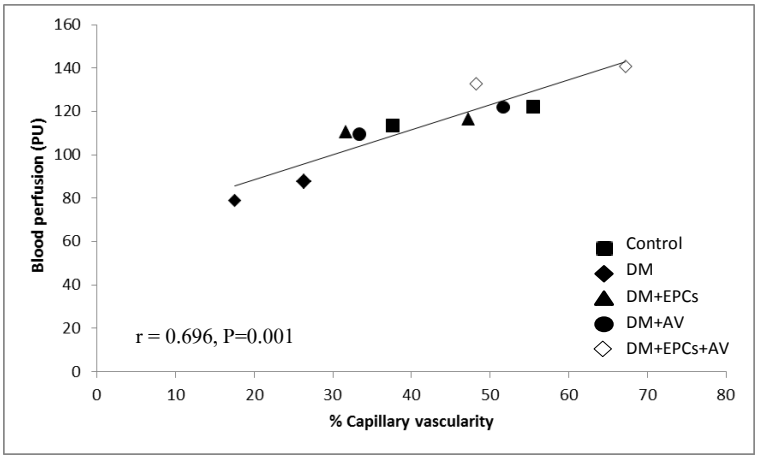
ความสัมพันธ์ของระดับน้ำตาลในเลือด การเกิดหลอดเลือดใหม่ การไหลเวียนของเลือด และระดับ VEGF

จากผลการศึกษาในครั้งนี้ เมื่อนำมาหาความสัมพันธ์ระหว่างผลของระดับน้ำตาลในเลือด และการไหลเวียนของเลือด ด้วยวิธี Pearson's correlation (รูปที่ 25) จะเห็นได้ว่าทั้งสองตัวแปรมีความสัมพันธ์ในเชิงตรงข้าม คือในกลุ่มที่ได้รับว่านหางจระเข้ร่วมกับการปลูกถ่าย EPCs พบว่ามีระดับน้ำตาลในเลือดที่ลดลงและการเกิดหลอดเลือดใหม่ที่เพิ่มขึ้น ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์(r) r = -0.608 และ P = 0.001 ดังนั้นจึงยืนยันได้ว่าการให้ว่านหางจระเข้ในรูปแบบวิธีการกินให้ผลแบบ systemic effect หรือให้ผลทั่วร่างกาย

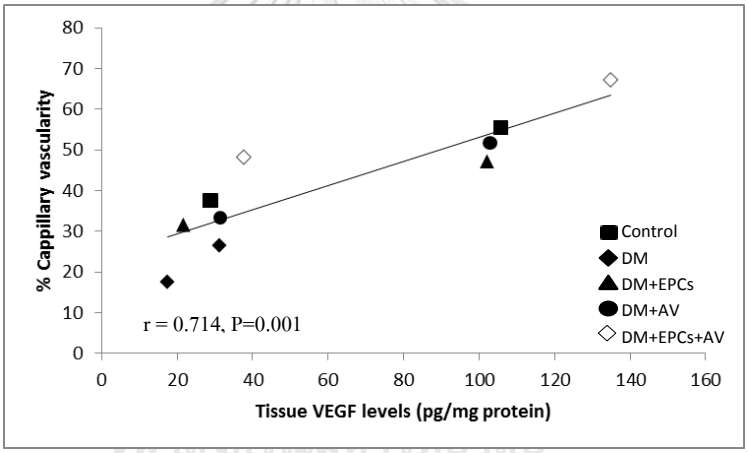
นอกจากนี้เมื่อนำผลการทดลองมาหาความสัมพันธ์ระหว่างการเกิดหลอดเลือดใหม่ และการไหลเวียนของเลือด พบว่ามีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกัน r = 0.696 และ P = 0.001 (รูปที่26) เช่นเดียวกับ ความสัมพันธ์ระหว่างการเกิดหลอดเลือดใหม่และระดับของ tissue VEGF พบว่ามีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกัน r = 0.714 และ P = 0.001 (รูปที่ 27) ดังนั้นจึงอธิบายได้ว่า การให้กินว่านหางจระเข้ร่วมกับการปลูกถ่าย EPCs มีบทบาทในการลดระดับน้ำตาลในเลือด ทำให้เพิ่มการเกิดหลอดเลือดใหม่ ส่งผลให้มีการไหลเวียนเลือดบริเวณแผลเพิ่มขึ้นผ่านการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของระดับ VEGF ซึ่งทั้งหมดนี้ส่งผลให้แผลหายได้เร็วขึ้น



รูปที่ 25 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง Blood glucose levels และ Blood perfusion ในหนูเบาหวานที่ให้กินว่านหางจระเข้ ปลูกถ่าย EPCs หรือ ได้รับร่วมกัน วิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรโดย Pearson's correlation



รูปที่ 26 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % Capillary vascularity และ Wound blood flow ในหนูเบาหวานที่ให้กินว่านหางจระเข้ ปลูกถ่าย EPCs หรือ ได้ร่วมกัน วิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรโดย Pearson's correlation



รูปที่ 27 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง Tissue VEGF levels และ % Capillary vascularity ในหนูเบาหวานที่ให้กินว่านหางจระเข้ ปลูกถ่าย EPCs หรือ ได้รับร่วมกัน วิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรโดย Pearson's correlation

บทที่ 5
สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยครั้งนี้เพื่อศึกษาผลของการกินว่านหางจระเข้ร่วมกับการปลูกถ่าย EPCs ต่อการหายของแผลและการเกิดหลอดเลือดใหม่ในหนูที่เป็นเบาหวาน

หลังจากเหนี่ยวนำให้หนูเป็นเบาหวานชนิดที่ 1 และทำให้เกิดแผลชนิด full-thickness excision wound พบว่าแผลหายช้าลง โดยมีการลดลงของการสร้างเยื่อบุผิวบริเวณแผล รวมทั้งการไหลเวียนของเลือด การเกิดหลอดเลือดใหม่ และระดับ VEGF ที่บริเวณแผล

ผลของการศึกษาในครั้งนี้พบว่าทั้งในวันที่ 7 และ 14 การให้ว่านหางจระเข้ทางปากร่วมกับการปลูกถ่าย EPCs ช่วยลดระดับน้ำตาลในเลือด เร่งการปิดของแผล เพิ่มการไหลเวียนของเลือดบริเวณแผล การเกิดหลอดเลือดใหม่ การสร้างเยื่อบุผิว และระดับของ VEGF บริเวณแผล อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่ม DM และผลไม่แตกต่างกับกลุ่ม Control อีกด้วย ยิ่งไปกว่านั้นในวันที่ 7 พบว่าการให้ทั้งสองอย่างร่วมกันยังเพิ่มการเกิดหลอดเลือดใหม่และการไหลเวียนเลือดได้ดีกว่าการให้ EPCs เพียงอย่างเดียว และในวันที่ 14 พบว่าการให้ทั้งสองอย่างร่วมกันยังเพิ่มการเกิดหลอดเลือดใหม่และการไหลเวียนเลือดได้ดีกว่าการให้ EPCs หรือ Aloe เพียงอย่างเดียวอีกด้วย

ผลต่อการลดระดับน้ำตาลในเลือด

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

การศึกษาในครั้งนี้ ได้ทำการเหนี่ยวนำให้หนูนูดไมซ์เป็นเบาหวานชนิดที่ 1 ด้วย STZ (45 mg/kg) วันละครั้งเป็นเวลาติดต่อกัน 5 วันโดย STZ เป็นสารที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในการเหนี่ยวนำให้เกิดเบาหวานในสัตว์ทดลอง โดย STZ ผ่านเข้าสู่เบต้าเซลล์ที่ตับอ่อนทาง glucose transporter-2 (GLUT-2) ทำให้เกิดปฏิกิริยา alkylation หรือ การเติมหมู่ alkyl ที่สายของดีเอนเอ ทำให้สายดีเอนเอเกิดความเสียหายและส่งผลให้เกิดการตายของเบต้าเซลล์ ทำให้ตับอ่อนผลิตอินซูลินลดลง ส่งผลให้ระดับน้ำตาลในเลือดเพิ่มสูงขึ้น[51] อย่างไรก็ตามหลังจากที่สัตว์ทดลองได้รับว่านหางจระเข้ทางปากในปริมาณ 400 mg/kg/day โดยแบ่งให้กินวันละ 2 ครั้ง ทุกวันเป็นเวลา 7 และ14 วัน พบว่าระดับน้ำตาลในเลือดในกลุ่มที่ได้รับว่านหางจระเข้ คือกลุ่ม DM+Aloe และ DM+EPCs+Aloe ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทั้งในวันที่ 7 และ 14 เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับว่านหางจระเข้

มีการศึกษาพบว่ากลไกในการลดระดับน้ำตาลในเลือดของว่างหางจระเข้ คือกระตุ้นการหลั่งอินซูลิน ซ่อมแซมและ ฟื้นฟูเบต้าเซลล์ของตับอ่อนที่ถูกทำลายไป[40] จากงานวิจัยของ Noor และคณะในปี 2017 ได้ทำการเหนี่ยวนำให้หนูแรทเป็นเบาหวานชนิดที่ 1 ด้วย STZ และให้กินว่านหางจระเข้ ในขนาด 300 mg/kg วันละครั้งทุกวันเป็นเวลา 3 สัปดาห์ พบว่าระดับน้ำตาลในเลือดลดลงกลับคืนสู่ปกติ ระดับอินซูลินเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และจากการวิเคราะห์ทางสัณฐานวิทยาพบว่ามีการเพิ่มขึ้นของจำนวน เส้นผ่านศูนย์กลาง พื้นที่ และปริมาตรของ islet of Langerhans ที่ตับอ่อนเมื่อเทียบกับกลุ่มที่เป็นเบาหวาน[39] นอกจากนี้ในงานวิจัย Manjunath และคณะในปี 2016 พบว่าการให้กินว่านหางจระเข้ในขนาด 100, 200 และ 400 mg/kg วันละครั้งทุกวันเป็นเวลา 5 สัปดาห์ ว่านหางจระเข้ทั้งสามขนาดนี้สามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานชนิดที่ 2 ด้วย alloxan ได้อีกด้วย[52]

ผลต่อการเกิดหลอดเลือดใหม่และการไหลเวียนของเลือดบริเวณแผล

โรคเบาหวานทำให้การสร้างหลอดเลือดใหม่ในกระบวนการรักษาแผลลดลง ซึ่งในแผลเบาหวานจะพบว่าหลอดเลือดและความหนาแน่นของหลอดเลือดฝอยลดลง[53] การลดลงของการเกิดหลอดเลือดใหม่และการไหลเวียนที่ผิดปกติส่งผลให้การรักษาแผลเบาหวานไม่สมบูรณ์และใช้ระยะเวลาที่นานขึ้น[27] การไหลเวียนของเลือดเป็นสิ่งจำเป็นสำหรับสรีรวิทยาของหลอดเลือดปกติ ซึ่งพบว่าการงอกของหลอดเลือดฝอยจากหลอดเลือดเดิม (angiogenesis) ทำให้การไหลเวียนของเลือดเพิ่มขึ้นผ่าน angiogenic growth factor ที่สำคัญคือ VEGF[54] จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าการปลูกถ่าย EPCs ไปยังแผลเบาหวานทำให้แผลปิดได้เร็วขึ้นโดยการเพิ่มขึ้นของการเกิดหลอดเลือดใหม่[7, 36] และมีการศึกษาเกี่ยวกับผลของการกินว่านหางจระเข้ต่อการเกิดหลอดเลือดใหม่ในแผลเบาหวานและแผลที่เกิดจากการได้รับรังสีในขนาด single-dose พบว่าว่านหางจระเข้กระตุ้นการสร้างหลอดเลือดใหม่ทำให้แผลหายได้เร็วขึ้น[14, 15]

จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าทั้งในวันที่ 7 และ วันที่ 14 กลุ่มเบาหวานที่ได้รับ EPCs หรือ Aloe หรือ ทั้งสองอย่างร่วมกัน ช่วยเพิ่มการเกิดหลอดเลือดใหม่และการไหลเวียนของเลือดบริเวณแผลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับการรักษา และยิ่งไปกว่านั้นกลุ่มที่ได้รับ Aloe ร่วมกับ EPCs มีผลเพิ่มการเกิดหลอดเลือดใหม่และการไหลเวียนของเลือดในวันที่ 7 เมื่อเทียบกับที่ได้รับ EPCs เพียงอย่างเดียว รวมทั้งมีการเกิดหลอดเลือดใหม่และการไหลเวียนของเลือด

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บริเวณแผลเพิ่มขึ้นในวันที่ 14 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มเบาหวานที่ได้รับ EPCs หรือ Aloe เพียงอย่างเดียว ซึ่งยืนยันได้ว่าการกินว่านหางจระเข้ร่วมกับการปลูกถ่าย EPCs มีประสิทธิภาพในการกระตุ้นการเกิดหลอดเลือดใหม่และการไหลเวียนเลือดได้ดีกว่าการให้ EPCs หรือว่านหางจระเข้เพียงอย่างเดียวในการรักษาแผลเบาหวาน (โดยการกินว่านหางจระเข้อาจไปสนับสนุนการเคลื่อนที่ของ EPCs เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการสร้างหลอดเลือดใหม่และการไหลเวียนของเลือดในแผลเบาหวานได้)

ผลต่อระดับ VEGF

VEGF มีบทบาทสำคัญในกระบวนการหายของแผล โดยไปกระตุ้น สนับสนุน และรักษาเสถียรภาพของการเกิดหลอดเลือดใหม่ ซึ่ง VEGF ถูกหลั่งมาจาก fibroblasts, keratinocytes และ endothelial cells เพื่อกระตุ้นให้เกิดการสร้างหลอดเลือดใหม่ในระยะ proliferative phase ในช่วงวันที่ 3-7 หลังจากเกิดบาดแผลจะค่อยๆลดลงเมื่อเกิดหลอดเลือดใหม่ขึ้นแล้ว[55] ในผู้ป่วยเบาหวานจะพบว่ามีการผลิต VEGF ลดลง ทำให้ความหนาแน่นของหลอดเลือดลดลง การไหลเวียนเลือดไม่ดี นำไปสู่ความบกพร่องในการหายของแผล[4]

จากการศึกษาในครั้งนี้ ในวันที่ 7 พบว่ากลุ่มเบาหวานที่ได้รับ EPCs หรือ Aloe หรือทั้งสองอย่างร่วมกัน มีระดับของ VEGF เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่ม DM แต่ในวันที่ 14 ไม่พบความแตกต่างกันและมีระดับลดลงในทุกกลุ่ม เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Sukpat และคณะในปี 2013 ที่พบว่า EPCs มีประสิทธิภาพในการเพิ่มระดับของ VEGF ในวันที่ 7 หลังทำให้เกิดแผลเบาหวาน[36] และจากงานวิจัยของ Asia และคณะในปี 2013 พบว่า การปลูกถ่าย EPCs ไปยังแผลของหนูที่เป็นเบาหวานพบว่าเพิ่มการแสดงออกของ VEGF และ bFGF ซึ่งทั้งสองตัวนี้เป็นปัจจัยหลักในการสร้างหลอดเลือดของ EPCs ดังนั้น EPCs จึงทำหน้าที่เป็นแหล่งของ growth factor และ สนับสนุนการเกิดหลอดเลือดใหม่บริเวณของแผลผ่านทาง paracrine effects[7] โดย EPCs จะหลั่งสาร growth factor ที่สำคัญเช่น VEGF และ fibroblast growth factor ซึ่งสามารถที่จะกระตุ้นการเจริญ การเคลื่อนที่ รวมทั้งสามารถแทนที่ endothelial cell ที่บาดเจ็บหรือหมดอายุให้ทำงานใหม่[56] และจากการศึกษาผลของว่านหางจระเข้ใน in vitro ในงานวิจัยของ Hashemi และคณะในปี 2015 พบว่า β-sitosterol ซึ่งเป็นสารสำคัญที่พบในว่านหางจระเข้ สามารถกระตุ้นการสร้างหลอดเลือดใหม่และการรักษาบาดแผลโดยเพิ่มอัตราการแสดงออกของ VEGF[57] และใน in vivo จาก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

การศึกษาของ Atiba และคณะในปี 2010 แสดงให้เห็นว่าการกินว่านหางจระเข้เพิ่มการสร้าง VEGF และ TGF-β1 ในแผลเบาหวาน[15]

ผลต่อการเกิด Re-epithelialization และการปิดของแผล

Re-epithelialization เป็นขั้นตอนที่สำคัญในกระบวนการหายของแผลที่ใช้เป็นพารามิเตอร์ในการกำหนดการปิดของแผล ซึ่งจะพบว่ากระบวนการ re-epithelialization นั้นบกพร่องในแผลเรื้อรังทุกประเภท[58] โดยกระบวนการ re-epithelialization คือการที่ขอบแผลที่ค่อยๆ สมานชิดติดกัน ซึ่งจะอยู่ในช่วงสุดท้าย ในระยะ proliferative phase ระหว่างวันที่ 3-14 ในกระบวนการหายของแผล ซึ่งในงานวิจัยครั้งนี้ได้ทำการตรวจสอบการเกิด re-epithelialization และการปิดของแผลในวันที่ 7 และ วันที่ 14 พบว่าในวันที่ 7 กลุ่มเบาหวานที่ได้รับการรักษาคือ กลุ่มที่ได้รับ EPCs หรือ Aloe หรือ ทั้งสองอย่างร่วมกัน มีการเกิด re-epithelialization และการปิดของแผลเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่ม DM แต่ในวันที่ 14 การเกิด re-epithelialization ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เนื่องจากกลุ่มที่ได้รับการรักษาทั้งสามกลุ่มมีการเกิด re-epithelialization เพิ่มสูงขึ้นถึงร้อยละ100 เช่นเดียวกับในงานวิจัยของ Kim และคณะในปี 2010 พบว่า EPCs สนับสนุนการเกิด re-epithelialization โดยเพิ่มการเกิด proliferation ของ keratinocytes และ fibroblast ส่งผลให้แผลปิดได้เร็วขึ้น[6] นอกจากนี้ยังพบว่าว่านหางจระเข้ช่วยเพิ่มอัตราการเกิด re-epithelialization ทั้งในแผลเบาหวานและแผลไหม้ชนิด second degree burn ทำให้แผลปิดได้เร็วขึ้น[11, 13] ดังนั้นทั้ง EPCs และว่านหางจระเข้ สนับสนุนกระบวนการเกิด re-epithelialization และการปิดของแผลในแผลเบาหวานได้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

กลไกของผลการให้ว่านหางจระเข้ร่วมกับการปลูกถ่าย EPCs ต่อการเกิดหลอดเลือดใหม่และกระบวนการหายของแผลในหนูที่เป็นเบาหวาน

ภาวะระดับน้ำตาลในเลือดสูงในผู้ป่วยเบาหวาน มีผลเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะ oxidative stress ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการเกิดภาวะแทรกซ้อนในผู้ป่วยเบาหวาน[59]โดย mitochondria เพิ่มการผลิตสารอนุมูลอิสระ (reactive oxygen species, ROS) ส่งผลให้เกิดการกระตุ้นผ่านกลไกต่างๆ ได้แก่ กระตุ้น polyol pathway flux เพิ่มการผลิต AGEs กระตุ้น protein kinase C และเพิ่มการทำงานของ hexosamine pathway ส่งผลให้เกิดการสูญเสียหน้าที่ของ endothelial cells ที่ผนังหลอดเลือด[22] นอกจากนี้ ROS ที่เพิ่มขึ้นยังไปลดจำนวนและการทำงานของ EPCs[4] จากการศึกษาของ

Looman และคณะ ในปี 2004 พบว่า EPCs ลดจำนวนลงและสูญเสียหน้าที่ไป[32] ส่งผลให้การผลิต growth factor และการเกิดหลอดเลือดใหม่ลดลงในผู้ป่วยเบาหวาน ส่งผลให้แผลหายช้าและใช้เวลาในการรักษานานขึ้น

จากการศึกษาในครั้งนี้จะเห็นได้ว่า การให้ว่านหางจระเข้ร่วมกับการปลูกถ่าย EPCs ช่วยเร่งการเกิดหลอดเลือดใหม่ และเพิ่มการไหลเวียนเลือด ทั้งในวันที่ 7 และวันที่ 14 หลังทำให้เกิดแผล และการให้การรักษาร่วมกันก็มีผลดีมากกว่าการให้การรักษาเพียงอย่างเดียวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในวันที่ 14 โดยว่านหางจระเข้ไปทำงานเสริมฤทธิ์กับ transplant EPCs ซึ่งผู้วิจัยได้ตั้งสมมติฐานได้ 2 ประการ คือ 1.ว่านหางจระเข้เพิ่มการเคลื่อนที่ของ transplant EPCs โดยจากงานวิจัยก่อนนี้พบว่าสารออกฤทธิ์ที่สำคัญของว่านหางระเข้ คือ β-sitosterol ช่วยเพิ่มการเคลื่อนที่ของ EPCs ชนิด HUVECs[16] 2.ระดับน้ำตาลที่ลดลงจากการให้กินว่านหางจระเข้ ช่วยทำให้การทำงานทั้ง circulating และ transplanted EPCs ดีขึ้น เนื่องจากการศึกษาก่อนหน้านี้ได้ทำการศึกษาใน in vitro พบว่า EPCs ที่ได้รับ high glucose เซลล์เกิดการชราหรือเสื่อมสภาพไปเพิ่มขึ้น การเกิด migration และ tube formation ของ EPCs ลดลง[34] ดังนั้นการได้รับว่านหางจระเข้ด้วยวิธีการกินอาจมีส่วนทำให้ transplant EPCs ดีขึ้น และจากงานวิจัยของ Sargowo และคณะในปี 2011 พบว่าการกินว่านหางจระเข้สามารถไปเพิ่ม จำนวน circulating EPCs ในร่างกาย และกระตุ้นระดับ eNOS และ VEGF ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญในกระบวนการเกิดหลอดเลือดใหม่[43]

นอกจากนี้ระดับน้ำตาลที่สูงยังมีผลยับยั้งการเจริญและการเคลื่อนที่ของ keratinocyte ทำให้อัตราการเกิด re-epithelialization ลดลง แผลจึงปิดช้าลง[60] ซึ่งจากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าทั้งการรักษาด้วยว่านหางจระเข้ และการปลูกถ่าย EPCs หรือการรักษาร่วมกันนั้น ช่วยเพิ่มอัตราการเกิด re-epithelialization และการปิดของแผลเบาหวาน อักทั้งผลทางพยาธิวิทยาของชิ้นเนื้อแผลจะเห็นได้ว่ากลุ่มที่ได้รับการรักษาร่วมกันนั้นมีความสมบูรณ์ของแผลมากกว่ากลุ่มอื่นๆ ทั้งในส่วนของ epidermis และ granulation tissue ที่มี collagen ที่ดีกว่าซึ่งอาจส่งผลในระยะยาวของกระบวนการหายของแผลได้

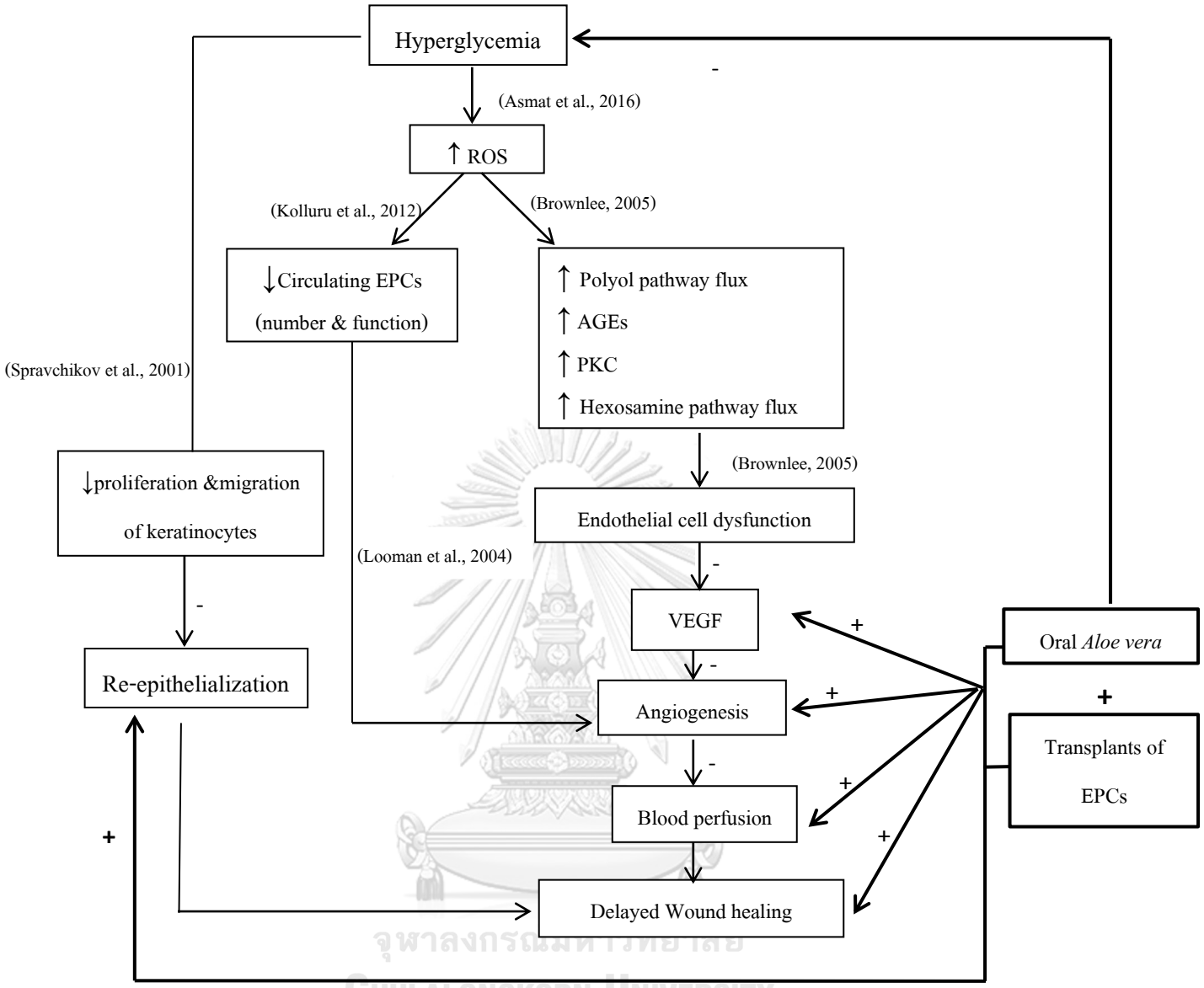
ดังนั้นจากการศึกษาในครั้งนี้จึงสรุปได้ว่าการให้ว่านหางจระเข้ร่วมกับ EPCs มี additive effect สามารถที่จะไปเพิ่มระดับ VEGF การเกิดหลอดเลือดใหม่ และการไหลเวียนของเลือดบริเวณแผล การสร้างเยื่อบุผิวขึ้นมาใหม่ ส่งผลให้แผลปิดได้เร็วขึ้นดีกว่าการให้ EPCs หรือ Aloe เพียง

อย่างเดียว โดยการให้ว่านหางจระเข้ในรูปแบบวิธีการกินยังมีผล systemic effect สามารถลดระดับน้ำตาลในเลือด ทำให้แผลหายเร็วขึ้นเสริมฤทธิ์กับ EPCs ดังแสดงในรูปที่ 28

ข้อจำกัดในงานวิจัย

ผลจากงานวิจัยชิ้นนี้ อาจยังไม่สามารถไปเปรียบเทียบกับผลของคนได้ เช่น ระยะเวลาการเป็นแผลเบาหวาน และขนาดของแผล โดยผู้วิจัยกำหนดขนาดแผลให้เป็นไปตามสัดส่วนกับขนาดหนู ซึ่งผลการทดลองจะเห็นได้ว่าผลของขนาดแผลในวันที่ 14 ไม่แตกต่างกัน และ แผลปิดเกือบสมบูรณ์แล้ว

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

รูปที่ 28 แสดงการสรุปกลไกของการให้ว่านหางจระเข้ทางปากร่วมกับการปลูกถ่าย EPCs ต่อการเกิดหลอดเลือดใหม่และกระบวนการหายของแผลในหนูที่เป็นเบาหวาน

บรรณานุกรม

1. Organization WH. Global report on diabetes 2016 [November 25, 2017]. Available from: http://www.who.int.

2. Reiber GE, Pecoraro RE, Koepsell TD. Risk factors for amputation in patients with diabetes mellitus. A case-control study. Ann Intern Med. 1992;117(2):97-105.

3. Ahmed N. Advanced glycation endproducts--role in pathology of diabetic complications. Diabetes Res Clin Pract. 2005;67(1):3-21.

4. Kolluru GK, Bir SC, Kevil CG. Endothelial dysfunction and diabetes: effects on angiogenesis, vascular remodeling, and wound healing. Int J Vasc Med. 2012;2012:918267.

5. Critser PJ, Yoder MC. Endothelial colony-forming cell role in neoangiogenesis and tissue repair. Curr Opin Organ Transplant. 2010;15(1):68-72.

6. Kim JY, Song SH, Kim KL, Ko JJ, Im JE, Yie SW, et al. Human cord blood-derived endothelial progenitor cells and their conditioned media exhibit therapeutic equivalence for diabetic wound healing. Cell Transplant. 2010;19(12):1635-44.

7. Asai J, Takenaka H, Ii M, Asahi M, Kishimoto S, Katoh N, et al. Topical application of ex vivo expanded endothelial progenitor cells promotes vascularisation and wound healing in diabetic mice. Int Wound J. 2013;10(5):527-33.

8. Yongchaiyudha S, Rungpitarangsi V, Bunyapraphatsara N, Chokechaijaroenporn O. Antidiabetic activity of Aloe vera L. juice. I. Clinical trial in new cases of diabetes mellitus. Phytomedicine. 1996;3(3):241-3.

9. Rajasekaran S, Ravi K, Sivagnanam K, Subramanian S. Beneficial effects of aloe vera leaf gel extract on lipid profile status in rats with streptozotocin diabetes. Clin Exp Pharmacol Physiol. 2006;33(3):232-7.

10. Gupta VK, Malhotra S. Pharmacological attribute of Aloe vera: Revalidation through experimental and clinical studies. Ayu. 2012;33(2):193-6.

11. Chithra P, Sajithlal GB, Chandrakasan G. Influence of aloe vera on the healing of dermal wounds in diabetic rats. J Ethnopharmacol. 1998;59(3):195-201.

12. Somboonwong J, Thanamittramanee S, Jariyapongskul A, Patumraj S. Therapeutic effects of Aloe vera on cutaneous microcirculation and wound healing in second degree burn model in rats.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

J Med Assoc Thai. 2000;83(4):417-25.

13. Khorasani G, Hosseinimehr SJ, Azadbakht M, Zamani A, Mahdavi MR. Aloe versus silver sulfadiazine creams for second-degree burns: a randomized controlled study. Surg Today. 2009;39(7):587-91.

14. Atiba A, Nishimura M, Kakinuma S, Hiraoka T, Goryo M, Shimada Y, et al. Aloe vera oral administration accelerates acute radiation-delayed wound healing by stimulating transforming growth factor-beta and fibroblast growth factor production. Am J Surg. 2011;201(6):809-18.

15. Atiba A, Ueno H, Uzuka Y. The effect of aloe vera oral administration on cutaneous wound healing in type 2 diabetic rats. J Vet Med Sci. 2011;73(5):583-9.

16. Moon EJ, Lee YM, Lee OH, Lee MJ, Lee SK, Chung MH, et al. A novel angiogenic factor derived from Aloe vera gel: beta-sitosterol, a plant sterol. Angiogenesis. 1999;3(2):117-23.

17. Wahedi HM, Jeong M, Chae JK, Do SG, Yoon H, Kim SY. Aloesin from Aloe vera accelerates skin wound healing by modulating MAPK/Rho and Smad signaling pathways in vitro and in vivo. Phytomedicine. 2017;28:19-26.

18. Ozougwu JC, Obimba KC, Belonwu CD, Unakalamba CB. The pathogenesis and pathophysiology of type 1 and

type 2 diabetes mellitus. Journal of Physiology and Pathophysiology. 2013;4(4):46-57.

19. Baynest HW. Classification, Pathophysiology, Diagnosis and Management of Diabetes Mellitus. Journal of Diabetes & Metabolism. 2013;6:541.

20. Chawla A, Chawla R, Jaggi S. Microvasular and macrovascular complications in diabetes mellitus: Distinct or continuum? Indian J Endocrinol Metab. 2016;20(4):546-51.

21. Giacco F, Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications. Circ Res. 2010;107(9):1058-70.

22. Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. Diabetes. 2005;54(6):1615-25.

23. Cohen IK, Diegelmann RF, Yager DR, Wornum IL, Graham MF, Crossland MC. Wound Care and Wound Healing. Principles of surgery 7th Edition. 1999:PP 263-90.

24. Young A, McNaught CL. The physiology of wound healing. Surgery (Oxford). 2011;29(10):475-9.

25. Dunn L, Prosser HC, Tan JT, Vanags LZ, Ng MK, Bursill CA. Murine model of wound

healing. J Vis Exp. 2013(75):e50265.

26. Tellechea A, Leal E, Veves A, Carvalho E. Inflammatory and Angiogenic Abnormalities in Diabetic Wound Healing:

Role of Neuropeptides and Therapeutic Perspectives The Open Circulation and Vascular Journal. 2010;3:43-55.

27. Falanga V. Wound healing and its impairment in the diabetic foot. Lancet. 2005;366(9498):1736-43.

28. O'Loughlin A, O'Brien T. Topical Stem and Progenitor Cell Therapy for Diabetic Foot Ulcers. Stem Cells in Clinic and Research. 2011.

29. Brem H, Tomic-Canic M. Cellular and molecular basis of wound healing in diabetes. J Clin Invest. 2007;117(5):1219-22.

30. wound I. Best Practice Guidelines: Wound Management in Diabetic Foot Ulcers 2013.

31. Aoki M, Yasutake M, Murohara T. Derivation of functional endothelial progenitor cells from human umbilical cord blood mononuclear cells isolated by a novel cell filtration device. Stem Cells. 2004;22(6):994-1002.

32. Loomans CJ, De Koning EJ, Staal FJ, Rabelink TJ, Zonneveld AJ. Endothelial progenitor cell dysfunction in type 1 diabetes: another consequence of oxidative stress? Antioxid Redox Signal. 2005;7(11-12):1468-75.

33. Tepper OM, Galiano RD, Capla JM, Kalka C, Gagne PJ, Jacobowitz GR, et al. Human endothelial progenitor cells from type II diabetics exhibit impaired proliferation, adhesion, and incorporation into vascular structures. Circulation. 2002;106(22):2781-6.

34. Chen YH, Lin SJ, Lin FY, Wu TC, Tsao CR, Huang PH, et al. High glucose impairs early and late endothelial progenitor cells by modifying nitric oxide-related but not oxidative stress-mediated mechanisms. Diabetes. 2007;56(6):1559-68.

35. Suh W, Kim KL, Kim JM, Shin IS, Lee YS, Lee JY, et al. Transplantation of endothelial progenitor cells accelerates dermal wound healing with increased recruitment of monocytes/macrophages and neovascularization. Stem Cells. 2005;23(10):1571-8.

36. Sukpat S, Isarasena N, Wongphoom J, Patumraj S. Vasculoprotective effects of combined endothelial progenitor cells and mesenchymal stem cells in diabetic wound care: their potential role in decreasing wound-oxidative stress. Biomed Res Int. 2013;2013:459196.

37. Ackermann M, Pabst AM, Houdek JP, Ziebart T, Konerding MA. Priming with proangiogenic growth factors and endothelial progenitor cells improves revascularization in linear diabetic wounds. Int J Mol Med. 2014;33(4):833-9.

38. Kostalova D, Bezakova L, Oblozinsky M, Kardosova A. [Isolation and characterization of active compounds from Aloe vera with a possible role in skin protection]. Ceska Slov Farm. 2004;53(5):248-51.

39. Noor A, Gunasekaran S, Vijayalakshmi MA. Improvement of Insulin Secretion and Pancreatic beta-cell Function in Streptozotocin-induced Diabetic Rats Treated with Aloe vera Extract. Pharmacognosy Res. 2017;9(Suppl 1):S99-S104.

40. Pothuraju R, Sharma RK, Onteru SK, Singh S, Hussain SA. Hypoglycemic and Hypolipidemic Effects of Aloe vera Extract Preparations: A Review. Phytother Res. 2016;30(2):200-7.

41. Hamid AAMA, Soliman MF. Effect of topical aloe vera on the process of healing of full-thickness skin burn: a histological and immunohistochemical study. Journal of Histology & Histopathology. 2015;2.

42. Choi SW, Son BW, Son YS, Park YI, Lee SK, Chung MH. The wound-healing effect of a glycoprotein fraction isolated from aloe vera. Br J Dermatol. 2001;145(4):535-45.

43. Sargowo D, Handaya Ay, Widodo M, Lyrawati D, Tjokroprawiro A. Aloe Gel Enhances Angiogenesis in Healing of Diabetic Wound2011. 204 p.

44. Tabandeh MR, Oryan A, Mohammadalipour A. Polysaccharides of Aloe vera induce MMP-3 and TIMP-2 gene expression during the skin wound repair of rat. Int J Biol Macromol. 2014;65:424-30.

45. Choi S, Kim KW, Choi JS, Han ST, Park YI, Lee SK, et al. Angiogenic activity of beta-sitosterol in the ischaemia/reperfusion-damaged brain of Mongolian gerbil. Planta Med. 2002;68(4):330-5.

46. Yan X, Chen B, Lin Y, Li Y, Xiao Z, Hou X, et al. Acceleration of diabetic wound healing by collagen-binding vascular endothelial growth factor in diabetic rat model. Diabetes Res Clin Pract. 2010;90(1):66-72.

47. Lin C, Yin G, Ou M, Zheng S. The effects of HIF-1α and VEGF on wound healing in diabetic mice. Biomedical Research 2017;28(18) 8121-24.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

48. Brem H, Kodra A, Golinko MS, Entero H, Stojadinovic O, Wang VM, et al. Mechanism of sustained release of vascular endothelial growth factor in accelerating experimental diabetic healing. J Invest Dermatol. 2009;129(9):2275-87.

49. Nacci C, Tarquinio M, De Benedictis L, Mauro A, Zigrino A, Carratu MR, et al. Endothelial dysfunction in mice with streptozotocin-induced type 1 diabetes is opposed by compensatory overexpression of cyclooxygenase-2 in the vasculature. Endocrinology. 2009;150(2):849-61.

50. Zhou B, Cao XC, Fang ZH, Zheng CL, Han ZB, Ren H, et al. Prevention of diabetic microangiopathy by prophylactic transplant of mobilized peripheral blood mononuclear cells. Acta Pharmacol Sin. 2007;28(1):89-97.

51. Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. Physiol Res. 2001;50(6):537-46.

52. Manjunath K, Bhanu Prakash G, Subash KR, Tadvi NA, Manikanta M, Umamaheswara Rao K. Effect of Aloe vera leaf extract on blood glucose levels in alloxan induced diabetic rats. National Journal of Physiology, Pharmacy and Pharmacology 2016;6(5):471-4.

53. Ghaffari S, Leask RL, Jones EAV. Blood flow can signal during angiogenesis not only through mechanotransduction, but also by affecting growth factor distribution. Angiogenesis. 2017;20(3):373-84.

54. Dvorak HF, Nagy JA, Feng D, Brown LF, Dvorak AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and the significance of microvascular hyperpermeability in angiogenesis. Curr Top Microbiol Immunol. 1999;237:97-132.

55. Bao P, Kodra A, Tomic-Canic M, Golinko MS, Ehrlich HP, Brem H. The role of vascular endothelial growth factor in wound healing. J Surg Res. 2009;153(2):347-58.

56. He T, Smith LA, Harrington S, Nath KA, Caplice NM, Katusic ZS. Transplantation of circulating endothelial progenitor cells restores endothelial function of denuded rabbit carotid arteries. Stroke. 2004;35(10):2378-84.

57. Hashemi SA, Madani SA, Abediankenari S. The Review on Properties of Aloe Vera in Healing of Cutaneous Wounds. Biomed Res Int. 2015;2015:714216.

58. Pastar I, Stojadinovic O, Yin NC, Ramirez H, Nusbaum AG, Sawaya A, et al. Epithelialization in Wound Healing: A Comprehensive Review. Adv Wound Care (New Rochelle).

2014;3(7):445-64.

59. Asmat U, Abad K, Ismail K. Diabetes mellitus and oxidative stress-A concise review. Saudi Pharm J. 2016;24(5):547-53.

60. Spravchikov N, Sizyakov G, Gartsbein M, Accili D, Tennenbaum T, Wertheimer E. Glucose effects on skin keratinocytes: implications for diabetes skin complications. Diabetes. 2001;50(7):1627-35.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	สุพัสนันท์ แก้วศรีสังข์
วัน เดือน ปี เกิด	22 มกราคม 2536
สถานที่เกิด	อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา
วุฒิการศึกษา	สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมจากโรงเรียนธิดานุเคราะห์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา จากนั้นทำการศึกษาต่อที่สำนักวิชาวิทยาศาสตร์สุขภาพ สาขาการแพทย์แผนไทยประยุกต์ มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง และเข้าศึกษาในหลักสูตรวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาสรีรวิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ที่อยู่ปัจจุบัน	52 ถนนคลองเตย-คลองเปล ตำบลคอหงส์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University