โครงการ บทบาทของตำรับยาแผนไทย “ยาสมานแผล” ในการรักษาแผลเบาหวาน ที่เกิดการติดเชื้อจากไบโอฟิล์ม

โดย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศศิธร ชูศรี

มีนาคม 2562

สัญญาเลขที่ MRG60800019

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ บทบาทของตำรับยาแผนไทย “ยาสมานแผล” ในการรักษาแผลเบาหวาน ที่เกิดการติดเชื้อจากไบโอฟิล์ม

คณะผู้วิจัย	**สังกัด**
ผศ ดร. ศศิธร ชูศรี	คณะการแพทย์แผนไทย
ศ. ดร. ศุภยางค์ วรวุฒิคุณชัย	คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. และ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

EXCUTIVE SUMMARY

Ya-Samarn-Phlae (YaSP) (in Thai; Ya means medicine, Samarn means healing, and Phlae means wound) has been traditionally employed for the treatment of chronic wounds and skin infections. It is composed of *Curcuma longa* L. (rhizome), *Areca catechu* L. (seed), *Oryza sativa* L. (seed), and *Garcinia mangostana* L. (pericarp). Our previous study revealed that the ethanol extract of the formula possessed strong antibacterial activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Moreover, it has been documented to inhibit biofilm formation of *P. aeruginosa* and *Staphylococcus epidermidis*. In addition to its antibacterial and anti-biofilm activities, YaSP also has remarkable anti-inflammation and antioxidant abilities. Our previous study also revealed that among its herbal components, only *Garcinia mangostana* ethanol extract and α-mangostin were found to possess notable antibacterial and anti-biofilm activity against bovine mastitis-isolated staphylococci.

During its traditional preparation, the formula is prepared by extraction with freshly prepared coconut milk and low-temperature cooking to obtain an active oil. Although our previous work indicated an anti-biofilm activity of the ethanol extract of YaSP, the anti-biofilm capability of a traditionally prepared form of YaSP has not been proven yet. Therefore, this study aimed to investigate the anti-biofilm activity of YaSP prepared from both oven-dried and fresh plant parts. *Garcinia mangostana* and α-mangostin were additionally tested as active ingredients of YaSP. This study revealed that a poly-herbal formula, YaSP, remarkably disturbs *P. aeruginosa* and *S. aureus* biofilm formation and affects its biofilm architecture. The eradication of P. aeruginosa mature biofilms after treating with YaSP was also demonstrated.

Wound healing, a critical part of restoration of damaged skin, is a complex process. It consists of coagulation phase, inflammation phase, proliferation phase and remodelling phase. After the skin injury, platelets generate a blood clot for blood stopping and releasing

various types of growth factors such as transforming growth factor-beta1 (TGF-β1) at the site of wound. TGF-β1 plays an importance role of rapidly inflammatory recruiting of the cells in the inflammation phase, and involves in the synthesis and deposition of the extracellular matrix (ECM), re-epithelialization, granulation tissue formation, and angiogenesis in proliferation phase. The final phase of wound healing is the remodelling, which includes new collagen production and the change of collagen synthesis from collagen III to collagen I. Lastly, the collagen synthesis slows down and a scar forms at the site of wound. There are a number of factors that adversely influence wound healing process, TGF-β1 has the broadest spectrum of actions, affecting all cell types that are involved in all stages of wound healing. Both positive and negative effects of TGF-β1 on wound healing have been reported. Positive effects of TGF-β1 on wound healing are initiating inflammation and granulation tissue formation. Its negative effects as a result of excessive and prolonged TGF-β1 in wound site. These events cause abundant inflammation, decreased keratinocyte proliferation and migration affects delay wound healing. Therefore, the decrease of TGF-β1 in late phase was indicated completely wound healing process. Diabetes mellitus significantly delays in development of granulation tissue and impairs cutaneous wound healing.

Goto-Kakizaki (GK/Jcl) rat, spontaneously diabetic rats (type 2 diabetes), has been used as model of diabetes-impaired wound healing. This animal suffers from mild hyperglycaemia and absence of obesity. In this study showed that the topical application of T-YaSP on diabetic wounds in GK/Jcl rat significantly decreased wound area (mm^2) compared with the control group on 3 and 13 days after wounding. Besides on day 13, the TGF-β1 levels in wound tissue of T-YaSP group significantly decreased compared with the control group. On the other hand, the wound area of standard drug was no any differences when compared with the control group. However, the wound area of standard drug was smaller than the control on 3, 5, 9, 11, and 13 days after wounding. In addition, one-fourth of

the wound treated with standard drug had completely healed on day 13, but none of the control rats had yet completely healed. The levels of TGF-β1 on day 13 were significantly higher in wound of standard drug when compared with the control group.

In previous study, TGF-β1 had also been shown to stimulate the production of extracellular matrix molecules, including collagen, and wound contraction. Conversely, it is also well established in various models that an excessive and prolonged TGF-β1 at the wound site does not benefit wound healing which cause delay of wound repair. These events associated with abundant inflammation, decreased keratinocyte proliferation and migration. Normally, the levels of TGF-β1 increased rapidly upon wounding and reached a peak level on day 3 post full-thickness wounding. After that it dropped. Thus, the reduction of TGF-β1 in remodeling phase indicated completely wound healing process. This result has decreased wound area after treated with T-YaSP, which accelerate wound healing. Furthermore, the levels of TGF-β1 in wound tissue after treated with T-YaSP were decreased.

Outputs

Publication

Chokpaisarn J, Yincharoen K, Sanpinit S, Pandian STK, Nandhini JR, Gowrishankar S, Limsuwan S, Kunworarath N, Voravuthikunchai SP, **Chusri S**. Effects of a traditional Thai polyherbal medicine Ya-Samarn-Phlae' as a natural anti-biofilm agent against *Pseudomonas aeruginosa*. Microbial Pathogenesis 2019;128:354-362. (JIF= 2.332)

Proceedings

Sanpinit S., Thisayakorn K., **Chusri S**. Topical application of Ya-Samarn-Phlae ointment promote wound healing in spontaneously diabetic rats (GK/Jcl): A preliminary study. 34th International Annual Meeting in Pharmaceutical Sciences and 2nd CU FPhS - RIKEN CDB Symposium (IAMPS34 and 2nd CU FPhS - RIKEN CDB). Thai Journal of Pharmaceutical Sciences (TJPS). 2018;42 (Supplement Issue): 76-79.

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: MRG60800019

ชื่อโครงการ: บทบาทของตำรับยาแผนไทย “ยาสมานแผล” ในการรักษาแผลเบาหวานที่เกิดการติดเชื้อจากไบโอฟิล์ม

ชื่อนักวิจัยและสถาบัน: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศศิธร ชูศรี และ ศาสตราจารย์ ดร.ศุภยางค์ วรวุฒิคุณชัย (นักวิจัยที่ปรึกษา) มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

อีเมล์: sasitorn.chu@psu.ac.th

ระยะเวลาโครงการ: วันที่ 3 เมษายน พ.ศ. 2560 ถึงวันที่ 2 เมษายน พ.ศ. 2562

ไบโอฟิล์มของแบคทีเรียเป็นสิ่งที่บ่งบอกถึงโรคติดเชื้อที่รักษาได้ยาก เนื่องจาก ไบโอฟิล์มมีความต้านทานต่อระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายและการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะสูงกว่าแบคทีเรียในสภาวะปกติ ดังนั้น การจัดการกับโรคติดเชื้อแบคทีเรียโดยการยับยั้งและทำลายไบโอฟิล์มของแบคทีเรียจึงเป็นความท้าท้ายที่สำคัญในทางการแพทย์ วัตถุประสงค์ของการศึกษาในครั้งนี้เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านไบโอฟิล์มของยาสมานแผลและเปลือกมังคุดซึ่งเป็นสมุนไพรองค์ประกอบในยาสมานแผลต่อไบโอฟิล์มของ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC10145 และ *Staphylococcus epidermidis* ATCC35984 สารที่ใช้ในการทดสอบประกอบด้วยยาสมานแผลเตรียมจากสมุนไพรแห้ง ยาสมานแผลเตรียมจากสมุนไพรสด น้ำมันสกัดเปลือกมังคุดแห้ง และน้ำมันสกัดเปลือกมังคุดสด

การยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มบนพื้นผิวไฮโดรโฟบิก (โพลีสไตรีน) ทดสอบด้วยวิธี crystal violet (CV) assay สาหรับพื้นผิวไฮโดรฟิลิก (แก้ว) ทดสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดและกล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม จากการศึกษาพบว่าสารทดสอบทั้งสี่ชนิดที่ความเข้มข้น 50-0.78% (v/v) สามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มบนพื้นผิวโพลีสไตรีนได้ทั้ง *P. aeruginosa* และ *S. epidermidis* และยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของ *P. aeruginosa* ได้แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) หลังจากทดสอบด้วยยาสมานแผลเตรียมจากสมุนไพรแห้ง ยาสมานแผลเตรียมจากสมุนไพรสด และน้ำมันสกัดเปลือกมังคุดสดที่ความเข้มข้น

0.78% (v/v) โดยไม่มีผลต่อการเจริญเติบโต กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดถูกนำมาใช้เพื่ออธิบายลักษณะของไบโอฟิล์มหลังจากได้รับการทดสอบ ในขณะที่กล้องจุลทรรศน์แรงอะตอมใช้เพื่อศึกษาค่าเฉลี่ยความสูงของไบโอฟิล์ม ค่าจุดสูงสุดของไบโอฟิล์ม และค่าความแตกต่างระหว่างจุดสูงสุดและจุดต่ำสุดของไบโอฟิล์ม แม้ว่าสารทดสอบทั้งสี่ชนิด (50% v/v) มีผลยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มได้ทั้ง *P. aeruginosa* และ *S. epidermidis* ดังภาพถ่ายที่ได้จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด แต่มีเพียงยาสมานแผลเตรียมจากสมุนไพรแห้ง และน้ำมันสกัดเปลือกมังคุดแห้งที่มีผลต่อค่าเฉลี่ยความสูงของไบโอฟิล์มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

เนื่องจากมีความจำเป็นเร่งด่วนในการค้นหาแนวทางการรักษาซึ่งมุ่งไปที่การหยุดยั้งการพัฒนาไบโอฟิล์ม ดังนั้นจึงได้ประเมินประสิทธิภาพของสารทดสอบต่อการทำลายไบโอฟิล์ม โดย *P. aeruginosa* และ *S. epidermidis* ถูกพัฒนาไบโอฟิล์มเป็นเวลา 3 วัน ทั้งบนพื้นผิวไฮโดรโฟบิก (โพลีสไตรีน) และพื้นผิวไฮโดรฟิลิก (แก้ว) ซึ่งเป็นไบโอฟิล์มที่อยู่ในระยะการเจริญเติบโตโดยสมบูรณ์ การทำลายไบโอฟิล์มบนพื้นผิวโพลีสไตรีนทดสอบด้วยวิธี MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) tetrazolium reduction assay พบว่า ยาสมานแผลเตรียมจากสมุนไพรแห้งสามารถทำลายไบโอฟิล์มของแบคทีเรียทั้งสองชนิดประมาณ 40-70% หลังจากทดสอบเป็นเวลา 3-9 ชั่วโมง โดยในระยะเวลาทดสอบเดียวกันนี้ น้ำมันสกัดเปลือกมังคุดแห้งสามารถทำลายไบโอฟิล์มได้เฉพาะของ *P. aeruginosa* จากการทดสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบคอนโฟคอลชนิดที่ใช้เลเซอร์ในการสแกน โดยการย้อมสีไบโอฟิล์มด้วย LIVE/DEAD viability staining หลังจากทดสอบเป็นเวลา 18 ชั่วโมง ไม่ปรากฏเซลล์ตายในไบโอฟิล์มของ P. aeruginosa ที่อยู่ในระยะการเจริญเติบโตโดยสมบูรณ์ แต่สารทั้งสี่ชนิดมีผลต่อค่ามวลชีวภาพ ความหนาเฉลี่ย ความหนาสูงสุดของไบโอฟิล์ม และอัตราส่วนพื้นที่ผิวต่อปริมาตร ในทางตรงกันข้ามพบเซลล์ตายในไบโอฟิล์มของ *S. epidermidis* หลังจากทดสอบด้วยยาสมานแผลเตรียมจากสมุนไพรแห้งและน้ำมันสกัดเปลือกมังคุดแห้ง แต่ไม่มีผลต่อค่ามวลชีวภาพของไบโอฟิล์ม

การแสดงฤทธิ์ต้านไบโอฟิล์มของยาสมานแผลเตรียมจากสมุนไพรแห้ง และน้ำมันสกัดเปลือกมังคุดแห้งมีแนวโน้มที่น่าสนใจในการนาไปศึกษาต่อและการพัฒนาการเตรียมเป็นสารต้านไบโอฟิล์ม โดยเฉพาะการใช้รักษาบาดแผล ดังนั้นจึงมีการศึกษาต่อเนื่องเพื่อประเมินฤทธิ์สมานแผลในระดับสัตว์ทดลองของตำรับยาสมานแผลในรูปแบบยาน้ำมัน โดยในการประเมินฤทธิ์สมานแผลนั้นจะดำเนินการทั้งในหนูทดลองปกติ (Wistar rats) และหนูเบาหวานชนิดที่ 2 (type 2 diabetic Goto-Kakizaki (GK) rats) โดยพบกว่ายาสมานแผลในรูปแบบยาน้ำมันสามารถทำให้การหายของแผลทั้งในหนูปกติและหนูเบาหวานเกิดขึ้นได้สมบูรณ์และเร็วกว่ากลุ่มควบคุม (vehicle control) ที่มีน้ำมันมะพร้าวเพียงอย่างเดียวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และผลการสมานแผลของยาน้ำมัน T-YaSP ให้ผลการสมานแผลไม่แตกต่างกับกลุ่มควบคุมบวก (positive control) ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ยาน้ำมันแผนโบราณสำหรับใส่แผลที่มีขายในท้องตลาด โดยในการสมานแผลพบว่าความสมบูรณ์ของโครงสร้างของแผล การผลิตคอลลาเจน และการลดระดับการอักเสบเกิดขึ้นได้ดีกว่ากลุ่มควบคุมและให้ผลการรักษาที่ไม่แตกต่างกับกลุ่มควบคุมบวก นอกจากนี้ยังพบว่า ยาน้ำมัน T-YaSP สามารถลดการอักเสบที่อาจจะนำไปสู่ภาวะการเกิดแผลเรื้อรังในผู้ที่มีภาวะเบาหวานได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยสารสำคัญที่ตรวจพบใน ยาน้ำมัน T-YaSP ได้แก่ arecoline, bisdemethoxycurcumin, demethoxycurcumin, curcumin, curcumenol และ alpha-mangostin สามารถนำมาประกอบในการใช้เป็นสารบ่งชี้ฤทธิ์ทางชีวภาพของยาน้ำมัน T-YaSP เพื่อใช้ในการควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์ในอนาคต

คำหลัก: ไบโอฟิล์ม, ยาสมานแผล, ตำรับยาแผนไทย, ฤทธิ์สมานแผล

ABSTRACT

Project Code: MRG60800019

Project Title: Roles of Thai traditional herbal medicine, Ya-Samarn-Phlae, on bacterial biofilm-related infections in diabetic wounds

Investigators: Assistant Professor Dr.Sasitorn Chusri and Professor Dr.Supayang Voravuthikunchai, Prince of Songkla University

Email Address: sasitorn.chu@psu.ac.th

Project Period: 3rd April 2017-2nd April 2019

Bacterial biofilms are responsible for several difficult-to-cure infectious diseases. Biofilm is more resistant to the host immune system as well as to antibiotic treatments more than planktonic cells. Therefore, combating bacterial infections by inhibiting or eradicating biofilm formation of the bacterium is a medically important challenge. The aim of this study was to investigate the anti-biofilm activity of Ya-Sa-Marn-Phlae and its effective herbal component, Garcinia mangostana against biofilm producers, Pseudomonas aeruginosa ATCC10145 and Staphylococcus epidermidis ATCC35984. The herbal preparations include hot oil extractions of Ya-Sa-Marn-Phlae prepared from dried (D-YSMP) and fresh herbal materials (F-YSMP) and hot oil extractions of dried (D-GM) and fresh Garcinia mangostana pericarp (F-GM).

Inhibitions of biofilm development on hydrophobic (polystyrene) surface were tested by crystal violet (CV) assay and hydrophilic (glass) surface was observed by scanning electron (SEM) and atomic force (AFM) microscopes. Tested herbal preparations displayed anti-biofilm development activity of P. aeruginosa and S. epidermidis on the polystyrene surface at the tested concentrations of 50-0.78% (v/v). Significantly reduction in biofilm formation of P. aeruginosa on this surface was found after treatment with D-YSMP, F-YSMP and F-GM at 0.78% (v/v), whereas there is no the growth inhibition effect of the planktonic cells was observed at this concentration. SEM was used to furnish images of biofilm reduction after the treatment, while AFM was used for characterizing roughness averages, peak height, and peak-valley height

of the treated biofilms. Even though, treatments with all herbal preparations (50% v/v) resulted in the reduction of both P. aeruginosa and S. epidermidis biofilm formation by SEM images, only D-YSMP and D-GM significantly affected the roughness averages of the treated biofilms.

As there is an urgent need to identify therapeutic strategies that are directed toward the inhibition of bacterial preformed biofilm, the eradication potency of the preparations was additionally evaluated. Static P. aeruginosa and S. epidermidis biofilms were grown for three days on both hydrophobic (polystyrene) and hydrophilic (glass) surfaces and then directly treated with the preparations. The eradication of mature biofilm on hydrophobic surface was tested by MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) tetrazolium reduction assay. Reductions in the bacterial metabolic activity in the preformed biofilms of both pathogens were seen approximately 40-70% after exposure to D-YSMP form 3 to 9 h, while treatment with D-GM only caused a remarkable eradication of a 3-day-old biofilm of P. aeruginosa. Following an 18-h treatment with the preparations, CLSM combined with LIVE/DEAD viability staining revealed that bacterial cell death did not occur in P. aeruginosa maturing biofilms, however remarkable reductions in biomass, average thickness, maximum thickness, and surface to volume ratio were noted. In contrast with S. epidermidis biofilm, CLSM images disclosed that treatment with D-YSMP and D-GM caused bacterial cell death in maturing biofilms, but there is no reduction in biomass of the biofilms.

Promising anti-biofilm activity was displayed by D-YSMP and D-GM suggesting further investigation in order to explore the possible utilization and development of the preparation as an anti-biofilm agent, especially for wound treatment. This present study therefore aimed to evaluate in vivo wound healing activity in both non-diabetic and diabetic rats and reveal the possible mechanism of enhancing wound healing. T-YaSP significantly accelerated the wound healing process in both non-diabetic Wistar rats and type 2 diabetic Goto-Kakizaki (GK) rats, evidenced by the faster rate of wound construction, collagenation, and decreased the level of inflammatory markers compared to the vehicle control group. T-YaSP potently inhibited several oxidative stress and pro-inflammatory markers including MDA, NO, MPO, TNF-beta, COX-2 and iNOS in carrageenan-induced paw edema model. The presence of arecoline (*A. catechu*), bisdemethoxycurcumin, demethoxycurcumin, curcumin, curcumenol (*C. longa*)

and alpha-mangostin (*G. mangostana*) might be responsible for its wound healing potency and anti-inflammatory activity.

Keywords: Biofilm, YaSP, Traditional medicine, Wound healing

สารบัญ

	หน้า
บทนำ	1
วัตถุประสงค์	5
บทตรวจเอกสาร	6
วิธีการดำเนินการวิจัย	53
ผลการดำเนินงานวิจัย	67
วิจารณ์ผล	106
เอกสารอ้างอิง	110
ภาคผนวก	

1. บทนำ

กระบวนการหายของแผล (wound healing process) คือ กระบวนการทางชีววิทยาที่มีความซับซ้อนซึ่งเกี่ยวข้องกับการซ่อมแซมเนื้อเยื่อหลังจากการได้รับบาดเจ็บ (Velnar *et al*., 2009) โดยสามารถแบ่งออกได้เป็น 4 ระยะ คือ ระยะการห้ามเลือด (haemostasisphase) ระยะการอักเสบ (inflammationphase) ระยะการเพิ่มจำนวนของเซลล์ (proliferationphase) และระยะการปรับรูปร่าง (remodeling phase) (Shah*et al*., 2012) กระบวนการหายของแผลปกติจะเกิดขึ้นทันทีเมื่อร่างกายได้รับบาดเจ็บ โดยเริ่มจากระยะการห้ามเลือด เพื่อป้องกันการสูญเสียเลือดออกนอกร่างกาย โดยการทำงานของเกล็ดเลือด พร้อมทั้งมีการหลั่งปัจจัยการเจริญเติบโต (growth factor) ได้แก่ transforming growth factor (TGF)-beta ทำหน้าที่เป็นตัวชักนำเซลล์เม็ดเลือดขาว (mast cell, neutrophil, macrophage และ T-cell ตามลำดับ) ไปยังบริเวณแผล และเข้าสู่ระยะการอักเสบ ซึ่งเป็นระยะที่มีความสำคัญของกระบวนการหายของแผล โดยเซลล์เม็ดเลือดขาวจะทำหน้าที่กำจัดและทำลายสิ่งแปลกปลอมหรือเนื้อตายบริเวณแผล ในขณะที่เกิดปฏิกิริยาการอักเสบเซลล์ macrophage ในระยะ M1 จะมีการหลั่งสารสื่อกลางในการอักเสบชนิดต่างๆ ได้แก่ nitric oxide (NO), prostaglandins E_2 (PGE_2) และ pro-inflammatory cytokines (Jung *et al*., 2009) เพื่อส่งเสริมกระบวนการอักเสบ เมื่อบริเวณแผลปราศจากสิ่งแปลกปลอม เซลล์ macrophage จะเกิดการเปลี่ยนแปลงจากระยะ M1 ไปเป็นระยะ M2 โดยจะมีการหลั่ง interleulin-10 (IL-10) ซึ่งทำหน้าที่เป็น anti-inflammatory cytokines เพื่อหยุดกระบวนการอักเสบ และมีการหลั่ง TGF-beta ออกมาจำนวนมากซึ่งเป็น growth factor ที่สำคัญในการเปลี่ยนผ่านจากระยะการอักเสบเข้าสู่ระยะการเพิ่มจำนวนของเซลล์ ซึ่ง TGF-beta ที่หลั่งออกมาจาก macrophageM2 ในช่วงท้ายของระยะการอักเสบ จะมีผลกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์ keratinocyte, fibroblast และกระตุ้นการสร้าง collagen ทำให้เกิดการหดตัวของแผล และเข้าสู่ระยะการปรับรูปร่าง โดยจะเกี่ยวข้องกับการสร้างและสลาย extracellular matrix (ECM) บริเวณแผล จนกระทั่งแผลหายเป็นปกติ แต่หากเกิดความผิดปกติในระยะใดระยะหนึ่ง จะทำให้เกิดความบกพร่องและล่าช้าในกระบวนการหายของแผล จะเกิดเป็นแผลเรื้อรัง (chronic wound) ขึ้น

โรคเบาหวาน (Diabetic mellitus) คือ โรคเรื้อรังที่เป็นปัญหาสำคัญทางด้านสาธารณสุขทั่วโลกในปี ค.ศ. 2015 มีผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคเบาหวานประมาณ 415 ล้านคนทั่วโลก และคาดว่าผู้ป่วยโรคเบาหวานจะเพิ่มขึ้นเป็น 642 ล้านคนในปี ค.ศ. 2040 (Zimmet *et al*., 2016) ในประเทศไทย จากรายงานการสำรวจสุขภาพประชากรไทยโดยการตรวจร่างกายครั้งที่ 5 พ.ศ. 2557 พบว่าคนไทยอายุ 15 ปีขึ้นไป มีความชุกของโรคเบาหวานเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 6.9 ในปี พ.ศ. 2552 เป็นร้อยละ 8.9 ในปี พ.ศ. 2557 การมีระดับน้ำตาลในเลือดสูงเป็นเวลานาน จะก่อให้เกิดผลเสียต่อหลอดเลือดแดงที่ไปเลี้ยงอวัยวะต่างๆ ทำให้เกิดการมองเห็นลดลง การกรองที่ไตลดลง และการนำกระแสประสาทเสื่อม หรือที่เรียกว่า diabetic neuropathy โดยเฉพาะบริเวณปลายเท้า ทำให้เกิดอาการชาจากปลายประสาทที่เท้าเสื่อม และก่อให้เกิดแผลเรื้อรังได้ง่าย โดยแผลที่เท้าของผู้ป่วยเบาหวาน (diabetic foot ulcers; DFUs) สามารถพบได้ประมาณ 25% ของผู้ป่วยเบาหวานทั้งหมด (Boulton, 2013) นอกจากนี้ภาวะน้ำตาลในเลือดสูง (hyperglycemia) ที่พบในผู้ป่วยเบาหวาน จะมีผลต่อการทำงานของเซลล์ macrophage ทำให้คุณสมบัติของ macrophage ในการกำจัดเซลล์ neutrophil ที่เกิดการ apoptotic ลดลง (Hesketh *et al*., 2017) ซึ่งภาวะแผลเรื้อรังเนื่องจากโรคเบาหวานจะเกี่ยวข้องกับระยะการอักเสบที่ใช้เวลานาน ซึ่งขาดความสมดุลระหว่าง pro- และ anti-inflammatory cytokines โดย macrophage ในแผลเบาหวาน จะมีการสร้าง pro-inflammatory cytokines สูงกว่าเมื่อเทียบกับแผลปกติ (Weisberg *et al*., 2003; Goren *et al*., 2007)

การทำแผลโดยใช้ยาใส่แผล เป็นวิธีการรักษาพยาบาลที่ปฏิบัติกันโดยทั่วไป ทั้งในรูปแบบยาน้ำ เจล ครีม ขี้ผึ้ง หรือแผ่นปิดแผล ซึ่งมีคุณสมบัติต้านเชื้อแบคทีเรีย ต้านการอักเสบ และกระตุ้นการสร้างเนื้อเยื่อใหม่บริเวณแผล เช่น povidone iodine ซึ่งมีคุณสมบัติที่ดีต่อการต้านเชื้อแบคทีเรียรวมทั้งมีคุณสมบัติต้านการอักเสบโดยมีผลต่อการยับยั้งการทำงานของเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบและยับยั้งสารสื่อกลางต่างๆ เช่น tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) และ NOและยังมีผลยับยั้งการสร้างเอนไซม์ metalloproteinase (MMP) (Beukelman *et al*., 2008; Bigliardi*et al*., 2017) และมีการใช้ Solcoseryl jellyในการรักษาแผล จากงานวิจัยของ Imran และคณะ (2015) ได้ศึกษาผลของการใช้ 10% Solcoseryl jelly ต่อการรักษาแผลในหนูทดลอง พบว่าหนูกลุ่มที่ได้รับ 10% Solcoseryl jelly มีระยะเวลาในการหายของแผล (22 วัน) เร็วกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (32 วัน) และการใช้ในรูปแบบ Solcoserylointment พบว่าสามารถเพิ่มการแสดงออกของ TGF-beta1 และ vascular endothelial growth factor A (VEGF-A) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการส่งเสริม TGF-beta1 และ VEGF-a signalling pathwayในเนื้อเยื่อแผล และยังส่งผลต่อการสังเคราะห์ collagen และสร้างหลอดเลือดใหม่บริเวณเนื้อเยื่อแผลมากขึ้น (Nafiuand Rahman, 2015) นอกจากนี้มีการนำ growth factor เช่น epidermal growth factor (EGF)มาประยุกต์ใช้ในรูปแบบเจลทาแผล ออกฤทธิ์โดยการไปจับกับ epidermal growth factor receptor (EGFR) กระตุ้นให้เกิด cell proliferation และ เร่งการสร้าง granulation tissue ซึ่งสามารถรักษาแผลเรื้อรังให้หายเป็นปกติได้ (Hardwicke *et al*., 2008)

ในปัจจุบันมีการนำสมุนไพรมาใช้ในการรักษาโรคต่างๆ รวมทั้งการรักษาแผลเรื้อรังอย่างแพร่หลาย ซึ่งเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการรักษาแผลในทางการแพทย์แผนไทยมีการใช้ยาสมุนไพรมาเป็นระยะเวลานานเพื่อรักษาแผล โดยส่วนใหญ่จะนิยมใช้ยาตำรับซึ่งประกอบด้วยสมุนไพรมากกว่าหนึ่งชนิดในการรักษาโรคมากกว่าสมุนไพรเดี่ยว เพราะสมุนไพรองค์ประกอบในยาตำรับจะมีคุณสมบัติในการเสริมฤทธิ์กัน ช่วยให้การรักษาโรคต่างๆ มีประสิทธิภาพมากขึ้นแต่รายงานวิจัยส่วนใหญ่มีการทดสอบผลต่อการหายของแผลของสมุนไพรเดี่ยวเท่านั้น ดังนั้นการศึกษาทางวิทยาศาสตร์ของตำรับยาจึงมีความจำเป็นเพื่อใช้เป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ในการนำมาสนับสนุนการใช้งาน จากการศึกษาก่อนหน้านี้ ได้ศึกษาตำรับยารักษาแผลในภาคใต้พบว่าประสิทธิภาพของการใช้ตำรับยาในการทดสอบฤทธิ์ต่างๆ จะดีกว่าพืชสมุนไพรเดี่ยว โดยพบว่าสารสกัดที่ทำการสกัดด้วย 95% เอทานอล จากตำรับยาสมานแผล (Ya-Samarn-Phlae; YaSP) ของหมอพื้นบ้านในจังหวัดสงขลา นายสมพร ชาญวณิชย์สกุล ซึ่งเป็นแพทย์แผนไทย ประจำโรงพยาบาลการแพทย์แผนไทย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ ประกอบด้วยพืชสมุนไพร 4 ชนิด คือ เหง้าขมิ้นชัน (*Curcuma longa* L.) เปลือกมังคุด (*Garcinia mangostana* L.) เมล็ดหมาก (*Areca catechu* L.) และข้าวสาร (*Oryza sativa* L.) โดยสารสกัดจากเอทานอลในตำรับยาดังกล่าวมีประสิทธิภาพดีในการต้านเชื้อ *Staphylococcus aureus*สายพันธุ์ MRSA, MSSA และ ATCC25923 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่พบบ่อยว่าเป็นสาเหตุของการติดเชื้อทางผิวหนังส่งผลให้แผลหายช้า โดยมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งเชื้อ (minimal inhibitory concentration; MIC) อยู่ในช่วง 2-4 µg/ml นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านการอักเสบอีกด้วย (Chusri *et al*., 2013)

ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะนำตำรับยาสมานแผลในรูปแบบน้ำมัน (T-YaSP) มาศึกษาความสามารถในการต้านไบโอฟิล์มซึ่งเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ส่งเสริมให้เกิดแผลเรื้อรังและฤทธิ์ต้านการอักเสบ ตลอดจนประเมินฤทธิ์ต่อการหายของแผลในหนูปกติ หนูเบาหวาน และศึกษากลไกการออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการหายของแผล ซึ่งผลที่

คาดว่าจะได้รับจากการศึกษาในครั้งนี้ คือ หลักฐานทางวิทยาศาสตร์ที่จะช่วยอธิบายการนำตำรับยามาใช้รักษาแผลนำไปสู่การยอมรับของการใช้ยาสมุนไพรและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติเป็นทางเลือกในการดูแลสุขภาพและใช้เป็นข้อมูลทางวิทยาศาสตร์เพิ่มเติมในการพัฒนาผลิตภัณฑ์รักษาแผลจากตำรับยาสมุนไพรไทยในอนาคต

2 วัตถุประสงค์

2.1 เพื่อประเมินฤทธิ์ต้านไบโอฟิล์ในระดับหลอดทดลองของตำรับยาสมานแผลในรูปแบบน้ำมัน

2.2 เพื่อทำการศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบและกลไกการออกฤทธิ์ของรูปแบบน้ำมันในหนูขาว

2.3 เพื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ต่อการหายของแผลและกลไกการออกฤทธิ์ของรูปแบบน้ำมันในหนูขาวสายพันธุ์ปกติและหนูเบาหวาน

3. บทตรวจเอกสาร

3.1 ฤทธิ์ต้านไบโอฟิล์มของพืชสมุนไพร

การศึกษาฤทธิ์ต้านไบโอฟิล์มของสมุนไพรจากประเทศต่างๆ ในปี ค.ศ. 2008-2014 (**ตารางที่ 3.1**) จากรายงานผลการวิจัย พบว่า พืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านไบโอฟิล์มมีจำนวนทั้งหมด 42 ชนิด 25 วงศ์ วงศ์ที่มีรายงานมากที่สุด ได้แก่ Fabaceae, Lamiaceae และ Apiaceae มีจำนวน 8, 4 และ 3 ชนิด ตามลำดับ ส่วนวิธีที่ใช้ในการทดสอบมีทั้งหมด 6 วิธี ได้แก่ crystal violet assay, safranin staining, p-iodonitrotetrazolium violet method, bacterial counts method, กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด (Scanning electron microscope; SEM) และ colorimetic method by 5% phenol ร่วมกับ concentrated sulfuric acid ซึ่งวิธีทดสอบ crystal violet assay เป็นวิธีที่ใช้ทดสอบมากที่สุด แสดงผลการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม 24-95% โดยมีค่าความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบ 0.022-4 mg/ml วิธีทดสอบ safranin staining แสดงผลการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม 100% โดยมีค่าความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบ 0.00781-0.625 mg/ml วิธีทดสอบ p-iodonitrotetrazolium violet method แสดงผลการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม 100% โดยมีค่าความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบ 0.25-0.5 mg/ml วิธีทดสอบ bacterial counts method แสดงผลการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม 95-99% โดยมีค่าความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบ 0.78 mg/ml และแสดงผลการทำลายไบโอฟิล์ม ≥ 80% โดยมีค่าความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบ 0.5-1 mg/ml วิธีทดสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดส่องกราด (SEM) แสดงผลการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม โดยมีค่าความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบ 0.05 mg/ml และวิธีทดสอบ colorimetic method โดยใช้สี 5% phenol ร่วมกับ concentrated sulfuric acid แสดงผลลดการสร้างสารเอกซ์โซพอลิแซ็กคาไรด์ 46-67% โดยมีค่าความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบ 2 mg/ml

ในประเทศบราซิล มีรายงานการศึกษาผลของสารสกัดของพืชสมุนไพรต่อการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของ *S. epidermidis* บนพื้นผิวโพลีสไตรีน โดยทำการศึกษาตัวอย่างสารสกัดด้วยน้ำ พบว่า ที่ความเข้มข้น 0.4 mg/ml สารสกัดจากเปลือกต้น *Commiphora leptophloeos* และสารสกัดจากผล *Senna macranthera* มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม โดยมีค่าการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม 67.3% และ 56.7% ตามลำดับ นอกจากนี้ผู้วิจัยยังทำการทดสอบที่ความเข้มข้น 4 mg/ml พบว่า สารสกัดน้ำจากพืชสมุนไพรจำนวน 8 ชนิด มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม ซึ่งเมื่อทดสอบกับสารสกัดจากเปลือกต้น *Anadenanthera colubrine, Commiphora leptophloeos* และ *Myracrodruoun urundeuva* แสดงผลยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม 88.4%, 84.7%, และ 83.9% ตามลำดับ สารสกัดจากผล *Bauhinia acuruana*, *Chamaecrista desvauxii, Libidibia ferrea* แสดงผลยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม 77.8%, 87.4% และ 70% ตามลำดับ สารสกัดจากใบ *Parkinsonia aculeate*, *Pityrocarpa moniliformis* แสดงผลยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม 52.8% และ 77% ตามลำดับ และสารสกัดจากกิ่ง *Bauhinia acuruana* แสดงผลยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม 81.7% (Trentin *et al*., 2011)

ในประเทศอิตาลี มีรายงานการศึกษาผลของสารสกัดพืชสมุนไพรต่อการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของ MRSA โดยทำการศึกษาพืชสมุนไพรจำนวน 104 ชนิด ในเขตพื้นที่ทางตอนใต้ของประเทศอิตาลี พบว่า สารสกัดจากพืชสมุนไพร 10 ชนิด มีฤทธิ์ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของ MRSA ได้แก่ *Lonicera alpigena*, *Castanea sativa*, *Juglans regia*, *Ballota nigra*, *Rosmarinus officinalis*, *Leopoldia comosa*, *Malva sylvestris*, *Cyclamen hederifolium*, *Rosa canina*

var. *canina*, และ *Rubus ulmifolius* ซึ่งแสดงการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม 50% ที่ความเข้มข้น ≤ 0.032 mg/ml (Quave *et al*., 2008)

ในประเทศตูนีเซีย มีรายงานการศึกษาฤทธิ์ต้านไบโอฟิล์มของสารสกัด *Nigella sativa* ทำการทดสอบใน *S. aureus และ S. epidermidis* ด้วยวิธี crystal violet assay พบว่า สารสกัดของ *Nigella sativa* มีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเกิดไบโอฟิล์ม 50% (minimum biofilm inhibitory concentration; BIC50) เท่ากับ 0.022 และ 0.06 mg/ml ตามลำดับ (Chaieb *et al*., 2011)

ในประเทศอินเดีย มีรายงานการศึกษาฤทธิ์ต้านไบโอฟิล์มของสารสกัดจากพืชสมุนไพรต่อ *Escherichia coli สายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วย ทำการทดสอบด้วย*วิธี crystal violet assay โดย*ใช้สารสกัดเอทานอลจากส่วนใบของพืชที่ความเข้มข้น 0.01, 0.025, 0.05, 0.075 และ 0.1* mg/ml *พบว่า* สารสกัด *Azadirachta indica* มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มคิดเป็น 22%, 34.5%, 47.5% และ 59% ตามลำดับ สารสกัด *Vitex negundu* มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มคิดเป็น 12%, 32%, 43%, 51% และ 65% ตามลำดับ สารสกัด *Tridax procumbens* มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มคิดเป็น 12%, 21%, 30.1%, 37.6%, 41.9% และสารสกัด *Ocimum tenuiflorumi* มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มคิดเป็น 10%, 16.2%, 23.4%, 29%, 33% ตามลำดับ (Namasivayam and Roy, 2013) และรายงานการศึกษาผลของสารสกัด *Capparis spinosa* ต่อการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของ *Serratia marcescens, P. aeruginosa, E. coli* และ *Proteus mirabilis* พบว่า สารสกัดเมทานอลจากผลแห้งของ *Capparis spinosa* ที่ความเข้มข้น 2 mg/ml มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มและยับยั้งการสร้างสาร*เอกซ์โซ*พอลิแซ็กคาไรด์ โดยมีค่าการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มเท่ากับ 79%, 75%, 73% และ 70% ตามลำดับ ส่วนผลการยับยั้งการสร้างสาร*เอกซ์โซ*พอลิแซ็กคาไรด์ พบว่า สารสกัด *Capparis spinosa* แสดงผลยับยั้งการสร้างสาร*เอกซ์โซ*พอลิแซ็กคาไรด์ 58%, 46%, 66% และ 67% ตามลำดับ (Issac Abraham *et al*., 2011)

ในประเทศไทย มีรายงานการศึกษาผลของสารสกัด *Rhodomyrtus tomentosa* และสาร rhodomyrtone ต่อการยับยั้งและทำลายไบโอฟิล์มของแบคทีเรียในกลุ่ม staphylococci ด้วยวิธี crystal violet assay ซึ่งในการทดสอบกับ *S. aureus* พบว่า สารสกัด *Rhodomyrtus tomentosa* และสาร rhodomyrtone ที่ความเข้มข้น 0.5MIC และ 0.25MIC มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของ *S. aureus* ส่วนผลการทำลายไบโอฟิล์ม พบว่า สารสกัด *Rhodomyrtus tomentosa* และสาร rhodomyrtone มีฤทธิ์ทำลายไบโอฟิล์มของ *S. aureus* ที่มีอายุ 24 ชั่วโมงและ 5 วัน ซึ่งสารทั้งสองชนิดมีค่า*ความเข้มข้น*ต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย (minimum inhibitory concentration*: MIC*) เท่ากับ 0.032-0.128 mg/ml และ 0.0005-0.001 mg/ml ตามลำดับ และในการทดสอบกับ *S. epidermidis* พบว่า ที่ความเข้มข้น 0.5MIC และ 0.25MIC สารสกัด *Rhodomyrtus tomentosa* และสาร rhodomyrtone มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของ *S. epidermidis* จำนวน 6 และ 5 สายพันธุ์ ตามลำดับ จากสายพันธุ์ที่ใช้ทดสอบทั้งหมด 6 สายพันธุ์ ส่วนผลการทำลายไบโอฟิล์ม พบว่า ที่ความเข้มข้น 64MIC สารสกัด *Rhodomyrtus tomentosa* และสาร rhodomyrtone มีฤทธิ์ทำลายไบโอฟิล์มของ *S. epidermidis* ที่มีอายุ 24 ชั่วโมง และ 5 วัน ได้แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ซึ่งสารทั้งสองชนิดมีค่า *MIC* เท่ากับ 0.032-0.256 mg/ml และ 0.00025-0.001 mg/ml ตามลำดับ (Saising *et al*., 2011)

ตารางที่ 3.1 Anti-biofilm activity of medicinal plants

Scientific names (Family: part used)	Tested Methods	Anti-biofilm activity (concentration; mg/ml)	Pathogens	References
Andrographis paniculata (Acanthaceae: whole plants)	crystal violet assay	87.5-88.6% of biofilm inhibition (-)	*Pseudomonas aeruginosa*	Murugan *et al*., 2011
Anadenanthera colubrine (Fabaceae: stem barks)	crystal violet assay	88.4% of biofilm inhibition (4)	*Staphylococcus epidermidis*	Trentin *et al*., 2011
Azadirachta indica (Meliaceae: leaves)	crystal violet assay	65% of biofilm inhibition (0.1)	*Escherichia coli*	Namasivayam and Roy, 2013
Ballota nigra (Lamiaceae: leaves; stems; flowers)	crystal violet assay	at lest 50% of biofilm inhibition (≤ 0.032)	Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)	Quave *et al*., 2008
Bauhinia acuruana (Fabaceae: fruits, branches)	crystal violet assay	77.8% of biofilm inhibition for fruits (4) 81.7% of biofilm inhition for branches (4)	*S. epidermidis*	Trentin *et al*., 2011
Boesenbergia pandurata (Zingiberaceae: rhizomes)	safranin staining	biofilm inhibition (0.00781)	*Streptococcus pyogenes*	Limsuwan and Voravuthikunchai, 2008
Buchanania lanzan (Anacardiaceae: roots)	crystal violet assay	62.18% of biofilm inhibition (0.625) 44.18% of biofilm inhibition (0.3125)	*E. coli* *P. aeruginosa*	Pattnaik *et al*., 2013

Scientific names (Family: part used)	Tested Methods	Anti-biofilm activity concentration; mg/ml)	Pathogens	References
Capparis spinosa (Capparaceae: fruits)	crystal violet assay	79% of biofilm inhibition (2)	*Serratia marcescens*	Issac Abraham *et al*., 2011
		75% of biofilm inhibition (2)	*P. aeruginosa*	
		73% of biofilm inhibition (2)	*E. coli*	
		70% of biofilm inhibition (2)	*Proteus mirabilis*	
	colorimetic method by 5% phenol and conecentrated sulfuric acid	58% reduction in EPS production (2)	*S. marcescens*	
		46% reduction in EPS production (2)	*P. aeruginosa*	
		66% reduction in EPS production (2)	*E. coli*	
		67% reduction in EPS production (2)	*P. mirabilis*	
Castanea sativa (Fagaceae: inflorescences)	crystal violet assay	at lest 50% of biofilm inhibition (≤ 0.032)	MRSA	Quave *et al*., 2008
Chamaecrista desvauxii (Fabaceae: fruits)	crystal violet assay	87.4% of biofilm inhibition (4)	*S. epidermidis*	Trentin *et al*., 2011
Commiphora leptophloeos (Burseraceae: stem barks)	crystal violet assay	67.3% of biofilm inhibition (0.4)	*S. epidermidis*	Trentin *et al*., 2011
		84.7% of biofilm inhibition (4)		
Couroupita guianensis (Lecythidaceae: fruits)	crystal violet assay	52% of biofilm inhibition (2)	*P. aeruginosa*	Al-Dhabi *et al*., 2012

Scientific names (Family: part used)	Tested Methods	Anti-biofilm activity (concentration; mg/ml)	Pathogens	References
Cuminum cyminum (Apiaceae: seeds)	crystal violet assay	84–95% of biofilm inhibition (0.5–2) 76–85% of biofilm inhibition (0.5–2) 24–71% of biofilm inhibition (0.5–2)	*P. mirabilis* *P. aeruginosa* *S. marcescens*	Packiavathy *et al*., 2012
Cyclamen hederifolium (Myrsinaceae: tubers)	crystal violet assay	at lest 50% of biofilm inhibition (≤ 0.032)	MRSA	Quave *et al*., 2008
Dodonaea viscose (Sapindaceae: leaves)	plate count method	95, 97 and 99% of bioiflm inhtion when observed after 6, 24 and 30 h respectively (0.78)	*Streptococcus mutans*	Naidoo *et al*., 2012
Eleutherine americana (Iridaceae: bulbs)	safranin staining	biofilm inhibition (0.00781–0.125)	*S. pyogenes*	Limsuwan and Voravuthikunchai, 2008
Euphorbia hirta (Euphorbiaceae: aerial parts)	p-iodonitrotetrazolium violet method	100% of biofilm inhibition (0.25) 100% of biofilm eradication (0.5)	*P. aeruginosa*	M
Ginkgo biloba (Ginkgoaceae: -)	crystal violet assay SEM	biofilm inhibition (0.05) biofilm inhibition on nylon membranes (0.05)	*E. coli*	Lee *et al*., 2014
Juglans regia (Juglandaceae: immature fruits)	crystal violet assay	at lest 50% of biofilm inhibition (≤ 0.032)	MRSA	Quave *et al*., 2008
Leopoldia comosa (Hyacinthaceae: bulbs)	crystal violet assay	at lest 50% of biofilm inhibition (≤ 0.032)	MRSA	Quave *et al*., 2008
Libidibia ferrea (Fabaceae: fruits)	crystal violet assay	70% of biofilm inhibition (4)	*S. epidermidis*	Trentin *et al*., 2011

Scientific names (Family: part used)	Tested Methods	Anti-biofilm activity (concentration; mg/ml)	Pathogens	References
Lonicera alpigena (Caprifoliaceae: woods)	crystal violet assay	at lest 50% of biofilm inhibition (≤ 0.032)	MRSA	Quave *et al*., 2008
Malva sylvestris (Malvaceae: stems)	crystal violet assay	at lest 50% of biofilm inhibition (≤ 0.032)	MRSA	Quave *et al*., 2008
Mentha piperita (Lamiaceae: -)	crystal violet assay	38% of biofilm inhibition (1)	*P. aeruginosa*	Sandasi *et al*., 2011
Mutellina purpurea (Apiaceae: essential oil from aerial parts)	safranine staining	100% biofilm inhibition (0.625)	*S. epidermidis*	Sieniawska *et al*., 2013
Myracrodruoun urundeuva (Anacardiaceae: stem barks)	crystal violet assay	83.9% of biofilm inhibition (4)	*S. epidermidis*	Trentin *et al*., 2011
Nigella sativa (Apiaceae: seeds)	crystal violet assay	50% biofilm inhibition (0.022) 50% biofilm inhibition (0.06) 50% biofilm inhibition (0.085)	*S. aureus* *S. epidermidis* *E. feacalis*	Chaieb *et al*., 2011
Ocimum tenuiflorumi (Lamiaceae: leaves)	crystal violet assay	33% of biofilm inhibition (0.1)	*E. coli*	Namasivayam and Roy, 2013
Parkinsonia aculeate (Fabaceae: leaves)	crystal violet assay	52.8% of biofilm inhibition (4)	*S. epidermidis*	Trentin *et al*., 2011

Scientific names (Family: part used)	Tested Methods	Anti-biofilm activity (concentration; mg/ml)	Pathogens	References
Pityrocarpa moniliformis (Fabaceae: leaves)	crystal violet assay	77% of biofilm inhibition (4)	*S. epidermidis*	Trentin *et al*., 2011
Quercus cerris (Fagaceae: leaves)	crystal violet assay	63% of biofilm inhibition (0.2)	*S. aureus*	Hobby *et al*., 2012
Quercus infectoria (Fagaceae: nutgalls)	crystal violet assay	biofilm inhibition (0.25)	MRSA	Chusri *et al*., 2012
Rhodomyrtus tomentosa (Myrtaceae*: leaves)*	crystal violet assay	biofilm inhibition (0.5 and 0.25MIC ; MIC = 0.032-0.128)	*S. aureus*	Saising *et al*., 2011
		biofilm inhibition (0.5 and 0.25MIC ; MIC = 0.032-0.256)	*S. epidermidis*	
Rosa canina (Rosaceae: fruits)	crystal violet assay	at lest 50% of biofilm inhibition (≤ 0.032)	MRSA	Quave *et al*., 2008
Rosmarinus officnalis (Lamiaceae: leaves; stems; flowers)	crystal violet assay	at lest 50% of biofilm inhibition (≤ 0.032)	MRSA	Quave *et al*., 2008
Rubus ulmifolius (Rosaceae: roots)	crystal violet assay	at lest 50% of biofilm inhibition (≤ 0.032)	MRSA	Quave *et al*., 2008
Senna macranthera (Fabaceae: fruits)	crystal violet assay	56.7% of biofilm inhibition (0.4)	*S. epidermidis*	Trentin *et al*., 2011
Syzygium cumini (Myrtaceae: seeds)	plate count method	≥ 80% of biofilm eradication (0.5-1)	*S. mutans*	Patel *et al*., 2013

Scientific names (Family: part used)	Tested Methods	Anti-biofilm activity (concentration; mg/ml)	Pathogens	References
Tamarindus indica (Fabaceae: seeds)	plate count method	≥ 80% of biofilm eradication (0.5-1)	*S. mutans*	Patel *et al*., 2013
Tridax procumbens (Asteraceae: leaves)	crystal violet assay	41.9% of biofilm inhibition (0.1)	*E. coli*	Namasivayam and Roy, 2013
Vitex negundu (Verbenaceae: leaves)	crystal violet assay	65.0% of biofilm inhibition (0.1)	*E. coli*	Namasivayam and Roy, 2013

3.2 กลไกของกระบวนการอักเสบ (inflammation) และบทบาทของกระบวนการอักเสบที่เกี่ยวข้องกับการหายของแผล

กลไกของกระบวนการอักเสบ (inflammation)

การอักเสบ (inflammation) เป็นส่วนหนึ่งของกระบวนการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันในร่างกายต่อสิ่งที่ทำให้เกิดการบาดเจ็บของเนื้อเยื่อเช่น การได้รับหรือสัมผัสกับสารเคมี การติดเชื้อไวรัสหรือแบคทีเรีย และการเกิดแผล เป็นต้น (Wu and Chen, 2014) หลังจากการเกิดแผล จะทำให้หลอดเลือดฉีกขาด ส่งผลต่อการหดตัวของหลอดเลือด (vasoconstriction) ที่เป็นผลมาจากการทำงานของ nerve reflex ซึ่งอยู่บริเวณเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือด (endothelial cell) เพื่อชะลอการไหลของเลือด จากนั้นเกล็ดเลือด (platelet) ซึ่งอยู่ในหลอดเลือดจะตอบสนองโดยการยึดเกาะกับชั้น subendothelial layer ของตำแหน่งหลอดเลือดที่ฉีกขาด โดยอาศัยตัวรับ (receptor) ที่อยู่บนผิวของเกล็ดเลือด (platelet membrane) ได้แก่ glycoprotein (GP) receptor ซึ่งมีหลายชนิด แต่ชนิดที่มีความสำคัญในการยึดเกาะ คือ GP Ia/IIa และ GP Ib/IX โดย GP Ia/IIa จะเข้าจับกับ subendothelial collagen และ GP Ib/IX จะเข้าจับกับโปรตีน von Willebrand factor (vWF) ซึ่งอยู่ใน plasma ทำหน้าที่เป็น cell adhesion molecule โดย vWF จะเป็นตัวเชื่อมต่อระหว่าง subendothelial collagen กับ GP Ib/IX ของ platelet membrane ทำให้ platelet เกิดการยึดกับ subendothelial layer ได้ดีขึ้น เรียกกระบวนการนี้ว่า platelet adhesion (Thomas and Storey, 2015) หลังจากนั้น platelet จะหลั่ง chemical mediators เช่น adenosine diphosphate (ADP), thromboxane A2 (TxA2) หรือ serotonin จาก granules เพื่อกระตุ้นให้ platelet ตัวอื่นๆ เข้ามารวมตัวและเกาะกลุ่มกันมากขึ้นจนเกิดเป็น platelet plug หรือเรียกกระบวนการนี้ว่า platelet aggregation (Golebiewska and Poole, 2015) หลังจากนั้นจะเกิดกระบวนการสร้างลิ่มเลือด ซึ่งอาศัยปัจจัยการแข็งตัวของเลือด (clotting factor) เช่น FI (fibrinogen), FII (prothrombin) หรือ FIII (Thromboplastin) เป็นต้น โดยจะเกิดการเปลี่ยนแปลงจาก prothrombin ไปเป็น thrombin ซึ่งมีคุณสมบัติในการเปลี่ยน fibrinogen ไปเป็น fibrin และเข้ารวมตัวกับกลุ่ม platelet ทำหน้าที่เป็นโครงข่าย (mesh-like matrix) ให้ platelet หลังจากนั้นจะเกิดการเชื่อมต่อ หรือ cross-linking ระหว่าง fibrin ทำให้ลิ่มเลือดแข็งแรงมากขึ้น เรียกว่า fibrin clot (Palta *et al*., 2014) เพื่อหยุดการไหลของเลือด นอกจากนี้ platelet ยังทำหน้าที่สร้างและหลั่ง cytokines หรือ growth factors ได้แก่ thrombin, transforming growth factor (TGF)-beta, platelet derived growth factor (PDGF) และ vascular endothelial growth factor (VEGF) ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวชักนำให้เซลล์เม็ดเลือดขาวเคลื่อนที่ออกจากหลอดเลือดเข้าสู่บริเวณแผลอีกด้วย ในขณะเดียวกันเมื่อเกิดแผลเนื้อเยื่อบริเวณผิวหนังที่ได้รับบาดเจ็บ และ mast cells จะมีการสร้างและหลั่งสาร histamine ส่งผลให้เกิดการขยายตัวของหลอดเลือด (vasodilation) เพิ่มการซึมผ่านของหลอดเลือด (vascular permeability) และชักนำเซลล์ neutrophil ให้เคลื่อนที่ออกนอกหลอดเลือดเข้าสู่บริเวณแผล จากการศึกษาของ Egozi และคณะ (2003) พบว่าหนูที่มีความบกพร่องของ mast cells (mast cells-deficient WBB6F1/J-KitW/KitW-v mice) จะทำให้มีจำนวนของ neutrophils บริเวณแผลลดลง แต่การแทรกซึมของ macrophage และ T-cell เป็นปกติ นอกจากนี้ พบว่าหนูที่มีความบกพร่องของ mast cells ไม่มีผลต่อการสร้างเนื้อเยื่อใหม่ การสังเคราะห์ collagen หรือการสร้างหลอดเลือดใหม่ ซึ่งผลการทดลองนี้สามารถชี้ให้เห็นว่า mast cells มีผลต่อการชักนำ neutrophils ไปยังบริเวณแผลลดลง จากการศึกษาของ Tellechea และคณะ (2016) ได้ศึกษาผล

ต่อการหายของแผลในหนูเบาหวานและหนูที่ไม่เป็นเบาหวานที่มีความบกพร่องของ MC (MC-deficient WBB6F1/J-KitW/KitW-v mice) เปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุม (wild type; WT) พบว่าทั้งหนูที่เป็นและไม่เป็นโรคเบาหวานซึ่งมีความบกพร่องของ MC มีการหายของแผลช้ากว่าหนูกลุ่ม WT อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ได้ตรวจหาการแสดงออกของ VEGF mRNA และ MMP-9 mRNA จากเนื้อเยื่อแผลในวันที่ 10 หลังการเกิดแผล พบว่า หนูในกลุ่ม KitW/KitW-v mice มีการแสดงออก VEGF mRNA ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุม แต่มีการแสดงออกของ MMP-9 mRNA เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ mast cells ยังมีผลกระตุ้นการสร้าง selectins ซึ่งเป็น adhesion molecule ของ endothelial cell อีกด้วย(Eming *et al*., 2007) เมื่อหลอดเลือดขยายตัว และมีการสร้าง selectins บริเวณ endothelial cell จะเกิดการจับกันระหว่าง selectins ligand และ chemokines receptor บนผนังเซลล์ของ neutrophil ซึ่งเป็นเม็ดเลือดขาวชนิดแรกที่เข้าสู่บริเวณแผล หลังเกิดการบาดเจ็บในช่วง 6-24 ชม. แรก กับ selectins และ chemokines บริเวณ endothelial cell ทำให้เกิดการหมุน (rolling) เคลื่อนตัวไปช้าๆ บนผนังหลอดเลือด จากนั้น neutrophil จะยึดเกาะ (adhesion) กับ endothelial cell และเกิดการคืบคลาน เคลื่อนตัวผ่านผนังหลอดเลือด โดยอาศัย integrins ซึ่งได้แก่ CD11a/CD18 (LFA-1), CD11b/CD18 (MAC-1), CD11c/CD18 (gp150, 95) และ CD11d/CD18 (Tan *et al*., 2000; Sumagin *et al*., 2010) ที่อยู่บนผนังเซลล์ของ neutrophil จับกับ integrins ligand บน endothelial cell ทำให้ neutrophil แทรกซึมออกนอกหลอดเลือด และเคลื่อนที่ไปยังบริเวณแผล เพื่อจับกินสิ่งแปลกปลอมต่างๆ (Soehnlein *et al*., 2017) โดยวิธีการ phagocytosis ซึ่งอาศัยการสร้าง reactive oxygen species (ROS) และการหลั่ง enzymes จาก granule เพื่อกำจัดและย่อยสลายเซลล์แบคทีเรีย ซึ่ง granule protein ที่ neutrophil หลังออกมา จะมีผลต่อการชักนำให้เซลล์ monocyte เคลื่อนที่มายังบริเวณแผล โดย granule protein จะสะสมอยู่บริเวณ endothelial glycocalyx และกระตุ้นให้เกิดการแสดงออกของ cell adhesion molecules หรือ CAMs (vascular cell adhesion molecule 1; VCAM-1 กับ intercellular adhesion molecule 1; ICAM-1) ทำให้เกิดการจับกันกับ beta2-integrin ที่อยู่บนผิวของ monocyte และเกิดการยึดเกาะบน endothelial cell จากนั้นจะถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการเคลื่อนที่ออกนอกหลอดเลือดโดย azurocidin ที่สร้างมาจากจาก primary granules ของ neutrophil และLL-37 ซึ่งเป็น antimicrobial peptide ที่สร้างจาก secondary granules ของ neutrophil (Soehnlein and Lindbom, 2010) ซึ่ง monocyte จะเคลื่อนที่ออกนอกหลอดเลือดเข้าสู่บริเวณแผลหลังจากเวลาผ่านไป 24 ชม. และเกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ macrophage ทำหน้าที่ในการจับกินเชื้อโรคต่างๆ เนื่องจาก neutrophil มีอายุสั้น และจะเกิดการ apoptosisซึ่งเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่สามารถชักนำให้เซลล์ monocyte เคลื่อนที่เข้าสู่แผลมากขึ้น เซลล์ macrophage มีส่วนในการควบคุมปริมาณของ neutrophil บริเวณแผล โดยมีผลยับยั้งการแทรกซึมของ neutrophil จากหลอดเลือด และหลั่ง cytokine เพื่อกระตุ้นให้ neutrophil เกิดการ apoptosisในระยะสุดท้ายเซลล์ macrophage จะกำจัดเศษซากของ neutrophil ที่เกิดจากการ apoptosisซึ่งบริเวณผิวเซลล์ของ macrophageมี receptor หลายชนิด ที่สามารถรับรู้และตอบสนองต่อสภาพแวดล้อมจุลภาคที่เซลล์อาศัยอยู่ เช่น Toll-like receptors (TLRs) และ complement receptors (Eming *et al*., 2007) โดย TLRs เป็นโปรตีนตัวรับจดจำรูปแบบ (pattern recognition receptors; PRRs) ที่สำคัญของระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิด (innate immune system) ซึ่งจากการศึกษาพบว่าในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมมี TLRs 13 ชนิด (TLR1-13) ในคนมี TLRs 10 ชนิด และในหนูมี TLRs 12 ชนิด

(Spirig *et al*., 2012) โดยในหนูไม่พบการแสดงออกของ TLR10 ในคนจะพบ TLRs บริเวณผิวของเซลล์ได้แก่ TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 และ TLR11 และพบ TLRs บริเวณภายในเซลล์ ได้แก่ TLR3, TLR7, TLR8 และ TLR9 (Spirig *et al*., 2012; Portou *et al*., 2015) ในกระบวนการอักเสบ TLRs ที่สำคัญของเซลล์ macrophages คือ TLR2 และ TLR4 (Huang *et al*., 2007) ซึ่งมีบทบาทสำคัญต่อการป้องกันการติดเชื้อ โดย TLR2 จะจดจำรูปแบบของ peptidoglycan และ lipopeptide บนผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวก ส่วน TLR4 จะจดจำรูปแบบของ lipopolysaccharide ซึ่งเป็นส่วนประกอบของ outer membranes ในแบคทีเรียแกรมลบ (Suga *et al*., 2014) มีรายงานการศึกษาความสัมพันธ์ของ TLRs กับการอักเสบทั้งในกระบวนการหายของแผลปกติและแผลเบาหวาน ได้แก่Dasu และ Jialal (2013) ศึกษาผลต่อการหายของแผลในหนูปกติเปรียบเทียบกับหนูเบาหวาน โดยการตรวจหาการแสดงออกของ mRNA และ protein ของ TLR4 โดยใช้วิธี real-time PCR และ Western blotting techniqueจากเนื้อเยื่อของแผลในวันที่ 10 พบว่าหนูเบาหวาน มีการแสดงออกของTLR4mRNA และ TLR4protein เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับหนูปกติ และได้ศึกษาผลต่อการหายของแผลใน TLR4 knockout (KO) mice ($TLR4^{-/-}$) ร่วมกับการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคเบาหวาน เปรียบเทียบกับหนูเบาหวานปกติ พบว่าหนูเบาหวานในกลุ่ม $TLR4^{-/-}$มีการหายของแผลดีกว่าอย่างมีนัยสำคัญสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับหนูเบาหวานในกลุ่ม WT และพบว่าหนูที่ไม่เป็นโรคเบาหวานการหายของแผลไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับหนูเบาหวานในกลุ่ม $TLR4^{-/-}$นอกจากนี้ได้ตรวจหาปริมาณของ interleukin-6 (IL-6) และ TNF-alpha ซึ่งถือว่าเป็น biomediators ของ TLR4 signaling โดยใช้วิธี ELISA พบว่าในวันที่ 10 หลังการเกิดแผลหนูเบาหวานในกลุ่ม $TLR4^{-/-}$มีความเข้มข้นของ IL-6 และ TNF-alpha ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับหนูเบาหวานกลุ่ม WT นอกจากเซลล์ macrophageมีบทบาทต่อระบบภูมิคุ้มกัน และกำจัดสิ่งแปลกปลอมระหว่างกระบวนการหายของแผลแล้ว macrophageยังมีบทบาทสำคัญต่อการสร้าง growth factorเช่น TGF-beta, TGF-alpha, FGF, PDGF และ VEGF ซึ่งมีส่วนในการส่งเสริมให้เกิดการแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนและการสังเคราะห์สารที่เป็นองค์ประกอบของ extracellular matrix (ECM)ในเซลล์ผิวหนัง (Eming *et al*., 2007) โดยกระบวนการอักเสบจะหยุดลง ก็ต่อเมื่อบริเวณแผลปราศจากสิ่งแปลกปลอมใดๆ ซึ่งการหลั่ง growth factor หรือ cytokine จะทำหน้าที่เป็น anti-inflammation เพื่อหยุดกระบวนการอักเสบ และมีผลกระตุ้นกระบวนการซ่อมแซมเนื้อเยื่อต่อไป (Soehnlein *et al*., 2014)

บทบาทของกระบวนการอักเสบที่เกี่ยวข้องกับการหายของแผล

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

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

- ระยะที่ 2 คือ ระยะการอักเสบ ซึ่งได้กล่าวถึงกลไกไว้ข้างต้นนั้น โดยมีการแทรกซึมของ neutrophil ซึ่งเป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดแรกที่แทรกซึมเข้าสู่บริเวณแผล ทำหน้าที่จับกินเชื้อโรคต่างๆ จากนั้นจะเกิด apoptosisส่งผลต่อการชักนำ

ให้เซลล์ monocyte เข้าสู่บริเวณแผลเป็นลำดับถัดไป นอกจากนี้ neutrophil ยังสามารถสร้างและหลั่ง pro-inflammatory cytokines ที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ monocyte ไปเป็นเซลล์ macrophage ในระยะ M1 ซึ่งได้แก่ interleukin-1alpha (IL-1 alpha), IL-1beta, IL-6 และ tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) ซึ่ง monocyte เมื่อออกนอกหลอดเลือดเข้าสู่เนื้อเยื่อบริเวณแผลและเปลี่ยนเป็นเซลล์ macrophage ในระยะ M1 แล้วจะทำหน้าที่จับกินเชื้อโรค หรือเนื้อตายต่างๆ บริเวณแผล รวมทั้งจับกินเซลล์ neutrophil ที่เกิดการ apoptosis (Sindrilaru and Scharffetter-Kochanek, 2013) เมื่อบริเวณแผล ปราศจากสิ่งแปลกปลอม เซลล์ macrophage จะเปลี่ยนไปเป็นระยะ M2 โดยจะมีการหลั่ง TGF-beta และ IL-10 ซึ่งทำหน้าที่เป็น anti-inflammatory เพื่อหยุดกระบวนการอักเสบ การเปลี่ยนแปลงของ macrophage จากระยะ M1 ไปเป็นระยะ M2 เป็นตัวบ่งชี้ที่สำคัญของการสิ้นสุดระยะการอักเสบโดย macrophage เป็นเซลล์เริ่มต้นที่มีความสำคัญต่อกระบวนการการหายของแผล ซึ่งจะแบ่งตามการทำหน้าที่ออกเป็น 2 แบบ คือ classically activated (M1) และ alternatively activated (M2) (Novak and Koh, 2013) classically activated หรือ M1จะถูกกระตุ้นให้เกิดการแสดงออกโดย interferon-gamma (IFN-gamma) ซึ่งสร้างมาจาก Helper T-cell1 (Th1), lipopolysaccharide (LPS) จากเซลล์แบคทีเรียและ TNF-alpha หน้าที่ของ macrophage M1คือ สร้าง pro-inflammatory cytokines, ROSและ growth factor เช่น VEGF และ fibroblast growth factor 2 (FGF-2) (Ogle *et al*., 2016) alternatively activated หรือ M2 จะทำหน้าที่ตรงกันข้ามกับ M1 โดยการหลั่ง anti-inflammatory cytokines ได้แก่ IL-1 receptor antagonist, decoy IL-1 receptor type II หรือ IL-10 และหลั่ง growth factorได้แก่ TGF-beta, VEGF และ Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) (Koh and DiPietro, 2011) ซึ่งปัจจัยที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงจากเซลล์ macrophage M1 ไปเป็นเซลล์ macrophage M2 ได้แก่ การกระตุ้นของ IL-4 และ IL-13 ที่หลั่งมาจาก Helper T-cell2 (Th2) และการเกิด apoptosisของ neutrophil (Hesketh *et al*., 2017) นอกจากนี้พบว่าในสภาวะที่มีน้ำตาลในเลือดสูง (hyperglycemia) จะมีผลต่อการทำงานของเซลล์ macrophage กล่าวคือ ทำให้คุณสมบัติของ macrophage ในการกำจัดเซลล์ neutrophil ที่เกิดการ apoptotic ลดลง (Hesketh *et al*., 2017) ซึ่งภาวะแผลเรื้อรังเนื่องจากโรคเบาหวานจะเกี่ยวข้องกับระยะการอักเสบที่ใช้เวลานาน ซึ่งขาดความสมดุลระหว่าง pro- และ anti-inflammatory cytokines โดย macrophage ในแผลเบาหวาน จะมีการสร้าง pro-inflammatory cytokines สูงกว่าเมื่อเทียบกับแผลปกติ (Weisberg *et al*., 2003; Goren *et al*., 2007) Khanna และคณะ (2010) ได้ศึกษาการทำงานของเซลล์ macrophage ในระยะการอักเสบของหนูเบาหวานที่เกิดแผล พบว่าแผลในหนูเบาหวานมีเซลล์ neutrophil ที่เกิดการ apoptoticเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับแผลในหนูปกติ และพบว่ามีระดับของ pro-inflammatory cytokines ได้แก่ TNF-alpha และ IL-6 เพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในวันที่ 1 และ 3 หลังการเกิดแผลเมื่อเปรียบเทียบกับหนูปกติ แต่ IL-10 ซึ่งเป็น anti-inflammatory cytokines ลดลงอย่างมีนัยสำคัญในวันที่ 7 หลังการเกิดแผลเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มหนูปกติ การตอบสนองต่อการอักเสบ ถือได้ว่าเป็นกระบวนการแรกที่เกี่ยวข้องกับการหายของแผล โดยการแทรกซึมของเซลล์เม็ดเลือดขาวเข้าสู่บริเวณที่ได้รับบาดเจ็บหรือเกิดบาดแผลเป็นตัวบ่งชี้ที่สำคัญของเซลล์ต่อการตอบสนองของการอักเสบเพื่อให้เกิดการซ่อมแซมเนื้อเยื่อบริเวณผิวหนังต่อไป โดยเซลล์เม็ดเลือดขาวไม่เพียงแต่ทำหน้าที่ในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อโรคต่างๆ บริเวณแผล แต่ยังมีผลต่อการสร้างและการสลายเนื้อเยื่ออีกด้วย (Patel *et al*., 2016) ซึ่งการเพิ่มหรือลดการแทรกซึมของเซลล์เม็ดเลือดขาวไปยังบริเวณที่เนื้อเยื่อเกิดความเสียหายนั้น จะมี

ผลต่อการ migration, proliferation และ differentiation ของเซลล์ที่เกี่ยวข้องทำให้กระบวนการหายของแผลเกิดช้าลง จากการศึกษาของ Mori และคณะ (2004) ได้ศึกษาเปรียบเทียบระหว่างหนู mice ที่มีความบกพร่องของ beta-1,4-galactosyltransferase-I (beta4GalT-I) กับหนู mice สายพันธุ์ปกติต่อการหายของแผล พบว่า หนูที่มีความบกพร่องของ beta4GalT-I มีการหายของแผลช้าลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับหนูปกติ โดยมีผลต่อการลดลงของการสร้างเนื้อเยื่อใหม่ การสังเคราะห์ collagen และลดการสร้างหลอดเลือดใหม่อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับหนูปกติ นอกจากนี้ยังพบว่า มีการแทรกซึมของเซลล์เม็ดเลือดขาวไปยังบริเวณแผลลดลง ส่งผลต่อการยับยั้งระดับของ macrophage-derived chemokines, TGF-beta1 และ VEGF จากรายงานจะเห็นได้ว่า หากมีการแทรกซึมของเซลล์เม็ดเลือดขาวไปยังบริเวณบาดแผลลดลง จะมีผลต่อการสร้างเนื้อเยื่อและหลอดเลือดใหม่ลดลง ทำให้แผลหายช้ากว่าปกติ และจากการศึกษาของ Kitano และคณะ (2017) ได้ศึกษาเปรียบเทียบระหว่างหนูที่มีความบกพร่อง inducible nitric oxide synthase (iNOS) กับหนูสายพันธุ์ปกติต่อการหายของแผล พบว่าหนูที่มีความบกพร่องของ iNOS มีผลทำให้เกิดการแบ่งเซลล์และการสร้างเนื้อเยื่อใหม่ช้าลงใน excision wound model และพบว่ามีการยับยั้งการแทรกซึมของเซลล์ macrophage และลดการแสดงออกของTGF-beta1 mRNAซึ่งจากการศึกษาแสดงให้เห็นว่าหากมีการยับยั้งการแทรกซึมของเซลล์ macrophage จะมีผลทำให้การแบ่งเซลล์และการสร้างเนื้อเยื่อใหม่ที่ช้าลงเมื่อกระบวนการอักเสบสิ้นสุดลง จะเข้าสู่ระยะที่ 3

- ระยะที่ 3 คือระยะการแบ่งเซลล์ หรือ proliferation phase โดย TGF-beta ที่หลั่งออกมาจาก macrophage M2ในช่วงหลังของระยะการอักเสบนั้น มีความสำคัญเป็นอย่างมากในกระบวนการหายของแผล โดยมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ fibroblast ไปเป็น myofibroblast ซึ่งกระตุ้นการสร้าง collagen ทำให้เกิดการหดตัวของแผล (Bielefeld *et al*., 2013) กระตุ้นการแบ่งเซลล์และการเคลื่อนที่ของเซลล์ keratinocytes จากขอบแผลเข้าสู่ตรงกลางแผล นอกจากนี้ยังส่งเสริมการสังเคราะห์หลอดเลือดใหม่อีกด้วย (Sinno and Prakash, 2013) เมื่อการเคลื่อนที่เข้าหากันของเซลล์ keratinocytes จากขอบแผลบรรจบกัน ก็จะหยุดกระบวนการแบ่งเซลล์ และเข้าสู่ระยะที่ 4

- ระยะที่ 4 คือ ระยะการปรับรูปร่าง หรือ remodelling phase ซึ่งในระยะนี้เป็นระยะสุดท้ายของกระบวนการหายของแผล โดยใช้เวลานานที่สุด อาจจะเป็นสัปดาห์หรือเป็นเดือน ขึ้นอยู่กับขนาดของแผล ในระยะนี้จะต้องมีความสมดุลของการสร้างและสลาย ECMบริเวณแผล โดยอาศัยการทำงานของ T-cell ซึ่งจะถูกชักนำให้ออกจากหลอดเลือดเข้าสู่เนื้อเยื่อแผลโดย cytokineที่สร้างจาก macrophage ซึ่งจะเข้ามาในช่วงท้ายของระยะการอักเสบ และมามีผลต่อระยะ remodelling phase โดย T-cell ที่เข้าสู่บริเวณแผลจะเป็นชนิด Helper T-cell1 และ 2 (Th1 และ Th2) โดยผ่านการเหนี่ยวนำจากเซลล์ macrophage M2 และ M1 ตามลำดับ สารต่างๆ ที่หลั่งออกมาจาก macrophage M1 และ M2 นั้นมีความสำคัญต่อการควบคุมสมดุลของ ECM (Tredget *et al*., 2006) โดย M1 จะหลั่ง metalloprotienases หรือ MMPs ทำหน้าที่ในการสลาย matrix protein ส่วน M2 ทำหน้าที่ในการสร้าง matrix protein และเพื่อการควบคุมไม่ให้เกิดการสลาย matrix protein มากเกินไป mesenchymal cell จะสร้าง tissue inhibitors of metalloprotienase หรือ TIMPs มายับยั้งการทำงานของ

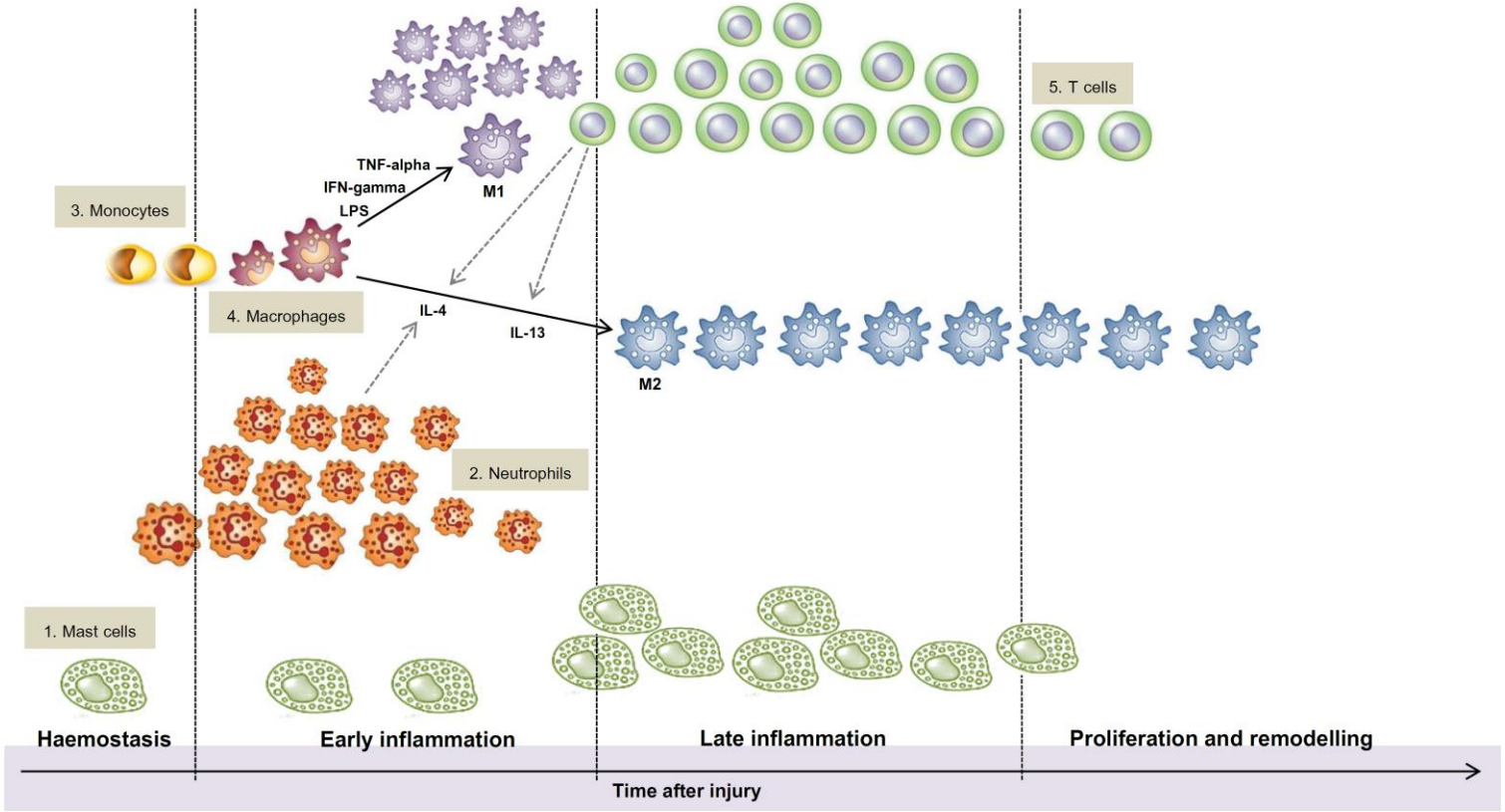
MMPs และในระยะหลังของ remodelling phase จะพบว่ามีจำนวนของเซลล์ macrophage ลดลง ส่งผลให้การสร้าง ECM ลดลง ซึ่งการเปลี่ยนแปลงเหล่านี้ เป็นตัวบ่งชี้ถึงการลดขนาดแผล และการหายของแผลที่สมบูรณ์ (Delavary *et al*., 2011)

เซลล์อักเสบชนิดต่างๆ ที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับกระบวนการหายของแผล แสดงดัง**ตารางที่ 3.2** โดยมีลำดับการเคลื่อนที่เข้าสู่บริเวณแผลดัง**รูปที่ 3.1**ซึ่งเซลล์ที่มีบทบาทสำคัญมากที่สุด คือ macrophage โดยจะเริ่มเข้ามามีบทบาทตั้งแต่ระยะการอักเสบ การดำเนินไปของกระบวนการอักเสบตามปกติ macrophage สามารถจับกินสิ่งแปลกปลอมบริเวณแผลได้หมด จะส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ macrophage จาก M1 เป็น M2 ซึ่งส่งผ่าน growth factor ได้แก่ TGF-beta ที่มีความสำคัญต่อระยะ proliferation กระบวนการหายของแผลจะเกิดขึ้นต่อเนื่องไปจนถึงระยะ remodeling จนกระทั่งแผลหายอย่างสมบูรณ์ แต่หากเกิดความผิดปกติในระยะการอักเสบ neutrophil และ macrophage หลั่ง cytokineมากขึ้นและmacrophageไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็น M2 จะส่งผลให้เกิดความบกพร่องในการสร้าง ECM และมีการสลาย ECM มากขึ้นจากการทำงานของเอนไซม์ MMPs จำนวนมาก ซึ่งหลั่งจาก M1 ลดการแบ่งเซลล์และการเคลื่อนที่ของ fibroblast และ keratinocyte กระบวนการหายของแผลไม่สามารถดำเนินการต่อเนื่องไปถึงระยะ proliferation และ remodeling ได้ จึงเกิดเป็นแผลเรื้อรัง

ตารางที่ 3.2 ชนิดของเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับอักเสบ หน้าที่ และสารสื่อกลางที่หลั่งออกมาในกระบวนการหายของแผล(Koh and DiPietro, 2013)

Cell type	Mediators	Functions
Mast cell	Histamine, Chymase, tryptase	- Control vascular permeability
		- Control influx of PMN
		- Regulate tissue remodeling
PMN	ROS, cationic peptides, eicosanoids, proteases	- Phagocytosis of infectious agents
		- Macrophages activation through phagocytosis
	TNF-alpha, IL-1b, IL-6	- Amplify inflammatory response
	VEGF, IL-8	- Stimulate repair response
Macrophages	TNF-alpha, IL-1b, and IL-6	- Phagocytosis of PMN and fragments of tissuedegradation
	IL-10, TGF-beta1	- Amplify inflammatory response
	PDGF, VEGF, bFGF, TGF-alpha, and TGF-beta	- Anti-inflammatory function
		- Stimulate repair response: angiogenesis
T cell;	CD40 ligand; IL-2, TNF-alpha/ IL-4, -5,-10	- Regulate tissue remodeling
	Th1/Th2	

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



รูปที่ 3.1ลำดับการเคลื่อนที่ของเซลล์เม็ดเลือดขาวเข้าสู่บริเวณแผล (Koh and DiPietro, 2011)

3.3 กลไกที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการหายของแผลบทบาทของยีนและสารชีวโมเลกุลแต่ละชนิดที่เกี่ยวข้องกับการหายของแผล

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

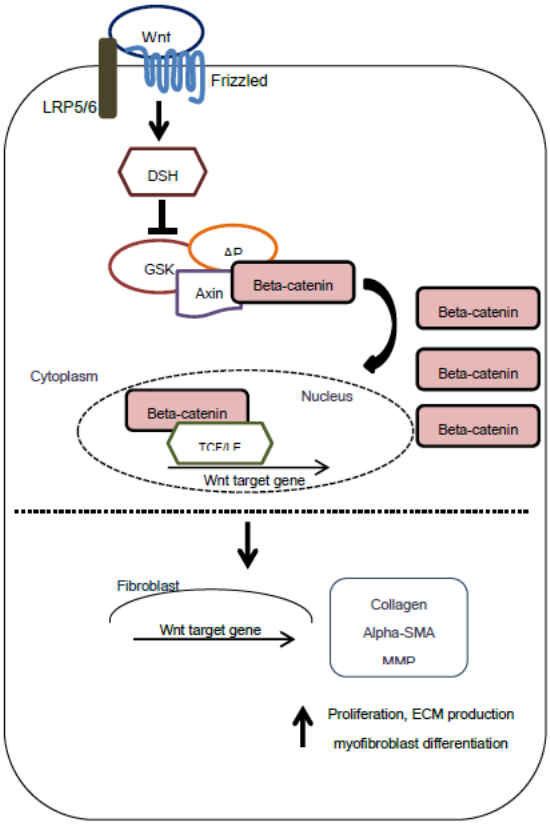
Wnt signaling pathway

Wnt คือ glycoproteins ที่มีความสำคัญต่อกระบวนการพื้นฐานของเซลล์ในระหว่างการพัฒนาและการรักษาสภาวะความสมดุลของเซลล์ให้คงที่ โดยเฉพาะเซลล์ผิวหนังซึ่งมีส่วนช่วยในการสร้างผิวหนังชั้นหนังแท้ (dermis) และการสร้างของเส้นขนต่างๆ Wnt signaling pathway แบ่งออกเป็น 3 แบบ คือ

1. beta-catenin pathway (canonical Wnt pathway) ซึ่งทำหน้าที่กระตุ้นยีนเป้าหมายภายในนิวเคลียส
2. Planar cell polarity (PCP) pathway เกี่ยวข้องกับการจัดเรียงโครงสร้างใหม่ของเซลล์
3. Wnt/calcium (Ca2+) pathway ซึ่งมีบทบาทสำคัญต่อการสร้างตัวอ่อน (embryogenesis) และการเกิดเนื้อเยื่อต่างๆ (De, 2011)

จากการศึกษาพบว่าในร่างกายมนุษย์มี Wnt protein ที่แตกต่างกัน 19 ชนิด และมีตัวรับ Frizzled (Fz) receptor 10 ชนิด โดย pathway ที่มีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการซ่อมแซมเนื้อเยื่อของผิวหนังคือ Wnt/beta-catenin signaling pathway (Archbold *et al*., 2012; Houschyar *et al*., 2015) beta-catenin คือ transcriptional co-activator ที่เกี่ยวข้องกับ transcription cofactors อื่นๆ เช่น T cell factors/lymphoid enhancer factors (TCF/LEF) ซึ่งทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของยีนในเซลล์แต่ละชนิด ในกรณีที่ไม่มี Wnt signaling beta-catenin จะถูกทำลายโดย Axin, adenomatosis polyposis coli (APC), glycogen synthase kinase 3 (GSK3), protein phosphatase 2A (PP2A) และ casein kinase 1alpha (CK1 alpha) ซึ่งไม่ก่อให้เกิดการถอดรหัสทางพันธุกรรมในนิวเคลียส ในทางตรงกันข้ามหากมี Wnt signaling จะเข้าจับกับ Fz receptor และ low-density lipoprotein receptor protein 5/6 (LRP 5/6) ส่งผลให้เกิดการกระตุ้น Dishevelled (DSH) ซึ่งเป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ GSK3 ไม่ก่อให้เกิด APC/Axin/GSK3 complex ป้องกันไม่ให้ beta-catenin ถูกทำลาย ทำให้ beta-catenin มีความเสถียรภาพและเกิดการสะสม ใน cytoplasm มากขึ้น หลังจากนั้น beta-catenin จะเคลื่อนที่เข้าไปในนิวเคลียส และมีผลต่อการถอดรหัสของยีน โดยการเข้าจับกับ TCF/LEF ซึ่งเป็น transcriptional co-activator กระตุ้นการแสดงออกของยีนเป้าหมายต่างๆ ได้แก่ Cyclin D1, MT1-MMP (membrane-type 1-matrix metalloproteinase), MMP-7 และ Dkk-1 (Dickkopf) (**รูปที่ 3.2**) (Houschyar *et al*., 2015) ซึ่งใน

กระบวนการหายของแผลจะมีเอนไซม์ที่สำคัญในกลุ่ม matrix metalloproteinase (MMPs) ซึ่งสร้างและหลั่งมาจากเซลล์ macrophage และfibroblast โดยมีบทบาทสำคัญในการสังเคราะห์หลอดเลือดใหม่และในกระบวนการสลาย extracellar matrix protein beta-catenin จะมีปริมาณเพิ่มขึ้นใน mesenchymal cells ในระยะ proliferative phase ของกระบวนการหายของแผลซึ่งมีส่วนเกี่ยวข้องในการสร้างโครงสร้างของเยื่อบุผิวและการซ่อมแซมผิวหนังที่เกิดความเสียหาย (Bielefeld *et al*., 2013) โดยมีบทบาทสำคัญต่อการควบคุมอัตราการแบ่งเซลล์ เพิ่มจำนวน การเคลื่อนที่ และการแพร่กระจายของเซลล์ fibroblast (Zhang *et al*., 2009) นอกจากนั้นแล้วยังพบการทำงานของ Wnt/beta-catenin signaling pathway ในระยะอื่นๆ ของกระบวนการหายของแผลได้แก่ ระยะการห้ามเลือดและระยะการอักเสบ โดย Wnt signaling เป็นปัจจัยสำคัญต่อการพัฒนาของ megakaryocytes และกระตุ้นการทำหน้าที่ของ proplatelet (Macaulay *et al*., 2013) นอกจากนั้นพบว่า canonical Wnt ยังทำหน้าที่ในการยับยั้งการเกาะกลุ่มกันของเกล็ดเลือดอีกด้วย (Steele *et al*., 2009) หลังจากผ่านระยะการห้ามเลือด เข้าสู่ระยะการอักเสบ ซึ่งจะพบอาการ ปวด บวม แดง และร้อน มีการขยายตัวและเพิ่มการซึมผ่านของหลอดเลือด และเกิดการชักนำเซลล์เม็ดเลือดขาว (neutrophilและ macrophage) เข้าสู่บริเวณที่ได้รับบาดเจ็บ ทำหน้าที่ในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมหรือเนื้อตายต่างๆ บริเวณแผล Wnt signaling จะเกี่ยวข้องกับการควบคุมกระบวนการอักเสบ โดยมี Wnt5a เป็นตัวเหนี่ยวนำเซลล์ macrophageในการตอบสนองต่อเชื้อแบคทีเรีย และ Fz receptor มีผลต่อการควบคุม pro-inflammatory cytokines จะทำให้เกิดการตอบสนองต่อการอักเสบที่เพิ่มขึ้น (Staal *et al*., 2008) หลังจากกระบวนการอักเสบ จะเข้าสู่ระยะ proliferation phase ในระยะนี้ fibroblasts, smooth muscle cells และ endothelial cells จะแทรกซึมเข้าสู่บริเวณแผล ซึ่งbeta-catenin มีความสำคัญต่อการควบคุมการทำงานของเซลล์ fibroblasts โดยระดับของ beta-catenin protein และการถอดรหัสของยีนจะเพิ่มสูงขึ้นในช่วงของระยะ proliferation phase และจะกลับเข้าสู่ระดับปกติในระยะ remodeling phase ของกระบวนการหายของแผล จากการศึกษาพบว่าแผลในคนจะพบการแสดงออกของ beta-catenin เพิ่มขึ้นและพบว่ามีการแสดงออกของ fibronectin และ MMP-7 ซึ่งเป็นยีนเป้าหมายของ beta-catenin เพิ่มขึ้นในระยะ proliferation phase (Cheon *et al*., 2005) โดยการเพิ่มขึ้นของ beta-catenin จะบ่งชี้ถึงกระบวนการหายของแผลที่ดี แต่หากมีการเพิ่มขึ้นในปริมาณที่มากหรือนานเกินไปจะก่อให้เกิด fibrosis และเกิดแผลเป็นที่มากเกินไปได้ จากการศึกษาพบว่า รอยแผลเป็น (hypertrophic scars) ในคนจะพบระดับของ beta-catenin สูง (Carothers *et al*., 2012) นอกจากนี้ยังพบว่า beta-catenin ยังสามารถกระตุ้นการหลั่ง TGF-beta1ในระยะเริ่มต้นของกระบวนการหายของแผลได้อีกด้วย สุดท้ายในระยะ remodeling phase หน้าที่ของ Wnt จะเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ fibroblasts ไปเป็น myofibroblasts ซึ่งมีความสำคัญต่อการหดตัวของแผล และการลดลงของการเกิดแผลเป็น (Sarrazy *et al*., 2011) นอกจากนี้พบว่า Wnt มีความสำคัญในกระบวนการสร้างหลอดเลือดใหม่ และสามารถรักษาความบกพร่องของหลอดเลือดได้ (Birdsey *et al*., 2015)

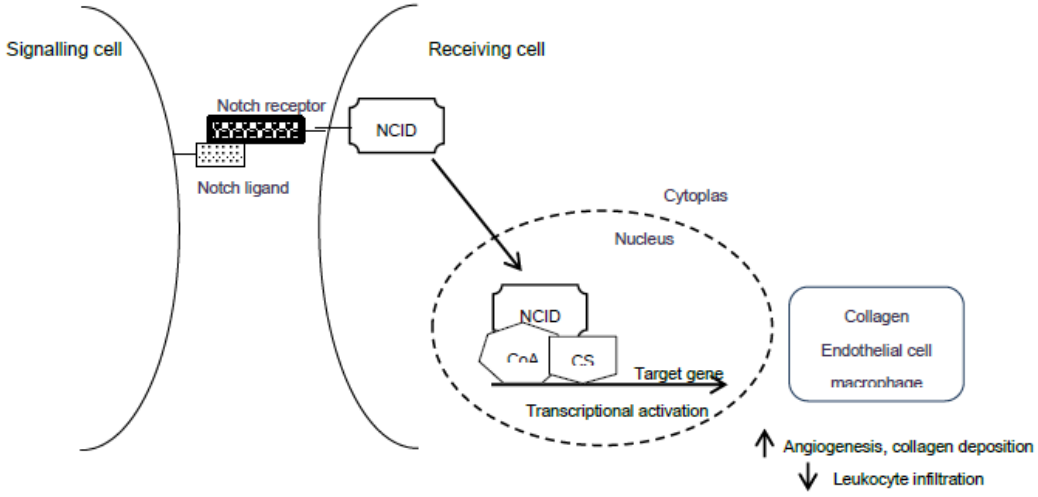


รูปที่ 3.2 บทบาทของ Wnt/beta catenin signaling pathwayในกระบวนการหายของแผล(APC, adenomatous polyposis coli; DSH, dishevelled; GSK3, glycogen synthase kinase 3; LRP5/6, low-density lipoprotein receptorrelated protein 5/6; Tcf/Lef, Tcell-specific transcription factor/lymphoid enhancer-binding factor) (Arwert *et al*., 2012)

Notch signaling pathway

Notch signaling pathway คือ ระบบการรับส่งสัญญาณที่ควบคุมการการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ผิวหนัง (epidermal differentiation) ทำหน้าที่ในการคงสภาพ รักษาความสมดุลของผิวหนัง (Okuyama *et al*., 2008; Watt *et al*., 2008) รวมทั้งมีผลควบคุมการสร้างหลอดเลือดใหม่และการรักษาสภาพของหลอดเลือด (Gridley, 2010) การทำงาน ของ Notch signaling จะเกิดปฏิกิริยากันระหว่าง transmembrane ligand และ transmembrane Notch receptor บนเซลล์ข้างเคียงซึ่งทำหน้าที่เป็นเซลล์ส่งสัญญาณและเซลล์รับสัญญาณ ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมจะประกอบด้วย Notch proteins 4 ชนิด (Notch1-4) และ Notch ligand5 ชนิด คือ Delta-like 1, 3 และ 4 และ Jagged1-2เมื่อเกิดการกระตุ้น Notch ligand จะเข้าจับกับ Notch receptor บริเวณผนังเซลล์มีผลทำให้เกิดปฏิกิริยา proteolytic กับ Notch receptor ซึ่งทำให้แยกออกจากผนังเซลล์ และมีผลทำให้ cell membrane หลั่ง Notch intracellular domain (NCID) จากนั้น NCID จะเคลื่อนที่เข้าสู่นิวเคลียส และรวมตัวกับ CSL และ co-activators เพื่อกระตุ้นการถอดรหัสทางพันธุกรรมและควบคุมการแสดงออกของยีนเป้าหมาย (**รูปที่ 3.3**) (Bielefeld *et al*., 2013) มีหลายงานวิจัยได้การศึกษา Notch signaling pathway กับกระบวนการหายของแผล ได้แก่ Thelu และคณะ (2002) ได้ศึกษาการแสดงออกของยีน *Notch 1-3*, *Delta 1*และ *Jagged1*โดยใช้วิธี RT-PCR ในโมเดลการหายของแผลในหนู mice พบว่า การแสดงออกของยีนเหล่านี้เพิ่มขึ้นในหนูกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นให้เกิด cell proliferation เมื่อเปรียบเทียบกับหนูปกติที่ไม่ได้รับการกระตุ้น Chigurupati และคณะ (2007) ได้ศึกษาการหายของแผลใน Notch antisense transgenic mice (Notch protein ลดลง 50% เมื่อเทียบกับหนูปกติ) เปรียบเทียบกับหนูปกติ (nontransgenic control mice; wild-type (WT)) พบว่าหนูในกลุ่มWTมีขนาดของแผลลดลง 50% ในวันที่ 5 และแผลหายเป็นปกติในวันที่ 13 หลังการทำให้เกิดแผล โดยการหายของแผลเร็วกว่าหนูในกลุ่ม Notch antisense transgenic mice ซึ่งมีขนาดของแผลลดลง 15% ในวันที่ 5 และแผลไม่สามารถหายเป็นปกติในวันที่ 13 และได้ศึกษาการหายของแผลในหนูWT ที่ได้รับการรักษาด้วยสารดังนี้ 1. กลุ่มที่ได้รับ g-secretase inhibitor (GSI) ซึ่งเป็นสารที่ยับยั้งการเกิด NCID และยับยั้งการทำงานของ Notch protein2. กลุ่มที่ได้รับ Jagged-1 peptide ซึ่งเป็นสารที่กระตุ้นการทำงานของ Notch protein โดยทั้ง 2 กลุ่มเปรียบเทียบผลการทดลองกับหนูในกลุ่มควบคุม (vehicle-treated control animals) พบว่าหนูในกลุ่มที่ได้รับการรักษาด้วย GSI มีการหายของแผลช้ากว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่หนูกลุ่มที่ได้รับ Jagged-1 peptide มีการหายของแผลเร็วกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ผู้วิจัยได้ตรวจหาระดับของ NCID ใน endothelial cells, keratinocytes และ fibroblasts จากเนื้อเยื่อบริเวณแผล โดยใช้ mouse embryonic stem cells ซึ่งมีระดับการแสดงออกของ Notchactivity สูงเป็นกลุ่ม positive control พบว่าหนูปกติที่ได้รับการรักษาด้วย Jagged-1 peptide มีการเพิ่มขึ้นของระดับ NCID ในเซลล์ทั้ง 3 ชนิด อย่างมีนัยสำคัญ และพบว่า ระดับของ NCID ในกลุ่ม Notch antisense transgenic mice ในวันที่ 13 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มnontransgenic controls และระดับของ NCID ในกลุ่มที่ได้รับการรักษาด้วย GSI ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม vehicle-treated control animals ภายใน 24 ชม. และมีระดับลดลงจนถึงวันที่ 13 จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าระดับของ NCID ใน Notch signaling pathway มีผลโดยตรงต่อกระบวนการหายของแผล Outtz และคณะ (2010) ได้ศึกษาบทบาทที่สำคัญของ Notch signaling pathway ในการควบคุมการตอบสนองของเซลล์ macrophage ต่อการอักเสบใน

กระบวนการหายแผล โดยใช้หนูที่มีความบกพร่องของ Notch1 (*Notch1*$^{+/-}$ mice) เปรียบเทียบกับหนูกลุ่ม WTพบว่าหนูในกลุ่ม *Notch1*$^{+/-}$มีการแทรกซึมของเซลล์ macrophage ไปยังบริเวณแผลลดลง มากกว่า 30% เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม WT เนื่องจากเซลล์ macrophage เป็นแหล่งสำคัญของ TNF-alpha ซึ่งเป็น pro-inflammatory cytokine ในระยะการอักเสบของกระบวนการหายของแผล การศึกษาในครั้งนี้จึงได้ตรวจสอบการแสดงออกของ TNF-alpha ในบริเวณแผลของหนูกลุ่มในกลุ่ม *Notch1*$^{+/-}$ เปรียบเทียบกับกลุ่ม WT พบว่า ในวันที่ 5 หลังการเกิดแผล หนูกลุ่ม*Notch1*$^{+/-}$มีปริมาณของ TNF-alpha ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม WT หลังจากนั้นในวันที่ 7 หลังการเกิดแผล มีการศึกษาการสะสมของ collagen โดยใช้วิธี trichrome staining พบว่าในกลุ่ม *Notch1*$^{+/-}$ มีการสะสมของ collagen หนาแน่นกว่ากลุ่ม WT นอกจากนี้ได้ศึกษาการแสดงออกของ VEGF receptor-1 (VEGFR-1), IL-6 และ IL-12 ที่สร้างจากmacrophage ของหนูกลุ่ม *Notch1*$^{+/-}$ เปรียบเทียบกับกลุ่ม wild-type พบว่า กลุ่ม *Notch1*$^{+/-}$ มี VEGFR-1, IL-6 และ IL-12 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม WT จากผลการทดลองเหล่านี้จะเห็นได้ว่า Notch1 มีผลในการควบคุมการแสดงออกของ VEGFR-1 และcytokines (IL-6, IL-12 และ TNF-alpha) ที่สร้างจากเซลล์ macrophage ซึ่งมีความสำคัญต่อระยะการอักเสบในกระบวนการหายของแผล Caiado และคณะ (2008) ได้ศึกษาความสัมพันธ์ของ Notch signaling pathway กับ Bone marrow derived vascular precursor cells (BM-PC, endothelial progenitors) ซึ่งเป็นเซลล์ต้นกำเนิดของหลอดเลือดในกระบวนการหายของแผล การศึกษาใช้หนูสายพันธุ์ Balb-SCID mice โดยแบ่งเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มแรกได้รับการฉีดด้วย phosphate buffered saline (PBS) ใช้เป็นกลุ่มควบคุม กลุ่มที่สองได้รับการฉีด BM-PC และกลุ่มที่สามได้รับการฉีด BM-PC ร่วมกับ GSI พบว่าในกลุ่มที่ได้รับการฉีด BM-PC มีการหายของแผลเร็วกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ แต่ในกลุ่มที่ได้รับการฉีด BM-PC ร่วมกับ GSI มีการหายของแผลไม่แตกต่างกับกลุ่มควบคุม (PBS) ซึ่งคุณสมบัติของ BM-PC ในการรักษาแผล จะเกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อการสร้างหลอดเลือดใหม่บริเวณแผล ผู้วิจัยได้ตรวจสอบการสร้างหลอดเลือดใหม่บริเวณแผล พบว่าในกลุ่มได้รับการฉีด BM-PC มีความหนาแน่นของหลอดเลือดฝอยในวันที่ 7 และ 14 หลังการเกิดแผล สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม แต่กลุ่มที่ได้รับการฉีด BM-PC ร่วมกับ GSI มีความหนาแน่นของหลอดเลือดไม่แตกต่างกับกลุ่มควบคุม จากผลการศึกษานี้จะเห็นได้ว่า การยับยั้ง Notch signaling pathway ด้วย GSI จะส่งผลต่อความบกพร่องในการทำงานของ BM-PC ที่มีผลในการส่งเสริมกระบวนการหายของแผล และการสร้างหลอดเลือดใหม่ในสัตว์ทดลอง



รูปที่ 3.3 บทบาทของ Notch signaling pathway ในกระบวนการหายของแผลNCID, Notch intracellular domain; CoA, coactivators; CSL (CBF1, Suppressor of Hairless, Lag-1) (Kume, 2009)

Hedgehog signaling pathway

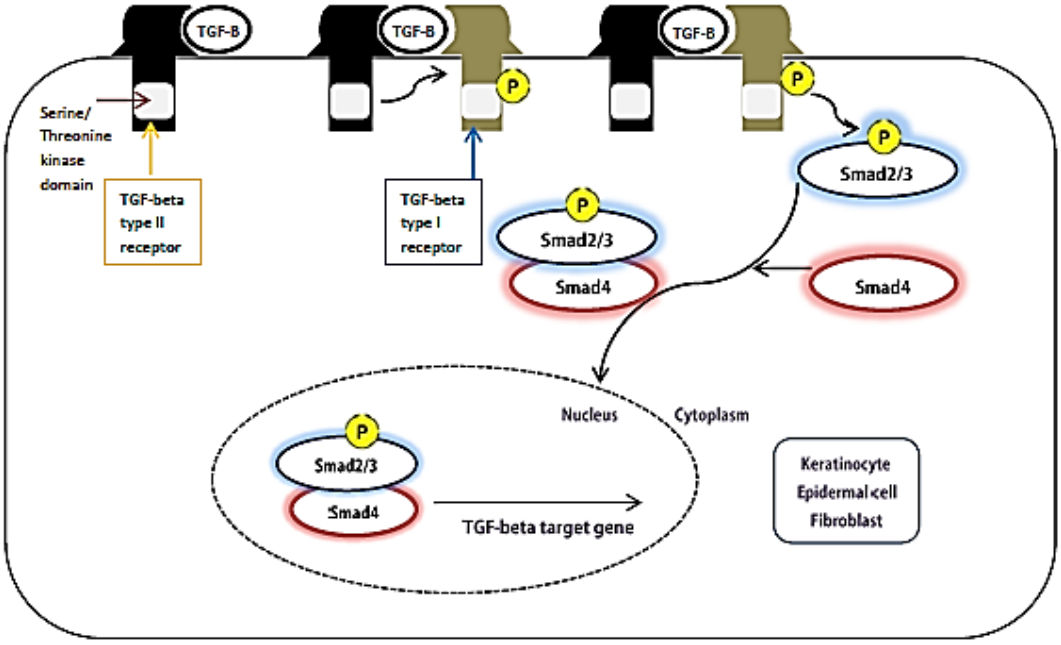
Hedgehog signaling pathway คือ ระบบการรับส่งสัญญาณที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของผิวหนังและการสร้างหลอดเลือดใหม่ (Athar *et al*., 2006)Hedgehogproteins ที่พบในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมมี 3 ชนิดหลักๆ คือ Sonic Hedgehog (Shh), Desert Hedgehog (Dhh) และ Indian Hedgehog (Ihh) แต่ชนิดที่มีความสำคัญต่อกระบวนการหายของแผล คือ Shh โดย Shhsignaling จะเข้าจับกับ Patched (transmembrane protein) และมีผลยับยั้งการทำงานของ Smoothened ส่งผลต่อการกระตุ้น Gli proteinให้เคลื่อนที่เข้าสู่นิวเคลียส ซึ่งทำหน้าที่เป็น transcription และควบคุมการแสดงออกของยีนเป้าหมาย (Le *et al*., 2008; Bielefeld *et al*., 2013) มีรายงานการศึกษาก่อนหน้านี้ได้ศึกษาความสัมพันธ์ของ Shhsignaling ที่มีผลต่อกระบวนการหายของแผล พบว่า Shhsignaling มีส่วนช่วยในการซ่อมแซมบาดแผล และการสร้างหลอดเลือดใหม่บริเวณแผล (Asai *et al*., 2006; Le *et al*., 2008) นอกจากนี้ยังพบว่ามี Shh มีผลต่อการสร้างhair follicle หลังการเกิดกระบวนการหายของแผล (Ito *et al*., 2007)Asai และคณะ (2006) ได้ศึกษา Shhsignaling ต่อการหายของแผลในหนูเบาหวาน (db/db mice) โดยการเปรียบเทียบกันสามกลุ่ม ได้แก่ กลุ่มควบคุมได้รับ LacZ ซึ่งเป็นตัวยับยั้งการทำงานของ Shhsignaling กลุ่มที่ได้รับการรักษาแผลด้วย phShh (human Shh plasmid) และกลุ่มที่ได้รับการรักษาแผลด้วย phShh ร่วมกับการยับยั้งการทำงานของ VEGF พบว่า กลุ่มที่ได้รับ phShh มีการสร้างเนื้อเยื่อใหม่มากกว่าครึ่งหนึ่งของพื้นที่แผล ซึ่งขนาดของแผลในวันที่ 5 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และในวันที่ 14 กลุ่มได้รับ phShh มีเปอร์เซ็นต์การปิดของขอบแผล (65.3±7.6%) สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (25.0±2.0%) ในส่วนของกลุ่มที่ได้รับ phShh ร่วมกับการยับยั้งการทำงานของ VEGF พบว่ามีผลยับยั้งกระบวนการหายของแผล โดยมีเปอร์เซ็นต์การปิดของขอบแผล (43.7±4.1%) ซึ่งต่ำกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ phShh อย่างเดียว (65.3±7.6%) นอกจากนี้ได้ตรวจหาการสร้างหลอดเลือดใหม่บริเวณแผลโดยใช้ fluorescent BS1lectin ในวันที่ 14 หลังการเกิดแผล พบว่ากลุ่มได้รับ phShh มีการสร้างหลอดเลือดใหม่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยพบว่ามีการแตกแขนงของหลอดเลือดไปยังบริเวณกึ่งกลางของแผลมากที่สุด จากนั้นมีการนำเนื้อเยื่อบริเวณแผลในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับ phShh มาวิเคราะห์หา Ptc1 (Patched1), Smoothened (Smo) และ VEGF โดยใช้วิธี Immunofluorescence staining พบว่า กลุ่มที่ได้รับ phShh มีจำนวน Ptc1-positive cells สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกลุ่มควบคุม แต่จำนวนของ Smo-positive cells ไม่แตกต่างกันในทั้งสองกลุ่ม โดยพบว่าทั้ง Ptc1- และ Smo-positive cells มีผลต่อการสร้าง VEGF หลังจากที่ถูกกระตุ้นด้วย Shhsignaling จากรายงานของ Le และคณะ (2008) ได้ศึกษาการหายของแผลในหนูทดลอง โดยการให้สาร cyclopamine (Cy) กับหนูทดลองทุกวันเป็นระยะเวลา 30 วัน หลังการเกิดแผล ซึ่งเป็นสารที่ทำหน้าที่ยับยั้งการทำงานของ Shhsignaling pathway เปรียบเทียบกับหนูในกลุ่มควบคุม พบว่ากลุ่มที่ได้รับ Cy มีระยะเวลาในการปิดของแผลนานกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยพบว่าในวันที่ 11 หลังการเกิดแผล กลุ่มที่ได้รับ Cy มีเปอร์เซ็นต์การหายของแผล 67% ซึ่งต่ำกว่ากลุ่มควบคุม (มากกว่า 95%) โดยมีค่าเฉลี่ยของระยะเวลาต่อการปิดของแผลในกลุ่มที่ได้รับ Cy เท่ากับ 18±0.72 วัน ซึ่งนานกว่ากลุ่มควบคุม (14±0.81 วัน) จากนั้นได้ศึกษาการสร้างเยื่อบุผิวใหม่และการสะสมของเนื้อเยื่อ granulation บริเวณแผล พบว่ากลุ่มที่ได้รับ Cy มีการสร้างเยื่อบุผิวใหม่และการสะสมของเนื้อเยื่อ granulation ช้ากว่ากลุ่มควบคุมในทุกช่วงเวลา และการสร้างหลอดเลือดใหม่

ตรวจสอบโดยใช้วิธี CD31immunohistochemistry พบว่าในกลุ่มที่ได้รับ Cy มีการสร้างหลอดเลือดใหม่น้อยกว่ากลุ่มควบคุมประมาณ 50% รวมทั้งมีการเกิด cell proliferation ลดลงด้วย จากผลการศึกษาดังกล่าวข้างต้น จะเห็นได้ว่า Shhsignaling pathway มีความสำคัญต่อกระบวนการหายของแผล ซึ่งทำให้เพิ่มการสร้างเนื้อเยื่อใหม่ และเพิ่มการสร้างหลอดเลือดใหม่โดยมีผลกระตุ้นการหลั่ง VEGF เพิ่มมากขึ้นและหากมีการยับยั้ง Shhsignaling pathway ก็ส่งผลให้แผลหายช้า รวมทั้งลดการสร้างเนื้อเยื่อใหม่และลดการสร้างหลอดเลือดใหม่อีกด้วย

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

TGF-beta เป็น growth factor ที่มีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการหายของแผล ในการควบคุมการตอบสนองของเซลล์หลายชนิด ทั้งในระยะการอักเสบ ระยะการแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวน และระยะการปรับรูปร่าง โดยในระยะการอักเสบ TGF-beta จะทำหน้าที่เป็น chemoattractant หรือตัวดึงดูดเซลล์เม็ดเลือดขาว เช่น neutrophils หรือ macrophageเข้าสู่บริเวณที่เกิดแผลเพื่อกำจัดเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอมต่างๆ ควบคุมการทำหน้าที่ของเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน และมีผลต่อการรักษาการอักเสบ ในระยะการแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวน TGF-beta ทำหน้าที่ส่งเสริมการสร้างเนื้อเยื่อบุผิว การสร้างหลอดเลือดใหม่ การแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนของ fibroblast มีผลทำให้เซลล์ fibroblast เปลี่ยนแปลงไปเป็น myofibroblasts และการสะสมของ ECM นำไปสู่การสร้าง granulation tissue และเกิดการหดตัวของขอบแผล ในระยะสุดท้ายของกระบวนการหายของแผล ระยะการปรับรูปร่าง TGF-beta มีผลต่อการควบคุมกระบวนการสร้างและสลาย collagen บริเวณแผล (Finnson *et al*., 2013) TGF-beta ที่พบในกระบวนการหายของแผล ประกอบด้วย3 isoforms คือ TGF-beta1, TGF-beta2 และ TGF-beta3 ซึ่งหลังจากผิวหนังเกิดการบาดเจ็บ platelet จะสร้างและหลั่ง TGF-beta1ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวดึงดูดเซลล์เม็ดเลือดขาว เช่น neutrophils และmonocyteเข้าสู่บริเวณที่เกิดแผล หลังจาก TGF-beta1ถูกปล่อยออกมาซึ่งไปมีผลกับเซลล์เป้าหมาย โดยผ่านการจับกับตัวรับที่มีความจำเพาะซึ่งอยู่บนผิวเซลล์ (serine/threonine kinase receptors) โดยแบ่งออกเป็น 3 ประเภท คือ TGF-beta type I receptor (TGF-betaRI) หรือเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า activin-like kinase (ALK), type II receptor (TGF-betaRII) และ type III receptor (TGF-betaRIII) โดยเริ่มต้นเมื่อเกิดการกระตุ้นการส่งสัญญาณของ TGF-beta ligand จะเข้าจับกับ dimer ของ TGF-betaRI และ TGF-betaRIIนำไปสู่การกระตุ้นสารสื่อกลางชนิด cytoplasmic proteins ที่มีชื่อว่า Smads (small mothers against decapentaplegic) (**รูปที่ 3.4**)ซึ่งในสัตว์มีกระดูกสันหลังจะพบ Smads ทั้งหมด 8 ชนิด (Smads1-8) โดยแบ่งออกเป็น 3 ประเภทตามโครงสร้างและหน้าที่ คือ ประเภทที่ 1 เรียกว่า receptor-regulated Smads หรือ R-Smads (Smads 1-3,5,8) มีผลกระตุ้นการทำงานของ TGF-betaRI ซึ่งโดยส่วนใหญ่การกระตุ้นเป็นผลมาจาก Smad2 และ Smad3 ประเภทที่ 2 เรียกว่าcommon Smad หรือ Co-Smad ได้แก่ Smad4 และประเภทที่ 3 เรียกว่า inhibitory Smads หรือ I-Smads ได่แก่ Smad6 และ Smad7 (Singh *et al*., 2011) โดยเมื่อ TGF-beta ligandจะเข้าจับกับ TGF-betaRI และ TGF-betaRII แล้ว จะกระตุ้นให้เกิดSmad2/3 complex โดยมี Smad4 เป็นตัวส่งเสริมการเคลื่อนที่ของ Smad2/3 ไปยังภายในนิวเคลียสซึ่งทำหน้าที่กระตุ้นการถอดรหัสทางพันธุกรรมเพื่อควบคุมการแสดงออกของยีนต่างๆ ส่วน Smad7 จะทำหน้าที่ควบคุมปฏิกิริยาแบบย้อนกลับ โดยยับยั้งการจับกันระหว่าง TGF-beta ligand กับ TGF-betaRI และยับยั้งการทำงานของ Smad2/3 จากการศึกษาของBrown และคณะ

(1995) ได้ศึกษาการหายของแผลในหนูTGF-beta1 deficient mouse พบว่าในวันที่ 10 หลังการเกิดแผล หนูในกลุ่ม TGF-beta1 deficient mouse มีเปอร์เซ็นต์การปิดของแผลเท่ากับ 54.4±10.1% ซึ่งน้อยกว่ากลุ่มควบคุม (70.7±5.4%) จากนั้นมีการตรวจวิเคราะห์ทางเนื้อเยื่อวิทยา พบว่าในกลุ่ม TGF-beta1 deficient mouse มี granulation tissue บางและมีปริมาณหลอดเลือดน้อย และยังพบเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบทั่วบริเวณเนื้อเยื่อ แต่ในกลุ่มควบคุมซึ่งเป็นหนูปกติ มี granulation tissue ที่สมบูรณ์ มีหลอดเลือดหนาแน่นและพบเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบเพียงเล็กน้อย จากนั้นตรวจวิเคราะห์การสะสมของ collagen โดยใช้วิธี Trichrome-stained histologicsections พบว่าในกลุ่ม TGF-beta1 deficient mouse มีการสะสมของ collagen ในวันที่ 10 หลังการเกิดแผล ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม Martinez-Ferrer และคณะ (2010) ได้รายงานการศึกษาบทบาทของ TGF-beta signaling ในเซลล์ fibroblasts โดยใช้ fibroblastic TGF-beta type II receptor knockout ($Tgfbr2^{dermalKO}$) mouse model ต่อการหายของแผลเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มปกติ พบว่ากลุ่ม $Tgfbr2^{dermalKO}$ มีการหดตัวของแผลและการสร้าง granulation tissue น้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และพบว่าเปอร์เซ็นต์ re-epithelization ในกลุ่ม $Tgfbr2^{dermalKO}$(58.0±2.9%) สูงกว่ากลุ่มควบคุม (22.5±2.5%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และจากการวิเคราะห์การแทรกซึมของเซลล์เม็ดเลือดขาวไปยังบริเวณแผล พบว่าในกลุ่ม $Tgfbr2^{dermalKO}$ มีจำนวนของเซลล์ macrophages (7.3±0.6) ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (21.5±0.5) จากผลการศึกษานี้จะเห็นได้ว่ากลไกการทำงานของ TGF-beta signaling มีผลต่อ macrophage recruitment, re-epithelization และ wound contraction จากการศึกษาของ Ashcroft และคณะ (1999) พบว่าการทดสอบผลต่อการหายของแผลในหนู *Smad3* knockout mice มีจำนวนเซลล์ fibroblasts น้อย มีการสะสมของ ECM ลดลง และลดการแทรกซึมของเซลล์เม็ดเลือดขาวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม Owens และคณะ (2010) ได้ศึกษาบทบาทของ Smad4 ต่อกระบวนการหายของแผลโดยใช้โมเดล *Smad4*-knockout mice เปรียบเทียบกับหนูปกติ พบว่าหนูกลุ่ม *Smad4*-knockout mice มีการหายของแผลแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับกลุ่มควบคุม โดยในวันที่ 3 หลังการเกิดแผล หนูในกลุ่มควบคุมมีการหายของ 53% แต่กลุ่ม *Smad4*-knockout mice มีการหายของแผลเพียง 29% จากผลการศึกษาข้างต้นจะเห็นได้ว่าผลจากการยับยั้งการทำงานของ *Smad*s จะส่งผลให้กระบวนการหายของแผลช้ากว่าปกติ



รูปที่ 3.4 บทบาทของ Transforming growth factor-beta (TGF-beta)/Smad signaling pathwayในกระบวนการหายของแผล (Ramirez*et al*., 2014)

นอกจากนี้แล้ว ยังพบว่ามี growth factors อื่นๆ ที่มีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการหายของแผล เช่น

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

Fibroblast growth factors family (FGFs)

FGFs พบในคนทั้งหมด 22 ชนิด โดยมี 3 ชนิดหลัก ที่มีความสำคัญต่อกระบวนการหายของแผล ได้แก่ FGF-2, FGF-7 (keratinocyte growth fator; KGF) และ FGF-10 โดยทั้งหมดสร้างมาจากเซลล์ keratinocytes, fibroblasts, endothelial cells, smooth muscle cells และ mast cells ซึ่ง FGFs จะเข้าจับกับ transmembrane tyrosine kinase receptors ซึ่งมี 4 ชนิด ได้แก่ FGF receptors 1-4 (FGFR 1-4) เมื่อจับกับ receptor จะทำหน้าที่ในการควบคุมการแบ่งเซลล์ การเปลี่ยนแปลงของเซลล์ การเคลื่อนที่ของเซลล์ และการมีชีวิตรอดของเซลล์หลายชนิด (Werner and Grose, 2003; Grose and Werner, 2004) จากการศึกษาของ Werner และคณะ (1992) พบว่าระดับของ FGF-7mRNA หลังจากเกิดแผล 24 ชม. เพิ่มขึ้นในเนื้อเยื่อที่มีแผลประมาณ 160 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อปกติ และมีรายงานก่อนหน้านี้ ได้ศึกษาระดับของ FGF-7mRNA ในหนูเบาหวาน (db/db mice) ที่ทำให้เกิดแผลโดยใช้วิธี RNase protection assay พบว่าระดับของ FGF-7mRNA ในหนูเบาหวานที่ไม่มีแผลใกล้เคียงกับในหนูปกติ แต่ในหนูเบาหวานที่ทำให้เกิดแผลมีระดับของ FGF-7mRNA ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับหนูปกติ และพบว่ามีระดับของ FGF-7mRNA สูงสุดในวันที่ 3 และ 5 หลังการเกิดแผล โดยที่ในหนูปกติมีระดับของ FGF-7mRNA สูงสุดในเวลา 24 ชม. หลังการเกิดแผล ซึ่งการลดลงของ FGF-7 จะส่งผลให้เกิดการแบ่งเซลล์ keratinocyte ช้าลงและทำให้แผลหายช้า (Werner*et al*., 1994) Meyer และคณะ (2012) ได้ศึกษาผลต่อการหายของแผลในหนู FGFR-1/2 knockout mice ซึ่งมีความบกพร่องของ FGFR-1 และ FGFR-2 พบว่าเปอร์เซ็นต์การปิดของแผลในวันที่ 3 และ 5 ของหนูกลุ่ม FGFR-1/2 knockout mice มีเปอร์เซ็นต์การปิดของแผลน้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับหนูปกติ นอกจากนี้ในวันที่ 5 หลังการเกิดแผล ได้เก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อบริเวณแผล เพื่อศึกษาการแบ่งเซลล์และการเคลื่อนที่ของเซลล์ keratinocyte พบว่าหนูกลุ่ม FGFR-1/2 knockout mice มีการแบ่งเซลล์และการเคลื่อนที่ของเซลล์ keratinocyte ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งจากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าความบกพร่องของ FGFR-1 และ FGFR-2 ส่งผลให้เกิดการหายของแผลช้าลง เนื่องมาจากมีความบกพร่องของการแบ่งเซลล์และการเคลื่อนที่ของเซลล์ keratinocyte ที่มีความสำคัญต่อการเกิด re-epithelialization

Vascular endothelial growth factor family (VEGFs)

VEGFs พบในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมทั้งหมด 5 ชนิด ได้แก่ VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D และ placenta growth factor(PLGF) โดยจะเข้าจับกับ transmembrane tyrosine kinase receptors ซึ่งมี 3 ชนิด ได้แก่ VEGFR 1-3 (Saharinen *et al*., 2011) VEGF-A มีความสำคัญต่อกระบวนการหายของแผล ซึ่งทำหน้าที่ในการส่งเสริมกระบวนการสร้างหลอดเลือดใหม่ การเคลื่อนที่และการแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนของ endothelial cell โดย VEGF-A สร้างมาจาก keratinocytes, fibroblast smooth muscle cells, platelet, neutrophil และ macrophageโดย VEGF-A จะเข้าจับกับ VEGFR-1 และ VEGFR-2 ที่อยู่บน endothelial cell ของหนังหลอดเลือด (Barrientos *et al*., 2008) Okizaki และคณะ (2014) ได้ศึกษาผลต่อการหายของแผลและการสร้างหลอดเลือดใหม่ในหนูเบาหวานที่มีความบกพร่องของ VEGFR-1 (VEGFR1-tyrosine kinase knockout mice) เปรียบเทียบกับหนูปกติ พบว่าหนูกลุ่ม VEGFR1-tyrosine kinase knockout mice มีการหายของแผลและการสร้างหลอดเลือดใหม่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และจากการศึกษาก่อนหน้านี้ ได้ศึกษาผลต่อการหายของแผลในหนูเบาหวาน (db/db mice) โดยการรักษาแบบเฉพาะที่ด้วยการทา VEGFprotein เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งได้รับการรักษาด้วย phosphate-buffered saline(PBS) ปริมาณ 20 µg ต่อแผล พบว่าแผลที่ได้รับการรักษาด้วยการทา VEGFprotein มีการหายของแผลเร็วกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาพบว่าแผลที่ได้รับการรักษาด้วยการทา VEGFprotein มีการสร้างและสะสมของ granulation tissue มากกว่าอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมในทุกช่วงเวลา และพบว่าในวันที่ 3 และ 7 หลังการเกิดแผล หนูกลุ่มที่ได้รับการรักษาด้วย VEGFprotein มีการสังเคราะห์หลอดเลือดใหม่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (Galiano*et al*., 2004) นอกจากนี้การยับยั้งการทำงานของโมเลกุลที่เกี่ยวข้องในกระบวนการหายของแผลบางชนิด จะส่งผลให้การหายของแผลเกิดเร็วขึ้นหรือช้าลง ขึ้นอยู่กับการทำงานของโมเลกุลนั้นๆ ดังตัวอย่างที่แสดงใน **ตารางที่ 3.3**

ตารางที่ 3.3 ปัจจัยที่มีผลต่อกระบวนการหายของแผลในสัตว์ทดลอง

in vivo model	Effects on wound healing	References
IL-6R alpha knockout mice	- IL-6R alpha เป็น receptor ที่จับแบบจำเพาะกับ IL-6 ทำหน้าที่ในการตอบสนองต่อการอักเสบแบบเฉียบพลันและการเปลี่ยนแปลงของ lymphocyte - การหายของแผลใกล้เคียงกับหนูสายพันธุ์ปกติ - พบการสร้างเยื่อบุผิว (re-epithelialization) ช้ากว่าหนูสายพันธุ์ปกติแต่เร็วกว่าหนู IL-6 knockout mice	McFarland-Mancini*et al*., 2010
IL-6 knockout mice	- IL-6 เป็น proinflammatory cytokine สร้างจากneutrophils และ macrophageมีหน้าที่สำคัญในกระบวนการอักเสบ มีผลต่อการกระบวนการสร้างหลอดเลือดใหม่ (angiogenesis) กระบวนการสร้างเยื่อบุผิว (re-epithelialization) และการสะสมของ collagen - การหายของแผลช้ากว่าหนูสายพันธุ์ปกติ - พบการลดลงของ leukocyte infiltration, re-epithelialization และลดการสะสมของ collagen	Lin *et al*., 2003

ตารางที่ 3.3 ปัจจัยที่มีผลต่อกระบวนการหายของแผลในสัตว์ทดลอง (ต่อ)

in vivo model	Effects on wound healing	References
IL-17A knockout mice	- IL-17A เป็น proinflammatory cytokine สร้างจาก helper T-cell มีหน้าที่ในการเพิ่มจำนวนและการเคลื่อนที่มาบริเวณแผลของ neutrophilมีความสำคัญต่อการป้องกันและทำลายเชื้อโรค - การหายของแผลเร็วกว่าหนูสายพันธุ์ปกติ - เพิ่มการสะสมของ collagen ลดการสะสมของ neutrophil บริเวณแผล	Takagi *et al*., 2016
IL-10 knockout mice	- IL-10 เป็น cytokine สร้างจาก macrophage มีผลต่อการต้านอักเสบ และสามารถยับยั้ง cytokine อื่นๆ เช่น IL-12 และ TNF-alpha - การหายของแผลเร็วกว่าหนูสายพันธุ์ปกติ - พบการสร้างเยื่อบุผิวและการหดตัวของแผลเพิ่มขึ้น - พบการแสดงออกของ alpha-smooth muscle actin และการแทรกซึมของ macrophage เพิ่มขึ้น	Eming *et al*., 2007

ตารางที่ 3.3 ปัจจัยที่มีผลต่อกระบวนการหายของแผลในสัตว์ทดลอง (ต่อ)

in vivo model	Effects on wound healing	References
IL-1ra knockout mice	- IL-1ra อยู่ในกลุ่มของ IL-1family มีโครงสร้างคล้ายกับ IL-1s ซึ่งทำหน้าที่แย่งจับกับ IL-1R และขัดขวางการทำงานของ IL-1 - การหายของแผลช้ากว่าหนูสายพันธุ์ปกติ - พบการลดลงในการแสดงออกของยีน VEGF - พบการลดลงของการสะสม collagen และกระบวนการสร้างหลอดเลือดใหม่	Ishida *et al*., 2006
Kinin receptors knockout mice	- Kinin เป็นสารสื่อกลางในกระบวนการอักเสบ มีผลทำให้หลอดเลือดขยายตัว และเพิ่มการซึมผ่านของหลอดเลือด - การหายของแผลช้ากว่าหนูสายพันธุ์ปกติ - มีผลลดการแทรกซึมของ polymorphonuclear cells - มี collagen ในเนื้อเยื่อลดลง ลดกระบวนการสร้างเยื่อบุผิว (re-epithelialization) และลดจำนวนของ myofibroblasts	Soley *et al*., 2016

ตารางที่ 3.3 ปัจจัยที่มีผลต่อกระบวนการหายของแผลในสัตว์ทดลอง (ต่อ)

in vivo model	Effects on wound healing	References
iNOS knockout mice	- iNOS เป็นเอนไซม์ทำหน้าที่สังเคราะห์ nitric oxide ซึ่งมีผลต่อกระบวนการหายของแผล ทำให้หลอดเลือดขยาย ส่งเสริมการตอบสนองต่อการอักเสบและกระบวนการสร้างหลอดเลือดใหม่ (angiogenesis) - การหายของแผลช้ากว่าหนูสายพันธุ์ปกติ - พบการลดลงของกระบวนการสร้างเยื่อบุผิว (re-epithelialization) และลดการแทรกซึมของ macrophage	Kitano*et al*., 2017
ICAM-1 knockout mice	- ICAM-1 อยู่ในกลุ่มของ immunoglobulin super family พบบนเยื่อหุ้มเซลล์ของเยื่อบุผนังหลอดเลือด ซึ่งเป็นสิ่งจำเป็นต่อการยึดเกาะและการเคลื่อนที่ของเซลล์เม็ดเลือดขาวในระหว่างกระบวนการอักเสบ - การหายของแผลช้ากว่าหนูสายพันธุ์ปกติ - พบความยืดหยุ่น (elasticity) ของเนื้อเยื่อลดลง	Gay *et al*., 2011

ตารางที่ 3.3 ปัจจัยที่มีผลต่อกระบวนการหายของแผลในสัตว์ทดลอง (ต่อ)

in vivo model	Effects on wound healing	References
Lumican knockout mice	- Lumican เป็นโปรตีนที่สำคัญใน ECM ทำหน้าที่ควบคุมการสร้างเส้นใย collagen ควบคุมการเคลื่อนที่และการแทรกซึมของเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ - การหายของแผลเกิดขึ้นช้ากว่าหนูสายพันธุ์ปกติ - เกิดความผิดปกติของโครงสร้างและการเรียงตัวของเส้นใย collagen - พบจำนวนของ macrophages เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องในบริเวณแผลเมื่อเปรียบเทียบกับหนูสายพันธุ์ปกติ	Yeh *et al*., 2010 Liu *et al*., 2013
PPAR$_y$- knockout mice	- PPAR$_y$เป็น receptor ที่อยู่ในกลุ่มของ nuclear receptor superfamily มีหน้าที่ควบคุมการทำงานของ macrophage - การหายของแผลช้ากว่าหนูสายพันธุ์ปกติ - พบการลดลงของการสร้าง granulation tissue ลดกระบวนการสร้างหลอดเลือดใหม่ (angiogenesis) และลดการสะสม collagen - macrophage	Chen *et al*., 2015

ตารางที่ 3.3 ปัจจัยที่มีผลต่อกระบวนการหายของแผลในสัตว์ทดลอง (ต่อ)

in vivo model	Effects on wound healing	References
TLR4 knockout ($TLR4^{-/-}$) mice	- TLR4 เป็นโปรตีนตัวรับจดจำรูปแบบ (pattern recognition receptors,PRRs) พบบนผนังเซลล์ของ macrophage ทำหน้าที่จับกับlipopolysaccharide ที่สร้างจากแบคทีเรีย เพื่อตอบสนองต่อการกำจัดเชื้อโรค การอักเสบ และมีความความสำคัญต่อการเกิดภาวะแทรกซ้อนของโรคเบาหวาน - การหายของแผลในหนูเบาหวาน ($TLR4^{-/-}$) เร็วกว่าแผลในหนูเบาหวาน (WT) - การหายของแผลในหนูเบาหวาน ($TLR4^{-/-}$) ไม่แตกต่างกับหนูสายพันธุ์ปกติ - ระดับของ IL-6 และ TNF-alpha ลดลงในเนื้อเยื่อแผลของหนูเบาหวาน ($TLR4^{-/-}$)	Dasu *et al*., 2013
MMP-9 knockout mice	- MMP-9 เป็นเอนไซม์ที่อยู่ในกลุ่มของ MMPs ทำหน้าที่ในการย่อยสลาย ECM และมีบทบาทสำคัญในการปรับเปลี่ยนสภาพของหลอดเลือด - การหายของแผลช้ากว่าหนูสายพันธุ์ปกติ - พบการลดลงของกระบวนการสร้างเยื่อบุผิว (re-epithelialization) และลดการสลาย fibrin clots - พบการลดลงของendothelial progenitor cells, ลดกระบวนการสร้างหลอดเลือดใหม่ และลดการสะสมของ collagen บริเวณแผล	Kyriakides *et al*., 2009 Cho *et al*., 2016

ตารางที่ 3.3 ปัจจัยที่มีผลต่อกระบวนการหายของแผลในสัตว์ทดลอง (ต่อ)

in vivo model	Effects on wound healing	References
NOX4 knockout mice	- NOX4 คือเอนไซม์ที่เร่งการเกิดปฏิกิริยา redox ก่อให้เกิดการสร้าง superoxide หรือ hydrogen peroxide ซึ่งมีผลต่อการทำลายเชื้อแบคทีเรียในระยะการอักเสบของกระบวนการหายของแผล - การหายของแผลช้ากว่าหนูสายพันธุ์ปกติ - พบการสะสมของ collagen ลดลง	Levigne *et al*., 2016
Smad3 knockout mice	- Smad3 เป็นโมเลกุลส่งสัญญาณภายในเซลล์ มีความสำคัญต่อการทำหน้าที่ของ TGF-beta - การหายของแผลช้ากว่าหนูสายพันธุ์ปกติ - พบการลดลงของการแทรกซึมของ neutrophil และ macrophageไปยังบริเวณแผล และการเกิด fibrosis ลดลง	Flanders *et al*., 2002 Liu *et al*., 2014

3.4 สารสมุนไพรที่เกี่ยวข้องกับการรักษาแผล (The roles of plant-derived compounds on wound healing: *in vitro*, *in vivo*, and clinical studies)

พืชสมุนไพรเป็นแหล่งของยารักษาโรคทั้งในทางการแพทย์แผนไทยและการแพทย์แผนปัจจุบัน เนื่องจากมีสารสำคัญหลายชนิดมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย ในปัจจุบันการใช้พืชสมุนไพรเป็นยารักษาโรคนั้นเป็นที่นิยมมากขึ้นเพราะสมุนไพรนั้นมีราคาถูกกว่ายาแผนปัจจุบัน และมีผลข้างเคียงต่ำ พืชสมุนไพรและสารสกัดจากพืชหลายชนิด มีการนำมาใช้ในการดูแลรักษาบาดแผล ซึ่งช่วยในการซ่อมแซมบาดแผลและการสร้างเนื้อเยื่อใหม่โดยผ่านกลไกต่างๆ ซึ่งในอดีตและปัจจุบันมีงานวิจัยการศึกษามากมายที่ศึกษาเกี่ยวข้องกับการใช้สมุนไพรต่อการหายของแผล ทั้งในระดับหลอดทดลอง (*in vitro*) สัตว์ทดลอง (*in vivo*) และการวิจัยเชิงคลินิก (clinical study)

การศึกษาสารสกัดจากสมุนไพรที่มีคุณสมบัติในการรักษาแผลในระดับหลอดทดลอง (*in vitro*)

การศึกษาในระดับหลอดทดลอง เป็นการศึกษาในห้องปฏิบัติการทั่วไปที่สามารถทำได้ง่าย สะดวก รวดเร็ว และไม่เกี่ยวข้องกับการพิจารณาทางจริยธรรมเมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาในระดับสัตว์ทดลอง การทดสอบสารต่างๆ ต่อฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาสามารถทดสอบได้หลายความเข้มข้น โดยไม่มีข้อจำกัดทางด้านความแตกต่างของชุดทดสอบ การฟื้นฟูหรือการสร้างผิวหนังใหม่จะเกี่ยวข้องกับconnective, epithelial tissues, dermal fibroblasts และ human fibroblasts (primary cells หรือ cell lines) ซึ่งเซลล์เหล่านี้เหมาะกับการศึกษาสารทดสอบที่อาจจะส่งผลต่อกระบวนการหายของแผล การศึกษากระบวนการหายของแผลในระดับหลอดทดลองจะเกี่ยวข้องกับปฏิสัมพันธ์ระหว่าง cell และ cell กับ matrix เพื่อจำลองการเคลื่อนที่ของเซลล์ในระหว่างกระบวนการหายของแผล (Gottrup *et al*., 2000; Wilhelm and Bielfeld, 2016) จากการศึกษาของ Demirci และคณะ (2014) ได้ศึกษาสารสกัดเมทานอลจากใบของ *Verbascum speciosum* ต่อคุณสมบัติต่างๆ ของเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการหายของแผล โดยศึกษาการมีชีวิตอยู่ของเซลล์human dermal fibroblast cells (HF), mouse fibroblast cells (L929) และ human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) โดยใช้วิธี cell viability assay พบว่าในวันที่ 1, 2 และ 3 หลังจากการทดสอบเซลล์ทั้ง 3 ชนิดด้วยสารสกัดจากใบของ *V. speciosum* ที่ความเข้มข้น 10-200 µg/ml ไม่พบความเป็นพิษต่อเซลล์ HF, L929 และ HUVECs และพบว่าในวันที่ 3 หลังการทดสอบ ที่ความเข้มข้น 200 µg/ml มีผลต่อเพิ่มการแบ่งเซลล์ L929 และ HUVECs นอกจากนี้ได้ศึกษาการแพร่กระจายและเคลื่อนที่ของเซลล์L929-HUVEC cells ด้วยวิธี co-culture scratch assays พบว่า กลุ่มที่ได้รับการทดสอบด้วยสารสกัดจากใบของ *V. speciosum* มีอัตราการปิดของแผล (wound closure rate) เร็วกว่ากลุ่มควบคุม และพบว่าเซลล์ L929สามารถแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวน และเคลื่อนที่ไปยังบริเวณแผลได้เร็วกว่าเซลล์ HUVEC จากการศึกษาของ Taleker และคณะ (2017) ได้ศึกษาผลของสารสกัดด้วยน้ำของตำรับยาที่ประกอบด้วย *Vitex negundo* L., *Emblica officinalis Gaertn*และ*Tridax procumbens* L. ต่อการเคลื่อนที่เซลล์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการหายของแผล ได้แก่ fibroblast และ keratinocytes (cell lines) โดยใช้วิธี Scratch assay พบว่าตำรับยาที่ความเข้มข้น 5 µg/ml มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของเซลล์ fibroblast มากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p< 0.05$) ตำรับยาที่ความเข้มข้น 3 µg/ml มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของเซลล์ keratinocyte มากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p< 0.05$) นอกจากการศึกษาเหล่านี้ยังพบการศึกษาอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับการหายของแผลในระดับหลอดทดลอง แสดงดัง **ตารางที่ 3.4**

การศึกษาสารสกัดจากสมุนไพรที่มีคุณสมบัติในการรักษาแผลในระดับสัตว์ทดลอง (*in vivo*)

การศึกษาในระดับสัตว์ทดลองมีระดับความน่าเชื่อถือมากกว่าในระดับหลอดทดลอง เนื่องจากเป็นการศึกษาในระบบร่างกายของสัตว์ทดลองซึ่งสามารถเทียบเคียงได้กับระบบร่างกายของมนุษย์ แต่มีข้อจำกัดทางด้านจริยธรรมการใช้สัตว์และสัตว์ทดลองมีความแตกต่างกันของสัตว์แต่ละตัว (individual differences)ซึ่งอาจจะทำให้ผลการทดลองเกิดความคลาดเคลื่อนได้ การใช้สัตว์ทดลองศึกษาผลของสารจากสมุนไพรต่อกระบวนการหายของแผลมีทั้งแบบ artificial model และ tissue model ซึ่งการเลือกใช้ model ขึ้นอยู่กับตัวแปรที่ต้องการจะทดสอบ สำหรับ artificial model เช่น subcutaneous chamber/sponges และ subcutaneous tubes ส่วน tissue model เช่น excision wounds, incision wounds, superficial wounds, dead space และ burn woundsซึ่งนิยมใช้ในการตรวจสอบระดับของ การสังเคราะห์เนื้อเยื่อใหม่ การสังเคราะห์ collagen การสังเคราะห์หลอดเลือดใหม่ และการวัดความแข็งแรงของเนื้อเยื่อบริเวณแผล (Dorsett-Martin and Wysocki, 2008; Gal *et al*.,2008; Wilhelm and Bielfeld, 2016) Singhal และคณะ (2011) ได้ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดด้วย ethanol จากใบของ *Argyreia nervosa* ซึ่งอยู่ในวงศ์ convolvulaceae ต่อการหายของแผลในหนูปกติและหนูเบาหวานที่เหนี่ยวนำด้วย alloxan monohydrate โดยทำให้เกิดแผลแบบ excisional wound model (ขนาด 300 mm^2และลึก 2 mm) พบว่าหนูปกติในวันที่ 8 และ 16 หลังการเกิดแผล กลุ่มที่ได้รับการทาแผลด้วยยาเตรียมเคลือบแผ่นปิดแผลที่มีส่วนผสมของสารสกัดเอทานอลจากใบของ *A.nervosa* มีขนาดของพื้นที่แผลน้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมและมีเปอร์เซ็นต์การปิดของแผล (%wound closure) ในวันที่ 16 เท่ากับ 92.96% ซึ่งสูงกว่ากลุ่มควบคุม (80.27%) แต่กลุ่มที่ได้รับการป้อนสารสกัดเอทานอลของ *A.nervosa* ขนาดของพื้นที่แผลไม่มีความแตกต่างกันกับกลุ่มควบคุม ในส่วนของหนูเบาหวาน ในวันที่ 16 หลังการเกิดแผล พบว่าทั้งกลุ่มที่ได้รับการทาด้วยยาเตรียมเคลือบแผ่นปิดแผลและได้รับการป้อนสารสกัดเอทานอลของ *A.nervosa* มีขนาดของพื้นที่แผลน้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และมี %wound closure สูงกว่ากลุ่มควบคุมในทุกช่วงเวลา Taleker และคณะ (2017) ได้ศึกษาผลของสารสกัดด้วยน้ำของตำรับยา ที่ประกอบด้วย *Vitex negundo* L., *Emblica officinalis* Gaertn และ *Tridax procumbens*L. ต่อการหายของแผลในหนูแรทโดยใช้ excision wound modelพบว่าหนูกลุ่มที่ได้รับการรักษาด้วยสารสกัดจากน้ำของตำรับยามีขนาดของแผลลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ในวันที่ 3, 6, 9, 12 และ 15 และพบว่าในวันที่ 15 หนูกลุ่มที่ได้รับการรักษาด้วยสารสกัดจากน้ำของตำรับยามี %wound contraction เท่ากับ 99.2% นอกจากนี้ได้นำตัวอย่างเนื้อเยื่อจากแผลที่หายแล้วตรวจวิเคราะห์ปริมาณของ collagen และ hydroxyproline พบว่า กลุ่มที่ได้รับการรักษาด้วยสารสกัดน้ำของตำรับยามีปริมาณของ collagen และ hydroxyproline สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม นอกจากการศึกษาเหล่านี้ยังพบการศึกษาอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับการหายของแผลในระดับสัตว์ทดลอง

การศึกษาสารสกัดจากสมุนไพรที่มีคุณสมบัติในการรักษาแผลในระดับคลินิก (clinical study)

การศึกษาในระดับคลินิกเป็นการศึกษาที่มีความน่าชื่อถือมากที่สุด แต่มีข้อจำกัดทางด้านจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์และจำเป็นต้องมีผลการศึกษาทั้งในระดับหลอดทดลองและสัตว์ทดลองยืนยันความปลอดภัยของการใช้จริงในมนุษย์ ซึ่งการศึกษาในระดับคลินิกที่เกี่ยวข้องกับผลของสารสกัดจากสมุนไพรต่อกระบวนการหายของแผลจะพบการศึกษาในรูปแบบ

ของแผลชนิดต่างๆ ในผู้ป่วย เช่น infection wound, burn wound หรือ diabetic wound เป็นต้นจากการศึกษาเชิงคลินิกของ Xu และ Jin (2015) ได้ทดสอบผลของการใช้ยา Shengji ointment (SO) รักษาแผลติดเชื้อในผู้ป่วย yang syndrome โดยใช้วิธี multicenter randomized controlled trial ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาแผลด้วยยา SO (treatment group) จำนวน 330 คน และกลุ่มผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาแผลด้วย Votalin (control group) จำนวน 110 คน ผู้ป่วยทั้งหมดได้รับการรักษาทุกวันเป็นเวลา 21 วัน พบว่าหลังการรักษา 7 วัน ขนาดพื้นที่ของแผลใน treatment group ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับ control group (p= 0.002) นอกจากนี้พบว่าระดับความเจ็บปวด และความลึกของแผลใน treatment group ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับ control group (p< 0.01)จากการศึกษาเชิงคลินิกของ Muangman และคณะ (2016) ในการทดสอบผลของแผ่นปิดแผล โดยใช้ 100% polyester gauze ที่เคลือบด้วยสารสกัดจากสมุนไพร 2 ชนิดได้แก่ 5% *Centella asiatica*(บัวบก) และ 2.5% *Aloe vera* (ว่านหางจระเข้) (herbal extracts dressing) ต่อการรักษาผู้ป่วยที่มีแผลชนิด burn wound โดยใช้วิธี simple randomized prospective clinical study ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่ม herbal group ได้รับการรักษาแผลด้วย herbal extracts dressing จำนวน 17 คน และกลุ่มcontrol group ได้รับการรักษาแผลด้วย commercial dressing (paraffin และ 0.5% chlorhexidine acetate) ผู้ป่วยทั้งหมดได้รับการรักษาด้วยแผ่นปิดแผล และเปลี่ยนแผ่นปิดแผลทุกๆ 3 วัน จนกว่าแผลหาย พบว่า ผู้ป่วยในกลุ่ม herbal group มีระยะเวลาในการหายของแผล เท่ากับ 18.53±1.66 วัน ซึ่งน้อยกว่ากลุ่ม control group (20.06±2.51 วัน) และพบว่าในวันที่ 15 และ 20 ของการรักษา กลุ่ม herbal group มี %epithelializationสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม control group (p=0.043 และp=0.010ตามลำดับ) จากการศึกษาเชิงคลินิกของKoและคณะ (2014) ในการทดสอบผลของตำรับยาสมุนไพร (NF3) ประกอบด้วยสมุนไพร 2 ชนิดคือ *Radix Astragali* และ *Radix Rehmanniae* ในอัตราส่วน 2:1 ซึ่งอยู่ในรูปแบบยาผง ต่อการรักษาแผลบริเวณเท้าของผู้ป่วยเบาหวาน โดยใช้วิธี randomized double-blind placebo-controlled study ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มๆ ละ 8 คน คือ กลุ่ม herbal group ได้รับการรักษาแผลด้วย NF3 ครั้งละ 5 g วันละ 2 ครั้ง เช้า-เย็น และกลุ่ม control group ได้รับการรักษาแผลด้วย placebo วันละ 2 ครั้ง เช้า-เย็น ผู้ป่วยทั้งหมดได้รับการรักษาระยะเวลารวม 6 เดือน พบว่ากลุ่ม herbal group มีขนาดพื้นที่แผล (3.55%) ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับ control group (1.52%) (p=0.062) และจากผลการทดสอบการตอบสนองต่อ sensory neuropathy พบว่าในกลุ่ม herbal group มีการตอบสนองลดลงจาก 27% เป็น 7%และกลุ่ม control group มีการตอบสนองลดลงจาก 37% เป็น 35% นอกจากนี้กลุ่ม herbal group มีระดับของ TNF-alpha ใน serum ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับcontrol group(p=0.034) และจากการศึกษาโดยการใช้วิธี Microarray study พบว่ากลุ่ม herbal group มีการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับ การสร้าง fibroblasts การสังเคราะห์หลอดเลือดใหม่ และต้านการอักเสบจากรายงานของ Namjoyan และคณะ (2016) ได้ทดสอบผลของการใช้ครีม Dragon's blood ซึ่งเป็น resin ที่ได้จากต้น *Croton lechleri*ต่อการรักษาแผลในผู้ป่วย โดยใช้วิธี double-blind, placebo-controlled, randomized clinical trial ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่ม therapeutic group ซึ่งได้รับการรักษาด้วย Dragon's blood cream และกลุ่มที่ได้รับยาหลอก คือ placebo group ผู้ป่วยทุกคนได้รับการทาครีมวันละ 2 ครั้ง และได้รับการประเมินเปอร์เซ็นต์การหายของแผล โดยใช้เวลาในการรักษาจนกระทั่งแผลหายสนิทซึ่งพบว่า ในวันที่ 3, 5,

7 และ 10 หลังการรักษาด้วย Dragon's blood cream มีเปอร์เซ็นต์การหายของแผล เท่ากับ 31.06, 63.77, 77.80 และ 89.14% ตามลำดับซึ่งสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม placebo group (4.74, 23.50, 43.90 และ 61.95% ตามลำดับ) (p=0.0001)

ตารางที่ 3.4 พืชสมุนไพรที่มีคุณสมบัติต่อกระบวนการหายของแผลในระดับหลอดทดลอง (*in vitro*)

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

ตารางที่ 3.4 พืชสมุนไพรที่มีคุณสมบัติต่อกระบวนการหายของแผลในระดับหลอดทดลอง (*in vitro*) (ต่อ)

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

ตารางที่ 3.4 พืชสมุนไพรที่มีคุณสมบัติต่อกระบวนการหายของแผลในระดับสัตว์ทดลอง (*in vivo*)

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

ตารางที่ 3.4 พืชสมุนไพรที่มีคุณสมบัติต่อกระบวนการหายของแผลในระดับสัตว์ทดลอง (*in vivo*) (ต่อ)

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

3.5 การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสมุนไพรองค์ประกอบในตำรับยาสมานแผล (Ya-Samarn-Phlae) และการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของยาสมานแผล

การแพทย์แผนไทย (Thai Traditional Medicine) เป็นภูมิปัญญาในการดูแลรักษาสุขภาพของประชาชนชาวไทย จนกลายเป็นวัฒนธรรมการดูแลสุขภาพที่หลากหลาย มีการผสมผสานกับการแพทย์แบบอื่นและมีการปรับตัวอย่างต่อเนื่อง สามารถตอบสนองความต้องการของประชาชนในการดูแลสุขภาพหลายมิติ ทั้งด้านกาย จิตใจ สังคม วัฒนธรรมและความเชื่อ (Marles and Farnsworth, 1995; กรมพัฒนาการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือกกระทรวงสาธารณสุข, 2550) จากความเชื่อว่าสมุนไพรส่วนมากจะมีฤทธิ์อ่อน ไม่ค่อยมีพิษหรือไม่เกิดฤทธิ์ข้างเคียงเฉียบพลัน (วรนุช เกียรติพงษ์ถาวรและคณะ, 2530) ประกอบกับรัฐบาลมีนโยบายที่จะพัฒนาสมุนไพรตามแผนพัฒนาการเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติ โดยกำหนดแนวทางในการพัฒนาสมุนไพรไว้ 3 แนวทางคือ 1) เพื่อใช้ในงานสาธารณสุขมูลฐาน 2) เพื่อใช้ในอุตสาหกรรม และ 3) เพื่อส่งออก โดยเฉพาะการใช้น้ำยาหรือครีมใส่แผลซึ่งสกัดจากพืชสมุนไพรเพื่อช่วยลดอันตรายจากการติดเชื้อและ/หรือช่วยส่งเสริมการสร้างเนื้อเยื่อใหม่บริเวณแผลโดยมีผู้ทดลองใช้น้ำผึ้ง น้ำเชื่อมเข้มข้น (วรนุช เกียรติพงษ์ถาวร, 2525) ครีมใบบัวบก (ศิริรัตน์ โกศัลวัฒน์, 2537) ครีมเปลือกมังคุด (วัฒนีย์ ปานจินดา, 2535) และวุ้นว่านหางจระเข้ (วรนุช เกียรติพงษ์ถาวรและคณะ, 2530) พบว่าได้ผลดีในด้านการรักษาแผล ในทางการแพทย์แผนไทยมักจะมีการใช้สมุนไพรในการรักษาโรคเป็นตำรับยามากกว่าสมุนไพรเดี่ยว ซึ่งตำรับยาสมุนไพรจะประกอบด้วยสมุนไพรมากกว่าหนึ่งชนิดขึ้นไป จากการศึกษาก่อนหน้านี้ ได้ศึกษาตำรับยาสมานแผลในภาคใต้ พบว่าประสิทธิภาพของการใช้ตำรับยาในการทดสอบฤทธิ์ต่างๆ จะดีกว่าพืชสมุนไพรเดี่ยวซึ่งประกอบก้วยสมุนไพร 4 ชนิด คือ มังคุด ขมิ้นชัน หมาก และข้าวสาร

การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสมุนไพรองค์ประกอบในตำรับยาสมานแผลซึ่งประกอบด้วยสมุนไพรทั้งหมด 4 ชนิด ได้แก่

1. มังคุด (*Garcinia mangostana* L.)

การใช้ทางการแพทย์แผนไทย เปลือกผล รสฝาด บดเป็นผง หรือชง หรือต้มรับประทาน แก้ท้องเสีย แก้บิดมูกเลือด ฝนกับน้ำปูนใส ทาแผลเน่าเปื่อยพุพอง แผลมีหนอง สมานแผลสด สารสำคัญ สารสำคัญที่เป็นองค์ประกอบหลัก คือสารในกลุ่ม Xanthones เช่น alpha-mangostin, beta-mangostin, gamma-mangostin, mangostinone, smeathxanthone A และ garcinone E เป็นต้น (Jung *et al*.,2006)

ฤทธิ์ทางชีวภาพของมังคุด

- ฤทธิ์ต้านการอักเสบ

จากการศึกษาของ Nakatani และคณะ (2002) ได้ศึกษาสาร gamma-mangostin ที่แยกได้จากเปลือก ของ *G. mangostana*พบว่าสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ COX-1 และ COX-2 ได้โดยมีค่า IC_{50}เท่ากับ 0.8 และ 2 μM ตามลำดับ จากการศึกษาของ Liu และคณะ (2016) ได้ศึกษาผลของสารในกลุ่ม xanthones ที่แยกได้จากเปลือกของ *G. mangostana*ต่อฤทธิ์ยับยั้งการสร้าง NO ใน lipopolysaccharide (LPS)-stimulated RAW264.7 cells ซึ่ง NO เป็นสารสื่อกลางที่ควบคุมการตอบสนองต่อการอักเสบ แต่การสร้าง NO มากเกินไปจะทำให้เซลล์และเนื้อเยื่อเกิดการความเสียหาย ทำให้เกิดโรคต่างๆ รวมทั้งการเกิดแผลที่เท้าในโรคเบาหวานด้วย จากการศึกษาพบว่า Garcinoxanthones B และ C สามารถยับยั้งการสร้าง NO ได้อย่างมีนัยสำคัญ โดยมีค่า IC_{50}เท่ากับ 11.3±1.7 และ 18.0±1.8 μM ตามลำดับ และพบว่า Garcinoxanthones B สามารถยับยั้งการแสดงออกของ inducible NO synthase (iNOS) ได้

- ฤทธิ์ต่อการหายของแผล

จากงานวิจัยของ Nganlasom และคณะ (2008) พบว่า สารสกัดด้วยเอทานอลจากเปลือกมังคุดที่ใช้ในการรักษาแผลในหนูที่เหนี่ยวนำให้เกิดเบาหวานมีประสิทธิภาพดีกว่ากลุ่มควบคุมที่ได้รับยาหลอก โดยมี %wound contraction ในวันที่ 4, 6 และ 8 เท่ากับ 53.29, 70.96 และ 80.57% ตามลำดับ ในขณะที่กลุ่มควบคุมได้รับยาหลอกมี %wound contraction ในวันที่ 4, 6 และ 8 เท่ากับ 33.49, 50.00 และ 64.76% ตามลำดับ จากการศึกษาของ Charernsriwilaiwat และคณะ (2013) ได้ศึกษาการใช้ chitosan-based nanofiber mats ที่มีส่วนผสมของ3% alpha-mangostin ต่อการหายของแผลในหนูปกติ พบว่าในวันที่ 1 และ 4 หลังการรักษา กลุ่มที่ได้รับ 3% alpha-mangostin fiber mats dressing มี % wound closure มากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

-ฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ

มีการศึกษาพบว่า สารสกัดเอทานอลของเปลือกมังคุดที่ความเข้มข้น 0.36% มีฤทธิ์ต้านการยึดเกาะของ *Streptococcus mutans*บนพื้นผิวลวดจัดฟัน (Putranti *et al*., 2013)Tatiya-aphiradee และคณะ (2016) ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อ methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ของสารสกัดด้วยเอทานอลและเมทานอลจากเปลือกมังคุด ทั้งในระดับหลอดทดลองและสัตว์ทดลอง พบว่า จากการศึกษาด้วยวิธี broth microdilution assay พบว่าสารสกัดด้วยเอทานอลมีค่า minimum inhibitory concentration (MIC) และ minimum bactericidal concentration (MBC) เท่ากับ 17 และ 30 µg/ml ตามลำดับ ซึ่งดีกว่าสารสกัดด้วยเมทานอลที่มีค่า MIC และ MBC เท่ากับ 20 และ 35 µg/ml ตามลำดับ การทดสอบในระดับสัตว์ทดลองใช้ superficial skin infection model in mice พบว่า 10% ของสารสกัดด้วยเอทานอลสามารถลดจำนวนเชื้อ MRSA จากแผลติดเชื้อได้มากกว่า 100 colonies ในวันแรกหลังการรักษา และแผลสามารถหายสนิทในวันที่ 9 หลังการรักษา

ความเป็นพิษ ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งผิวหนัง (Human melanoma SK-MEL-28 cell; SK-MEL-28) พบว่า สาร Alpha-mangostin, Beta-mangostin และ 8-deoxygartanine มีค่าความความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ได้ 50% (IC_{50}) เท่ากับ 5.92, 3.55 และ 3.83 µg/ml ตามลำดับ (Wang *et al*., 2013)

2. ขมิ้นชัน (Curcuma longa L.)

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

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

ฤทธิ์ทางชีวภาพของขมิ้นชัน

curcumin เป็นสารองค์ประกอบหลักที่ตรวจพบในเหง้าขมิ้นชัน มีการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพต่างๆ ของ curcumin ได้แก่ anti-aging, anti-cancer และ wound healing activity (Maheshwari *et al*., 2006) บทบาทของสาร curcuminมีผลต่อกระบวนการหายของแผลในทุกระยะทั้ง inflammation, proliferation และ remodeling phase (Akbik *et al*., 2014)จากรายงานของ Kant และคณะ (2014) ได้ศึกษาฤทธิ์ของ 0.3% curcumin ในpluronic gel ต่อการหายของแผลในหนูเบาหวานที่เหนี่ยวนำด้วย streptozotocin โดยใช้ excision wound model พบว่า ในวันที่ 7-19 กลุ่มที่ได้รับการรักษาด้วย curcumin มี %wound contraction มากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม นอกจากนี้

พบว่า กลุ่มที่ได้รับการรักษาด้วย curcumin สามารถลดการแสดงออกของ inflammatory cytokines/enzymes (TNF-alpha, IL-1beta และ MMP-9)อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม เพิ่มระดับของ anti-inflammatory cytokine (IL-10) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และเพิ่มระดับของ antioxidant enzymes (superoxide dismutase; SOD, catalase และ glutathione peroxidase; GPx)ซึ่งจากผลการศึกษานี้สามารถบ่งชี้ได้ว่า curcumin มีผลต่อระยะ inflammation ของกระบวนการหายของแผล การตอบสนองต่อการอักเสบในกระบวนการหายของแผลจะเกี่ยวข้องกับการทำงานของnuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF-KB) pathway ซึ่งNF-KB จะถูกกระตุ้นด้วยการทำงานของเอนไซม์ kinases (AKT, PI3K และ IKK)จากรายงานของ Mohanty และคณะ (2012) ได้ศึกษาผลของ curcumin loaded oleic acid based polymeric (COP) bandageต่อการหายของแผลในหนูปกติ พบว่าในวันที่ 4, 8 และ 10 หลังการรักษา หนูในกลุ่มที่ได้รับ COP มี %wound area น้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม นอกจากนี้พบว่า COP มีผลลดการแสดงออกของ PI3K และ pAKTprotein ในเนื้อเยื่อแผลแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และพบว่าการแสดงออกของ NF-KBmRNA ในเนื้อเยื่อแผลก็ลดลงเช่นกัน ซึ่งจากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า curcumin มีผลต่อการยับยั้ง PI3K/AKT/NF-KB signaling pathway โดยมีผลลดการทำงานของ PI3K และ pAKTkinases ทำให้ลดการกระตุ้นการทำงานของ NF-KBgene ได้ โดยส่งผลต่อฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบบริเวณแผล นอกจากการออกฤทธิ์ในระยะการอักเสบแล้ว curcumin ยังมีผลออกฤทธิ์ในระยะproliferation phaseจากรายงานของ Kulac และคณะ (2013)ได้ศึกษาผลของการใช้ curcumin ต่อการรักษาแผล (burn wound) ในหนูทดลอง พบว่าในวันที่ 4 หลังการรักษาแผล กลุ่มที่ได้รับการรักษาด้วย curcumin มีการหายของแผลเร็วกว่ากลุ่มควบคุม โดยมีผลต่อการเพิ่มการสะสมของ collagen เพิ่มการสร้างหลอดเลือดใหม่ เพิ่มการสร้างเนื้อเยื่อ granulation และเพิ่มการซ่อมแซมเซลล์เยื่อบุผิวบริเวณแผลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม นอกจากนี้พบว่า ในวันที่ 8 และ 12 หลังการรักษาแผล กลุ่มที่ได้รับการรักษาด้วย curcuminมีระดับของ hydroxyproline เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (p<0.05) Durgaprasad และคณะ (2011) พบว่า หนูทดลองที่ได้รับการรักษาแผลด้วย curcumin มี % wound contraction เท่ากับ 90.11±4.83 % ซึ่งมากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (66.64±2.5%) และพบว่ากลุ่มที่ได้รับ curcumin สามารถลดระยะเวลาในการสร้างเนื้อเยื่อใหม่ (14 วัน) แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (19 วัน) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับฤทธิ์ต่อการหายของแผลจากสารสกัดของเหง้าขมิ้นชัน ได้แก่ จากการศึกษาของ Kundu และคณะ(2014) พบว่าเหง้าขมิ้นชัน 15 g ผสมใน petroleum jelly 85 g (gauze impregnated with turmeric paste) สามารถรักษาแผลในกระต่ายได้ดีกว่ากลุ่มควบคุม (pyrogen-free distilledwater-soaked gauze)โดยมี %wound contraction size ในวันที่ 14 เท่ากับ 5.78±0.01 ในขณะที่กลุ่มควบคุม มี %wound contraction size เท่ากับ 62.71±0.01 และจากการศึกษาของ Purohit และคณะ (2013) ได้ทดสอบสารสกัดด้วยเอทานอลจากเหง้าขมิ้นชันต่อการหายของแผล (excision wound model) ในหนูแรท พบว่า พื้นที่หรือขนาดของแผล (wound area) ในกลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากขมิ้นชันขนาดของแผลลดลงมากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยในวันที่ 9 เท่ากับ 0.09±0.65 mm^2จากวันแรก (200.55±1.42 mm^2) และแผลหายสนิทในวันที่ 12 แต่ในกลุ่มควบคุมซึ่งใช้ povidone iodine ointment เป็นสารมาตรฐาน ขนาดของแผลลดลงในวันที่ 9 เท่ากับ 34.28±1.24 mm^2และแผลหายสนิทในวันที่ 15 นอกจากนี้ขมิ้นชันยังมีฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ เช่น ฤทธิ์ต้านไบโอฟิล์ม สาร curcumin ที่ความเข้มข้น 100 µg/ml มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของ

Vibrio harveyi, *Vibrio parahaemolyticus*และ *Vibriovulnificus*ซึ่งมีการสร้างไบโอฟิล์มลดลง 69, 56 และ 79% ตามลำดับ (Packiavathy *et al*., 2013)และมีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างสารเอ็กโซพอลิแซ็คคาไรด์ 61, 71 และ 62% ตามลำดับ (Packiavathy *et al*., 2014)สาร curcumin ที่ความเข้มข้น 8 µg/ml มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของ *Helicobacter pylori*น้ำมันหอมระเหยจากขมิ้นที่ความเข้มข้น 0.5-4 mg/ml มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการยึดเกาะของ *S. mutans* (Lee *et al*., 2011)

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

3. หมาก (*Areca catechu* L.)

การใช้ทางการแพทย์แผนไทย เมล็ด มีรสฝาด สมานทั้งภายในและภายนอก แก้บิดปวดเบ่ง แก้ปวดแน่นท้อง ฆ่าพยาธิ ขับปัสสาวะ ฝนทาแผลเน่าเปื่อย แก้ปากเปื่อย

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

ฤทธิ์ทางชีวภาพของหมาก

- ฤทธิ์ต้านการอักเสบ

จากรายงานของ Huang และคณะ (2010) ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดด้วยอะซีโตนจากเมล็ดของ *A. catechu*ซึ่งมีสารcatechins เป็นองค์ประกอบหลัก โดยใช้ 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-treated human oral cancer SAS cells พบว่าสามารถยับยั้งการทำงานของ TPA ต่อการเหนี่ยวนำ COX-2 ได้ที่ความเข้มข้น 0.1-1 µg/ml โดยผ่านกระบวนการยับยั้งการแสดงออกของยีน ERKนอกจากนี้ได้ศึกษาในระดับสัตว์ทดลองพบว่า การทดสอบโดยให้หนูทดลองกินสารสกัดด้วยอะซีโตนจากเมล็ดของ *A. catechu* ขนาด 1 และ 10 mg/kg/day เป็นเวลา 5 วัน สามารถยับยั้งการบวมเนื่องจากการเหนี่ยวนำด้วย carrageenan และลดปริมาณของ PGE_2ได้ จากรายงานของ Bhandare และคณะ (2010) ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดด้วย hydroalcoholicจากเมล็ดของ *A. catechu* ในระดับสัตว์ทดลองโดยใช้ carrageenan-induced rat paw edema model พบว่าหลังจากการเหนี่ยวนำด้วย carrageenan1 และ 3 ชั่วโมง สารสกัดด้วย hydroalcoholicจากเมล็ดของ *A. catechu*ขนาด250, 500 และ 1000 mg/kg สามารถยับยั้งการบวมได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมKhan และคณะ (2011) ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบของaqueous fractionจากเมล็ดของ *A. catechu*โดยใช้วิธี carrageenan-induced rat paw edema model พบว่า ที่ขนาด 100 mg/kg สามารถต้านการอักเสบได้แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับควบคุม นอกจากนี้ มีการใช้วิธี PGE_2-induced rat paw edema modelและ arachidonic acid-induced rat paw edema modelพบว่าหลังจากเหนี่ยวนำด้วย PGE_2 และ arachidonic acid ที่เวลา 1, 2, 3 และ 4 ชั่วโมงaqueous fraction ขนาด 100 mg/kg สามารถยับยั้งการบวมของอุ้งเท้าหนูได้อย่างมี

นัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมจากงานวิจัยนี้สามารถอธิบายได้ว่าฤทธิ์ต้านการอักเสบของ *A. catechu* เป็นผลมาจากการยับยั้งการแสดงออกของ PGE_2 และ arachidonic acid

- ฤทธิ์ต่อการหายของแผล

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

- ฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ

จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า สารสกัดจากเมล็ดหมากที่ความเข้มข้น 16.67 µg/ml มีฤทธิ์ยับยั้งระบบ quorum-sensing ของ *P. aeruginosa* (Koh and Tham, 2011) Khan และคณะ (2011) พบว่า สารสกัดด้วยเมทานอล และ aqueous fractionจากเมล็ดของ *A. catechu* มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPHโดยมีค่า IC_{50}เท่ากับ 5.34 และ 7.28 µg/ml ตามลำดับ

ความเป็นพิษ การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม (Human MCF-7 breast carcinoma cell; MCF-7 cells) พบว่า สารสกัดเมทานอลจากผลหมากมีค่า IC_{50} เท่ากับ775.1 µg/ml (Anajwala *et al*., 2010)

4. ข้าวสาร (*Oryza sativa* L.)

การใช้ทางการแพทย์แผนไทย ข้าวสาร รสมันหอมหวาน บำรุงร่างกาย แก้ตาฟาง แก้เหน็บชา แช่น้ำตำเป็นแป้ง แก้บวม แก้ปวด ตำผสมกับน้ำสุราแก้ลมพิษผื่นคัน

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

ฤทธิ์ทางชีวภาพของข้าวสาร

- ฤทธิ์ต้านการอักเสบ

จากการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Shalini และคณะ (2011) ได้ศึกษาสารสกัดด้วยเมทานอลจาก *Oryza sativa* L. พบว่ามีฤทธิ์ต้านการอักเสบ ซึ่งสามารถยับยั้งการบวมบริเวณอุ้งเท้าหนูได้ โดยใช้วิธี carrageenan-induced rat paw edema และจากการศึกษาของ Kitisin และคณะ(2015) ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดจากข้าวสายพันธุ์ต่างๆ ได้แก่ ข้าวสังข์หยด ข้าวเหนียวดำ และข้าวหอมนิล โดยการทดสอบฤทธิ์ยับยั้ง pro-inflammatory cytokines (IL-6, TNF-alpha and NF-keppaB) ซึ่งทดสอบด้วยวิธี ELISA technique จากการเหนี่ยวนำด้วย lipopolysaccharide ใน human promyelocytic leukemia (HL-60) cell พบว่าสารสกัดจากข้าวสังข์หยดสามารถยับยั้ง TNF-alpha และ NF-kB ได้ดี และยังสามารถยับยั้งการสร้าง NOได้อีกด้วย

ความเป็นพิษ ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปอด (COR-L23) และเซลล์เนื้อเยื่อมนุษย์ (MRC5) พบว่า สารสกัดคลอโรฟอร์มจากข้าวมีค่า IC_{50} มากกว่า100 µg/ml (Uttama and Ittharat, 2010)

การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของยาสมานแผล

Chusri และคณะ (2012) ได้ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดด้วยเอทานอลจากตำรับยาสมานแผลต่อฤทธิ์ยับยั้งการสร้างและการทำลายไบโอฟิล์ม ที่สร้างจากเชื้อ*Staphylococcus epidermidis*ATCC 35984 พบว่าที่ความเข้มข้น 0.63-5.00 µg/ml สามารถลดการสร้างไบโอฟิล์มได้ประมาณ 30-40% และที่ความเข้มข้น 10 และ 20 µg/ml สามารถทำลาย 7-day-old staphylococcal biofilm ได้ 90% Chusri และคณะ (2013a) ได้ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดด้วยเอทานอลจากตำรับยาสมานแผลต่อการยับยั้งและการทำลายไบโอฟิล์ม ที่สร้างจากเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคที่ทำให้เกิดการบาดเจ็บของเนื้อเยื่อ และเป็นสาเหตุของการเกิดแผลบริเวณเท้าของผู้ป่วยเบาหวาน โดยใช้วิธี crystal violet assayพบว่าสารสกัดด้วยเอทานอลจากยาสมานแผลที่ความเข้มข้น 62.5-1000 µg/ml สามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มจากเชื้อ *P. aeruginosa* ATCC 10145 ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้พบว่าสารสกัดด้วยเอทานอลจากยาสมานแผลที่ความเข้มข้น 62.5 µg/ml สามารถทำลายไบโอฟิล์ม (old biofilm) ที่สร้างจากเชื้อ *P. aeruginosa* ATCC 10145 ได้ 97.3% หลังการให้สารทดสอบเป็นเวลา 24 ชม. Chusri และคณะ (2013b) ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดด้วยเอทานอลจากตำรับยาสมานแผล พบว่าสามารถยับยั้งการสร้าง NO ซึ่งเป็นสารสื่อกลางของการอักเสบจาก macrophages RAW 264.7 cells ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย lipopolysaccharide ได้ โดยมีค่า IC_{50}เท่ากับ 71.06 µg/mlและจากผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ พบว่าสามารถต้านอนุมูล DPPH และ hydroxyl radicalได้ดี โดยมีค่า IC_{50}เท่ากับ 19.24 และ 13.58µg/ml ตามลำดับ Chusri และคณะ (2014) ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดด้วยเอทานอลจากตำรับยาสมานแผล พบว่า มีค่า MIC ต่อเชื้อ methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) และ methicillin-susceptible *S. aureus* (MSSA) อยู่ในช่วง 3.9-7.8 µg/ml

4. วิธีการดำเนินการวิจัย

วิธีการเตรียมสารทดสอบ

ยาสมานแผล ประกอบด้วยพืชสมุนไพรจำนวน 4 ชนิด ได้แก่ เปลือกมังคุด (*Garcinia mangostana* L.) เหง้าขมิ้นชัน (*Curcuma longa* L.) เมล็ดหมาก (*Areca catechu* L.) และข้าวสาร (*Oryza sativa* L.) นำเปลือกมังคุด เหง้าขมิ้นชัน และเมล็ดหมาก ล้างทำความสะอาดแล้วหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ สำหรับการเตรียมสมุนไพรแห้งนำไปอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 วัน

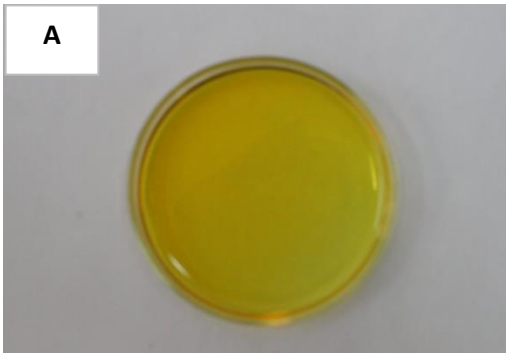
การเตรียมน้ำมันสกัดเปลือกมังคุดสดและน้ำมันสกัดเปลือกมังคุดแห้ง

ใช้เปลือกมังคุด 500 กรัม เคี่ยวกับน้ำมันมะพร้าวปริมาตร 1500 มิลลิลิตร โดยใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ทำการสกัดจนเปลือกมังคุดมีลักษณะแห้งกรอบ จากนั้นนำไปกรอง เก็บในขวดสีชา ที่อุณหภูมิห้อง

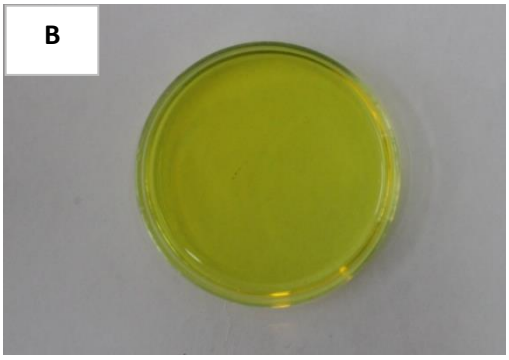
การเตรียมยาสมานแผลจากสมุนไพรสดและยาสมานแผลจากสมุนไพรแห้ง

ใช้สมุนไพรองค์ประกอบชนิดละ 125 กรัม รวม 500 กรัม เคี่ยวกับน้ำมันมะพร้าวปริมาตร 1500 มิลลิลิตร โดยใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ทำการสกัดจนสมุนไพรมีลักษณะแห้งกรอบ จากนั้นนำไปกรอง เก็บในขวดสีชา ที่อุณหภูมิห้อง (รูปที่ 5)

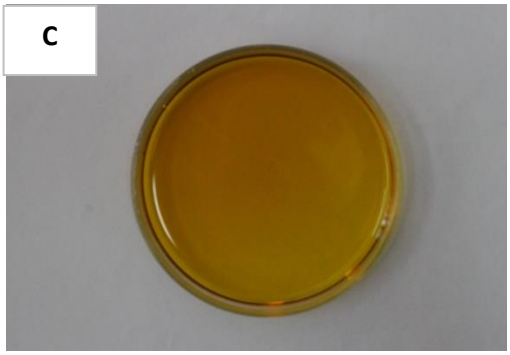
Garcinia mangostana L.



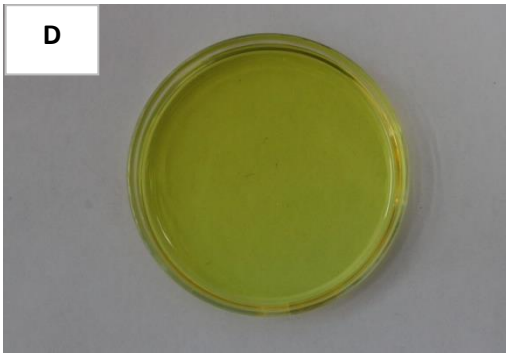
Curcuma longa L.



Areca catechu L.



Oryza sativa L.



รูปที่ 4.1 Medicinal components of Ya-Sa-Marn-Phlae and physical characteristics of Ya-Sa-Marn-Phlae made from dried herbs (A) and fresh herbs (B). Hot oil extractions prepared from dried *G. mangostana* pericarp (C) and fresh *G. mangostana* pericarp (D).

การทดสอบความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มโดยวิธี crystal violet assay

การเตรียมแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ

นำแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบเพาะเลี้ยงบน *TSA* บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง จากนั้นเลือก 3-5 โคโลนี เพาะเลี้ยงใน TSB ซึ่งมี 2% glucose (TSBGlc) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 18 ชั่วโมง ปรับความขุ่นให้ได้เท่ากับสารละลายแบเรียมซัลเฟต McFarland no. 0.5 (1.5×10^8 CFU/ml) แล้วเจือจางให้มีเชื้อประมาณ 1×10^6 CFU/ml ด้วย TSBGlc

การทดสอบความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์ม

เติมเชื้อแบคทีเรีย ลงใน 96-well polystyrene microtiter plate หลุมละ200 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1, 3, 5 และ 7 วัน ทำการเปลี่ยนอาหารทุกๆ 24 ชั่วโมง โดยการดูดอาหารเลี้ยงเชื้อและแบคทีเรียที่ไม่ยึดเกาะทิ้ง แล้วเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ TSBGlc หลุมละ 200 ไมโครลิตร

เมื่อครบกำหนดการบ่ม วัดค่าการเจริญเติบโตของแบคทีเรียโดยการวัดความขุ่นที่ค่าการดูดกลืนแสง 620 นาโมเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader จากนั้นวัดปริมาณการสร้างไบโอฟิล์มโดยการดูดเชื้อแบคทีเรียที่ไม่ยึดเกาะทิ้งและล้างไบโอฟิล์มด้วยสารละลาย PBS หลุมละ 200 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ย้อมสีไบโอฟิล์มด้วย 0.1% crystal violet หลุมละ 200 ไมโครลิตร ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที ล้างออกด้วยสารละลาย PBS ทิ้งไว้ให้แห้งเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติม DMSO หลุมละ 200 ไมโครลิตร เขย่าเบาๆ วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มโดยวิธี crystal violet assay (Chusri *et al*. 2013)

การเตรียมแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ

นำแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบเพาะเลี้ยงบน TSA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง จากนั้นเลือก 3-5 โคโลนี เพาะเลี้ยงใน TSBGlc บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 18 ชั่วโมง ปรับความขุ่นให้ได้เท่ากับสารละลายแบเรียมซัลเฟต McFarland no. 0.5 (1.5×10^8 CFU/ml) แล้วเจือจางให้มีเชื้อประมาณ 1×10^6 CFU/ml ด้วย TSBGlc

การเตรียมสารทดสอบ

เจือจางสารทดสอบแบบลำดับสอง (two-fold serial dilution) ให้มีความเข้มข้นตั้งแต่ 100-1.56% v/v ด้วย TSBGlc ซึ่งมี tween 80 ปริมาตร 0.5% v/v

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม

เติมสารทดสอบแต่ละความเข้มข้นลงใน 96-well polystyrene microtiter plate หลุมละ 100 ไมโครลิตร และเติมเชื้อแบคทีเรีย หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง

เมื่อครบกำหนดการบ่ม เทสารทดสอบและเชื้อแบคทีเรียที่ไม่ยึดเกาะทิ้ง ล้างไบโอฟิล์มด้วยสารละลาย PBS หลุมละ 200 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ย้อมสีไบโอฟิล์มด้วย 0.1% crystal violet หลุมละ 200 ไมโครลิตร ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที ล้างออกด้วยสารละลาย PBS และทิ้งไว้ให้แห้งเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติม

DMSO หลุมละ 200 ไมโครลิตร แล้วเขย่าเบาๆ วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง เปรียบเทียบกับชุดควบคุมบวกโดยใช้ TSBGlc ที่มี tween 80 ปริมาตร 0.5%v/v

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) และกล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม (AFM) (ดัดแปลงจาก Chusri *et al*. 2013)

1.1 การเตรียมแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ

นำแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบเพาะเลี้ยงบน TSA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง จากนั้นเลือก 3-5 โคโลนี เพาะเลี้ยงใน TSBGlc บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 18 ชั่วโมง ปรับความขุ่นให้ได้เท่ากับสารละลายแบเรียมซัลเฟต McFarland no. 0.5 (1.5×10^8 CFU/ml) แล้วเจือจางให้มีเชื้อประมาณ 1×10^6 CFU/ml ด้วย TSBGlc

1.2 การเตรียมตัวอย่าง

นำกระจกสไลด์ขนาด 1 ตารางเซนติเมตร ใส่ลงใน 24-well polystyrene plate เติมสารทดสอบที่ความเข้มข้น 100% หลุมละ 1000 ไมโครลิตร และเติมเชื้อแบคทีเรียจากข้อ 5.1 หลุมละ 1000 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง

เมื่อครบกำหนดการบ่ม ดูดสารทดสอบและแบคทีเรียที่ไม่ยึดเกาะทิ้ง ล้างไบโอฟิล์มด้วยสารละลาย PBS หลุมละ 2000 ไมโครลิตร จากนั้นคงสภาพตัวอย่างไบโอฟิล์มโดยเติม 2.5% glutaraldehyde ($C_5H_8O_2$) หลุมละ 1000 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ตามด้วยการขจัดน้ำออกจากตัวอย่างโดยใช้เอทานอลที่ความเข้มข้น 50%, 70%, 80%, 90% และ 100% โดยเติมลงในแต่ละหลุม เป็นเวลา 15 นาทีในทุกๆ ความเข้มข้น ยกเว้นที่ความเข้มข้น 100% ใช้เวลา 30 นาที แต่ละความเข้มข้นทำซ้ำ 2 ครั้ง

1.3 การทดสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (SEM)

นำตัวอย่างส่งศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ เพื่อผ่านกระบวนการทำให้แห้งด้วยวิธี critical point drying และทดสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ SEM กำลังขยาย 2500 เท่า ในรูปแบบภาพ 2 มิติ

1.4 การทดสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม (AFM)

นำตัวอย่างส่งศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ เพื่อผ่านกระบวนการทำให้แห้งด้วยวิธี critical point drying หลังจากนั้นนำตัวอย่างส่งสถานวิจัยความเป็นเลิศด้านนาโนเทคโนโลยีเพื่อการพลังงาน ภาควิชาฟิสิกส์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ เพื่อทดสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ AFM กำลังขยาย 5 ตารางไมโครเมตร ในรูปแบบภาพสามมิติ

การทดสอบฤทธิ์ทำลายไบโอฟิล์มโดยวิธี MTT reduction assay (Chusri *et al*. 2012)

1.5 การเตรียมแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ

นำแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบเพาะเลี้ยงบน TSA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง จากนั้นเลือก 3-5 โคโลนี เพาะเลี้ยงใน TSBGlc บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 18 ชั่วโมง จากนั้นเจือจางเชื้อในอัตราส่วน 1:200 ให้มีเชื้อประมาณ 1×10^6 CFU/ml ด้วย TSBGlc

1.6 การทดสอบฤทธิ์ทำลายไบโอฟิล์ม

เติมเชื้อแบคทีเรียจากข้อ 6.1 ลงใน 96-well polystyrene microtiter plate หลุมละ 200 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เปลี่ยนอาหารทุกๆ 24 ชั่วโมง จนครบเวลาที่ไบโอฟิล์มอยู่ในระยะการเจริญเติบโตโดยสมบูรณ์ตามผลที่ได้จากการทดสอบความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์ม จากนั้นดูดเชื้อแบคทีเรียที่ไม่ยึดเกาะทิ้ง และเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ TSBGlc หลุมละ 200 ไมโครลิตร

เมื่อครบกำหนดการบ่ม ดูดเชื้อแบคทีเรียส่วนที่ไม่ยึดเกาะทิ้งและล้างไบโอฟิล์มด้วยสารละลาย PBS หลุมละ 200 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารทดสอบที่ความเข้มข้น 100% หลุมละ 200 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 3, 6, 9 และ 18 ชั่วโมง

เมื่อครบกำหนดการทดสอบ ดูดสารทดสอบทิ้งแล้วล้างด้วยสารละลาย PBS หลุมละ 250 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ย้อมสีไบโอฟิล์มด้วย MTT โดยการเติม TSBGlc หลุมละ 180 ไมโครลิตร ตามด้วย MTT ที่ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หลุมละ 20 ไมโครลิตร บ่มในที่มืด ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วยสารละลาย PBS หลุมละ 250 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วเติม DMSO หลุมละ 200 ไมโครลิตร เพื่อละลายตะกอน MTT formazan แล้วเขย่าเบาๆ วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง เปรียบเทียบกับชุดควบคุมบวกและชุดควบคุมลบซึ่งทดสอบสารละลาย PBS และสารองค์ประกอบทางเคมี alpha-mangostin ตามลำดับ

การทดสอบฤทธิ์ทำลายไบโอฟิล์มด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบคอนโฟคอลชนิดที่ใช้เลเซอร์ในการสแกน (CLSM) (ดัดแปลงจาก Product Information *of LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit*)

1.7 การเตรียมแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ

นำแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบเพาะเลี้ยงบน TSA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง จากนั้นเลือก 3-5 โคโลนี เพาะเลี้ยงใน TSBGlc บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 18 ชั่วโมง จากนั้นเจือจางเชื้อในอัตราส่วน 1:200 ให้มีเชื้อประมาณ 1×10^6 CFU/ml ด้วย TSBGlc

1.8 การทดสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ CLSM

นำกระจกสไลด์ขนาด 1 ตารางเซนติเมตร ใส่ลงใน 24-well polystyrene *plate* เติมเชื้อแบคทีเรียจากข้อ 7.1 หลุมละ 1000 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ซึ่งทำการเปลี่ยนอาหารทุกๆ 24 ชั่วโมง จนครบเวลาที่ไบโอฟิล์มอยู่ในระยะการเจริญเติบโตโดยสมบูรณ์ตามผลที่ได้จากการทดสอบความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์ม

เมื่อครบกำหนดการบ่ม ดูดเชื้อแบคทีเรียที่ไม่ยึดเกาะทิ้งและล้างไบโอฟิล์มด้วยสารละลาย PBS จากนั้นเติมสารทดสอบที่ความเข้มข้น 100% หลุมละ 1000 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 3, 6, 9 และ 18 ชั่วโมง

เมื่อครบกำหนดการทดสอบ ดูดสารทดสอบทิ้งแล้วล้างด้วยเฮกเซน *ย้อมสีไบโอฟิล์มด้วยชุดทดสอบ LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit ซึ่งประกอบด้วยสีฟลูออเรสเซนต์ syto9 และ propidium iodide* บ่มในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นทดสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ CLSM และวิเคราะห์ Z-stack ได้แก่ มวลชีวภาพ

(biomass) ความหนาเฉลี่ย (average thickness) ความหนาสูงสุด (maximum thickness) และอัตราส่วนพื้นที่ผิวต่อปริมาตร (surface to volume ratio) *โดยใช้โปรแกรม Comstat* ทดสอบเปรียบเทียบกับชุดควบคุมบวกซึ่งทดสอบด้วยสารละลาย PBS

การทดสอบการก่อความระคายเคืองผิวหนังกระต่าย

การทดสอบการก่อความระคายเคืองผิวหนังกระต่ายของยาสมานแผลในรูปแบบยาน้ำมัน อ้างอิงวิธีการทดสอบหมายเลข 404 : การทดสอบการก่อความระคายเคืองต่อผิวหนังของ OECD Guidelines for Testing of Chemicals (2002)

การเตรียมสัตว์ทดลอง ในการทดลองใช้กระต่ายสีขาวพันธุ์ New Zealand White ทั้งสองเพศ ซื้อจากภาควิชาสัตวบาล คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม น้ำหนักตัวประมาณ 2-3 กิโลกรัม โดยนำกระต่าย 3 ตัว (ต่อ 1 ตัวอย่างทดสอบ) มาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการก่อนการทดสอบ 1 สัปดาห์ เพื่อให้สัตว์ทดลองปรับความคุ้นเคยกับสถานที่ โดยกระต่ายจะได้รับน้ำและอาหารตามปกติและก่อนทำการทดสอบ 1 วัน กระต่ายทุกตัวจะถูกโดนขนบริเวณลำตัวใต้หัวไหล่ชิดกระดูกสันหลังทั้งสองข้างเป็นบริเวณ 10 x 10 เซนติเมตร ด้วยปัตตาเลี่ยนไฟฟ้าโดยระมัดระวังไม่ให้ผิวหนังเกิดแผล

วิธีการทดสอบ เริ่มทำการทดสอบโดยดูดยาน้ำมันสมานแผลปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เกลี่ยลงบนผ้าพันแผลมาตรฐานขนาด 2.5 x 2.5 เซนติเมตร ทบซ้อนกัน 10 ชั้น ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยวิธีนึ่งอบโดยใช้แรงดันไอน้ำ (patch) และนำมาปิดลงบนผิวหนังหลังกระต่ายด้านหนึ่งที่โกนขนเตรียมไว้ (บริเวณทดสอบ) ส่วนบริเวณหลังอีกด้านหนึ่งของกระต่ายตัวเดิมปิดด้วย patch ที่เกลี่ยด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร (บริเวณควบคุม) ยึด patch ด้วยพลาสเตอร์ชนิด Transpore และห่อลำตัวกระต่ายด้วยผ้ายืด เพื่อยึด patch ติดกับผิวหนังไม่ให้เคลื่อนหลุด เมื่อครบ 4 ชั่วโมง เปิด patch ออก แล้วใช้สำลีชุบน้ำอุ่นเช็ดเบาๆ เพื่อให้ตัวอย่างทดสอบที่เหลือค้างอยู่บนผิวหนังหลุดออก ตรวจดูอาการแดงและบวมตรงบริเวณทดสอบ ที่เวลา 1, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง และหากพบว่ายังมีอาการแดงและบวมอยู่ให้ตรวจดูอาการจนถึงวันที่ 14 โดยการให้คะแนนยึดตามหลักเกณฑ์ดังนี้ หลักเกณฑ์การให้คะแนน

อาการแดง	คะแนน
ไม่แดง	0
แดงเล็กน้อยแทบสังเกตไม่ได้	1
แดงจนมองเห็นได้ชัด	2
แดงปานกลางถึงแดงมาก	3
แดงช้ำถึงผิวหนังตกสะเก็ด	4
อาการบวม	**คะแนน**
ไม่บวม	0
บวมเล็กน้อยแทบสังเกตไม่ได้	1
บวมน้อย (ขอบนูนเห็นได้ชัดเจน)	2
บวมปานกลาง (นูนขึ้นมา 1 มิลลิเมตร)	3
บวมมาก(นูนขึ้นมา 1 มิลลิเมตร และลามออกไป)	4

การศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบในสัตว์ทดลอง (*in vivo* anti-inflammatory activity)

การศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบของยาสมานแผลในรูปแบบยาน้ำมันโดยใช้วิธี Carrageenan-induced rat paw edema

การเตรียมสาร เตรียมยาสมานแผลให้อยู่ในรูปแบบยาน้ำมัน โดยใช้เปลือกมังคุด 62.5 กรัม ขมิ้นชัน 62.5 กรัม หมาก 62.5 กรัม และข้าวสาร 62.5 กรัม เคี่ยวใน virgin coconut oil 1500 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ซึ่งจะได้ยาสมานแผลในรูปแบบ hot oil extract และเตรียม 5% (w/v) phenylbutazone ใน base oil (virgin coconut oil)

การทดสอบ ก่อนการทดลองอดอาหารหนูเป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นแบ่งหนูออกเป็น 3 กลุ่มๆ ละ 15 ตัว ดังนี้

- กลุ่ม Control ได้รับ base oil
- กลุ่ม Standard drug ได้รับ 5% (w/v) phenylbutazone ใน base oil
- กลุ่ม Treated ได้รับยาสมานแผลในรูปแบบยาน้ำมัน

วัดความหนาของอุ้งเท้าของหนูทุกตัวก่อนการทดสอบด้วยเครื่อง pocket thickness gauge และจดบันทึกค่าที่ได้ (baseline) จากนั้นทาสารทดสอบบริเวณอุ้งเท้าหนู ตัวละ 0.2 กรัม กับหนูในแต่ละกลุ่ม หลังจากให้สารทดสอบในแต่ละกลุ่ม 1 ชั่วโมง ฉีด carrageenan 1% (w/v) ที่อุ้งเท้าด้านหลัง (hindpaw) ของหนู

การวัดผลการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบของยาสมานแผลในรูปแบบยาเตรียม

วัดความหนาของอุ้งเท้าหนู โดยวัดที่ 1, 2 และ 3 ชั่วโมงหลังจากฉีด carrageenan ด้วยเครื่อง pocket thickness gauge จากนั้นนำค่าที่ได้มาคำนวณหา %ยับยั้งการอักเสบ เก็บตัวอย่างอุ้งเท้าหนูเพื่อนำไปศึกษากลไกการต้านการอักเสบ หลังจากเสร็จการทดลอง เก็บตัวอย่างอุ้งเท้าหนู โดยทำให้หนูจากไปอย่างสงบด้วยคาร์บอนไดออกไซด์ จากนั้น ตัดเนื้อเยื่อบริเวณอุ้งเท้าหนูข้างที่ได้รับสารทดสอบ แช่ในไนโตรเจนเหลว และเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ทันที เพื่อนำไปศึกษากลไกการต้านการอักเสบต่อไป

การตรวจวิเคราะห์ปริมาณของ malondialdehyde (MDA) ในเนื้อเยื่ออักเสบ โดยใช้ MDA assay kit

การเตรียมตัวอย่าง นำเนื้อเยื่ออุ้งเท้าเติม 0.86% normal saline solution ในอัตราส่วน 1:9 w/v นำไปปั่นให้เป็นเนื้อเดียวกัน เพื่อให้ได้ตัวอย่างแบบ tissue homogenate จากนั้นนำไป centrifuge ที่ความเร็วรอบ 3,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที และดูดส่วนของ supernatant เพื่อใช้ทำการทดลองต่อไป

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

การคำนวณผลการทดลอง โดยใช้สูตร ดังนี้

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

โดยที่ nmol/gprot คือ nanomole per gram protein

การตรวจวิเคราะห์ปริมาณของ nitric oxide (NO) ในเนื้อเยื่ออักเสบ โดยใช้ NO assay kit

การเตรียมตัวอย่าง นำเนื้อเยื่ออุ้งเท้าผสมกับ 0.86% normal saline solution ในอัตราส่วน 1:9 w/v จากนั้นนำไปปั่นให้เป็นเนื้อเดียวกัน เพื่อให้ได้ตัวอย่างแบบ tissue homogenate จากนั้นนำไป centrifuge ที่ความเร็วรอบ 2,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที และดูดส่วนของ supernatant เพื่อใช้ทำการทดลองต่อไป

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

การคำนวณผลการทดลอง โดยใช้สูตร ดังนี้

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

โดยที่ μmol/gprot คือ micromole per gram protein

การตรวจวิเคราะห์ปริมาณของ myeloperoxidase (MPO) ในเนื้อเยื่ออักเสบ โดยใช้ MPO assay kit

การเตรียมตัวอย่าง นำเนื้อเยื่ออุ้งเท้าผสมกับ 0.86% normal saline solution ในอัตราส่วน 1:9 w/v จากนั้นนำไปปั่นให้เป็นเนื้อเดียวกัน เพื่อให้ได้ตัวอย่างแบบ tissue homogenate ซึ่งจะมีความเข้มข้นเท่ากับ 10% tissue homogenate จากนั้นเจือจางให้ได้ความเข้มข้น เท่ากับ 5% tissue homogenate (sample) ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่จะใช้ทำการทดลองต่อไป

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

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

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

โดยที่

11.3 คือ อินเวอร์สการคูณหรือตัวผกผันการคูณของอัตราความชัน (multiplicative inverse of slope rate)

sample weight (g) = 0.05 g/ml x 0.1 ml

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

0.1 ml คือ ปริมาตรของตัวอย่างที่เติมลงใน sample tube และ contrast tube

การตรวจวิเคราะห์ปริมาณของ tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) ในเนื้อเยื่ออักเสบ โดยใช้ enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit

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

การเตรียม reagent

เตรียม rat TNF-alpha standard จากความเข้มข้นแรก 1,280 ng/L จากนั้นเจือจางแบบ 2-fold serial dilutions ด้วย standard diluent ให้ได้ความเข้มข้นในช่วง 40-1,280 ng/L เตรียม biotinylated Ab detection diluent โดยผสม biotinylated Ab เข้ากับ biotinylated diluent

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

เตรียม wash buffer โดยใช้ double distilled water 450 มิลลิลิตร ผสมกับ concentrated wash solution 20 มิลลิลิตรการทดสอบ ดูด standard และ sample 50 ไมโครลิตร ลงใน well และเติม biotinylated Ab detection diluent 50 ไมโครลิตร จากนั้นปิด well plate และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ล้าง plate ด้วย wash buffer จำนวน 5 ครั้ง และเติม HRP conjugate diluent 50 ไมโครลิตร ในแต่ละ well และบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ล้าง plate ด้วย wash buffer จำนวน 5 ครั้ง เติม chromogenic solution A 50 ไมโครลิตร และ chromogenic solution B 50 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ในที่มืด หลังจากนั้นเติม stop solution 50 µL และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (optical density; OD) ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ภายใน 10 นาที หลังจากการเติม stop solution นำค่า OD ที่ได้สร้าง standard curve แบบ logistic curve (4 parameters) จากนั้นคำนวณหาปริมาณของ TNF-alpha ในตัวอย่างจากสมการของ standard curve

การตรวจวิเคราะห์ปริมาณของ Interleukin-1beta (IL-1beta) ในเนื้อเยื่ออักเสบ โดยใช้ enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit

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

การเตรียม reagent

เตรียม rat IL-1beta standard จากความเข้มข้นแรก 240 ng/L จากนั้นเจือจางแบบ 2-fold serial dilutions ด้วย standard diluent ให้ได้ความเข้มข้นในช่วง 7.5-240 ng/L เตรียม biotinylated Ab detection diluent โดยผสม biotinylated Ab เข้ากับ biotinylated diluent

เตรียม HRP conjugate diluent โดยใช้ concentrated HRP conjugate ผสมกับ HRP conjugate diluent เตรียม wash buffer โดยใช้ double distilled water 450 มิลลิลิตร ผสมกับ concentrated wash solution 20 มิลลิลิตร การทดสอบ ดูด standard และ sample 50 ไมโครลิตร ลงใน well และเติม biotinylated Ab detection diluent 50 ไมโครลิตร จากนั้นปิด well plate และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ล้าง plate ด้วย wash buffer จำนวน 5 ครั้ง และเติม HRP conjugate diluent 50 ไมโครลิตร ในแต่ละ well และบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ล้าง plate ด้วย wash buffer จำนวน 5 ครั้ง เติม chromogenic solution A 50 ไมโครลิตร และ chromogenic solution B 50 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ในที่มืด หลังจากนั้นเติม stop solution 50 ไมโครลิตร และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (optical density; OD) ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ภายใน 10 นาที

หลังจากการเติม stop solution นำค่า OD ที่ได้สร้าง standard curve แบบ logistic curve (4 parameters) จากนั้นคำนวณหาปริมาณของ IL-1beta ในตัวอย่างจากสมการของ standard curve

การตรวจวิเคราะห์ปริมาณของ inducible nitric oxide synthase (iNOS) ในเนื้อเยื่ออักเสบ โดยใช้ enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit

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

การเตรียม reagent

เตรียม rat iNOS standard จากความเข้มข้นแรก 24 ng/mL จากนั้นเจือจางแบบ 2-fold serial dilutions ด้วย standard diluent ให้ได้ความเข้มข้นในช่วง 0.75-24 ng/mL เตรียม biotinylated Ab detection diluent โดยผสม biotinylated Ab เข้ากับ biotinylated diluent เตรียม HRP conjugate diluent โดยใช้ concentrated HRP conjugate ผสมกับ HRP conjugate diluent เตรียม wash buffer โดยใช้ double distilled water 450 มิลลิลิตร ผสมกับ concentrated wash solution 20 มิลลิลิตร การทดสอบ ดูด standard และ sample 50 ไมโครลิตร ลงใน well และเติม biotinylated Ab detection diluent 50 ไมโครลิตร จากนั้นปิด well plate และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ล้าง plate ด้วย wash buffer จำนวน 5 ครั้ง และเติม HRP conjugate diluent 50 ไมโครลิตร ในแต่ละ well และบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ล้าง plate ด้วย wash buffer จำนวน 5 ครั้ง เติม chromogenic solution A 50 ไมโครลิตร และ chromogenic solution B 50 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ในที่มืด หลังจากนั้นเติม stop solution 50 ไมโครลิตร และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (optical density; OD) ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ภายใน 10 นาทีหลังจากการเติม stop solution นำค่า OD ที่ได้สร้าง standard curve แบบ logistic curve (4 parameters) จากนั้นคำนวณหาปริมาณของ iNOS ในตัวอย่างจากสมการของ standard curve

การตรวจวิเคราะห์ปริมาณของ cyclooxygenase-2 (COX-2) ในเนื้อเยื่ออักเสบ โดยใช้ enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit

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

การเตรียม reagent

เตรียม rat COX-2 standard จากความเข้มข้นแรก 64 ng/mL จากนั้นเจือจางแบบ 2-fold serial dilutions ด้วย standard diluent ให้ได้ความเข้มข้นในช่วง 2-64 ng/mL เตรียม biotinylated Ab detection diluent โดยผสม biotinylated Ab เข้ากับ biotinylated diluent

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

เตรียม wash buffer โดยใช้ double distilled water 450 มิลลิลิตร ผสมกับ concentrated wash solution 20 มิลลิลิตร การทดสอบ ดูด standard และ sample 50 ไมโครลิตร ลงใน well และเติม biotinylated Ab detection diluent 50 ไมโครลิตร จากนั้นปิด well plate และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ล้าง plate ด้วย wash buffer จำนวน 5 ครั้ง และเติม HRP conjugate diluent 50 ไมโครลิตร ในแต่ละ well และบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ล้าง plate ด้วย wash buffer จำนวน 5 ครั้ง เติม chromogenic solution A 50 ไมโครลิตร และ chromogenic solution B 50 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ในที่มืด หลังจากนั้น

เติม stop solution 50 ไมโครลิตร และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (optical density; OD) ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ภายใน 10 นาทีหลังจากการเติม stop solution นำค่า OD ที่ได้สร้าง standard curve แบบ logistic curve (4 parameters) จากนั้นคำนวณหาปริมาณของ COX-2 ในตัวอย่างจากสมการของ standard curve

การศึกษาทางจุลกายวิภาคของเนื้อเยื่ออักเสบ (Histological study)

การเตรียมตัวอย่าง เก็บตัวอย่างเนื้อเยื่ออักเสบใน 10% neutral buffered formalin เพื่อคงสภาพของเนื้อเยื่อ จากนั้น dehydration ด้วย alcohol จากความเข้มข้นต่ำไปหาความเข้มข้นสูง และตรึงเนื้อเยื่อใน paraffin จากนั้นตัดเนื้อเยื่อให้มีความหนา 5 µm ย้อมด้วย H&E staining และดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง ที่กำลังขยาย 10X, 20X และ 40X เพื่อดูความแตกต่างของแต่ละ section

การศึกษาฤทธิ์ต่อการหายของแผลในสัตว์ทดลอง (*in vivo* wound healing activity)

สัตว์ทดลอง

สัตว์ทดลองที่ใช้ คือ หนูขาวเพศผู้ สายพันธุ์ Wistar rat อายุประมาณ 2 เดือน น้ำหนัก 180-200 กรัม การปฏิบัติกับสัตว์ทดลองได้รับการอนุมัติให้ทำการทดลองโดยคณะกรรมการจริยธรรมการใช้สัตว์ทดลองของสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ก่อนการทดลองนำหนูทดลองปรับตัวให้เข้ากับสภาพของห้องทดลองเป็นเวลา 1 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ 22±2 องศาเซลเซียส มีระดับความชื้นสัมพัทธ์ 70% มีการควบการปิด-เปิดไฟ 12:12 ชั่วโมง

การศึกษาฤทธิ์ต่อการหายของแผลของยาสมานแผลในรูปแบบยาน้ำมันโดยใช้วิธี excision wound model ในหนูปกติ (Freitas *et al*., 2017)

1) การเตรียมสาร เตรียมยาสมานแผลให้อยู่ในรูปแบบยาน้ำมัน โดยใช้เปลือกมังคุด 62.5 กรัม ขมิ้นชัน 62.5 กรัม หมาก 62.5 กรัม และข้าวสาร 62.5 กรัม เคี่ยวใน virgin coconut oil 1500 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ซึ่งจะได้ยาสมานแผลในรูปแบบ hot oil extract

2) การทดสอบ ก่อนการทดสอบ 1 วัน โกนขนบริเวณหลังของหนูทุกตัวขนาดพื้นที่ประมาณ 4×4 ตารางเซนติเมตร จากนั้นแบ่งหนูออกเป็น 3 กลุ่มๆ ละ 10 ตัว ดังนี้

- กลุ่ม Control ได้รับ base oil
- กลุ่ม Positive control ได้รับยาน้ำมันทองนพคุณ
- กลุ่ม Treated ได้รับยาสมานแผลในรูปแบบยาน้ำมัน

การทำให้เกิดแผลเปิด (excision wound) หนูทุกกลุ่มถูกทำให้สลบโดยฉีด pentobarbital เข้าทางช่องท้องขนาด 45 mg/kg จากนั้นทำให้เกิดแผลแบบ excision ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร และแผลลึก 1 มิลลิเมตร โดยใช้ biopsy punch บริเวณหลังของหนูขาว (thoracolumbar region) ล้างแผลด้วยน้ำเกลือ จากนั้นทาสารทดสอบแผลละ 50 ไมโครลิตร ตามกลุ่มที่แบ่งไว้ หลังจากนั้นทำแผลและทาสารทดสอบใหม่วันเว้นวันจนแผลหายสนิท

3) การวัดผลการทดสอบฤทธิ์ต่อการหายของแผล วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของแผลโดยใช้ digital vernier caliper บันทึกผลวันเว้นวัน จนแผลหายสนิท จากนั้นคำนวณเป็นพื้นที่ของแผล และคิดเป็น % การปิดของแผล (% wound closure)

4) เก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อปกติและเนื้อเยื่อแผลในวันที่ 7 และ 11 หลังการรักษา โดย sacrifice หนูด้วย CO_2 จากนั้นตัดชั้นผิวหนังบริเวณที่ทำให้เกิดแผลออกจากตัวหนูขาว ล้างเนื้อเยื่อด้วย PBS แช่เพื่อรักษาสภาพของเนื้อเยื่อในไนโตรเจนเหลว และเก็บที่อุณหภูมิ -80 °C เพื่อศึกษากลไกต่อการหายของแผลต่อไป

การตรวจวิเคราะห์ปริมาณของ transforming growth factor beta1 (TGF-beta1) ในเนื้อเยื่อแผล โดยใช้ enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit

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

การเตรียม reagent

เตรียม rat TGF-beta1 standard จากความเข้มข้นแรก 3,200 ng/L จากนั้นเจือจางแบบ 2-fold serial dilutions ด้วย standard diluent ให้ได้ความเข้มข้นในช่วง 200-3,200 ng/L เตรียม biotinylated Ab detection diluent โดยผสม biotinylated Ab เข้ากับ biotinylated diluent เตรียม HRP conjugate diluent โดยใช้ concentrated HRP conjugate ผสมกับ HRP conjugate diluent เตรียม wash buffer โดยใช้ double distilled water 480 มิลลิลิตร ผสมกับ concentrated wash solution 20 มิลลิลิตร

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

การตรวจวิเคราะห์ปริมาณของ vascular endothelial growth factor (VEGF) ในเนื้อเยื่อแผล โดยใช้ enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit

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

การเตรียม reagent

เตรียม rat VEGF standard จากความเข้มข้นแรก 1,600 ng/L จากนั้นเจือจางแบบ 2-fold serial dilutions ด้วย standard diluent ให้ได้ความเข้มข้นในช่วง 50-1,600 ng/L เตรียม biotinylated Ab detection diluent โดยผสม biotinylated Ab เข้ากับ biotinylated diluent เตรียม HRP conjugate diluent โดยใช้ concentrated HRP conjugate ผสมกับ HRP conjugate diluent เตรียม wash buffer โดยใช้ double distilled water 480 มิลลิลิตร ผสมกับ concentrated wash solution 20 มิลลิลิตร

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

10 นาทีหลังจากการเติม stop solution นำค่า OD ที่ได้สร้าง standard curve แบบ logistic curve (4 parameters) จากนั้นคำนวณหาปริมาณของ VEGF ในตัวอย่างจากสมการของ standard curve

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

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

การเตรียม reagent

เตรียม rat collagen type I standard จากความเข้มข้นแรก 960 ng/mL จากนั้นเจือจางแบบ 2-fold serial dilutions ด้วย standard diluent ให้ได้ความเข้มข้นในช่วง 30-960 ng/mL เตรียม biotinylated Ab detection diluent โดยผสม biotinylated Ab เข้ากับ biotinylated diluent เตรียม HRP conjugate diluent โดยใช้ concentrated HRP conjugate ผสมกับ HRP conjugate diluent เตรียม wash buffer โดยใช้ double distilled water 480 มิลลิลิตร ผสมกับ concentrated wash solution 20 มิลลิลิต การทดสอบ ดูด standard และ sample 50 ไมโครลิตร ลงใน well และเติม biotinylated Ab detection diluent 50 ไมโครลิตร จากนั้นปิด well plate และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ล้าง plate ด้วย wash buffer จำนวน 5 ครั้ง และเติม HRP conjugate diluent 50 ไมโครลิตร ในแต่ละ well และบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ล้าง plate ด้วย wash buffer จำนวน 5 ครั้ง เติม chromogenic solution A 50 ไมโครลิตร และ chromogenic solution B 50 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ในที่มืด หลังจากนั้นเติม stop solution 50 ไมโครลิตร และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (optical density; OD) ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ภายใน 10 นาทีหลังจากการเติม stop solution นำค่า OD ที่ได้สร้าง standard curve แบบ logistic curve (4 parameters) จากนั้นคำนวณหาปริมาณของ collagen type I ในตัวอย่างจากสมการของ standard curve

การตรวจวิเคราะห์ปริมาณของ collagen type III ในเนื้อเยื่ออักเสบ โดยใช้ enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit

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

การเตรียม reagent

เตรียม rat collagen type III standard จากความเข้มข้นแรก 800 ng/mL จากนั้นเจือจางแบบ 2-fold serial dilutions ด้วย standard diluent ให้ได้ความเข้มข้นในช่วง 25-800 ng/mL เตรียม biotinylated Ab detection diluent โดยผสม biotinylated Ab เข้ากับ biotinylated diluent

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

เตรียม wash buffer โดยใช้ double distilled water 480 มิลลิลิตร ผสมกับ concentrated wash solution 20 มิลลิลิตร การทดสอบ ดูด standard และ sample 50 ไมโครลิตร ลงใน well และเติม biotinylated Ab detection diluent 50 ไมโครลิตร จากนั้นปิด well plate และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ล้าง plate ด้วย wash buffer จำนวน 5 ครั้ง และเติม HRP conjugate diluent 50 ไมโครลิตร ในแต่ละ well และบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ล้าง plate ด้วย wash buffer จำนวน 5 ครั้ง เติม chromogenic solution A 50 ไมโครลิตร และ chromogenic solution B 50 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ในที่มืด หลังจากนั้น

เติม stop solution 50 ไมโครลิตร และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (optical density; OD) ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ภายใน 10 นาทีหลังจากการเติม stop solution นำค่า OD ที่ได้สร้าง standard curve แบบ logistic curve (4 parameters) จากนั้นคำนวณหาปริมาณของ collagen type III ในตัวอย่างจากสมการของ standard curve

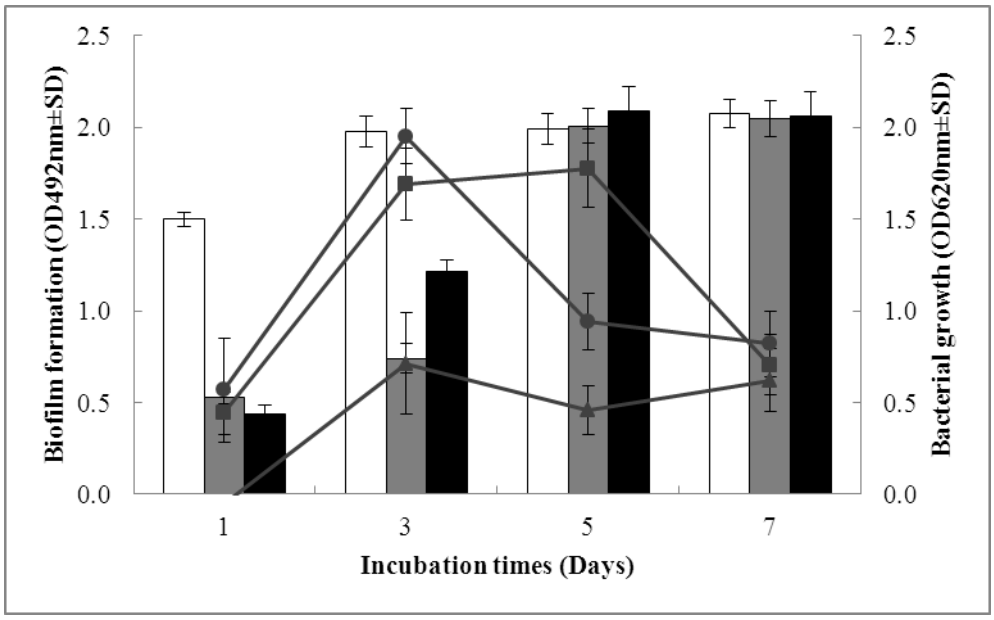
การศึกษาทางจุลกายวิภาคของเนื้อเยื่ออักเสบ (Histological study)

การเตรียมตัวอย่าง เก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อแผลหลังจากการทดลองในวันที่ 7 และ 11 ใน 10% neutral buffered formalin เพื่อคงสภาพของเนื้อเยื่อ จากนั้น dehydration ด้วย alcohol จากความเข้มข้นต่ำไปหาความเข้มข้นสูง และตรึงเนื้อเยื่อใน paraffin จากนั้นตัดเนื้อเยื่อให้มีความหนา 5 µm ย้อมด้วย H&E staining และดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง ที่กำลังขยาย 10X, 20X และ 40X เพื่อดูความแตกต่างของแต่ละ section

5. ผลการทดลอง

ผลการทดสอบความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์ม โดยวิธี crystal violet assay

ผลการทดสอบความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มที่เวลา 1, 3, 5 และ 7 วัน ของ *P. aeruginosa* ATCC10145 และ *S. epidermidis* ATCC35984 พบว่าเกิดการพัฒนาไบโอฟิล์มอย่างต่อเนื่องเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ที่ไม่สร้างไบโอฟิล์ม *S. epidermidis* ATCC12228 จนกระทั่งเข้าสู่ระยะเจริญเติบโตโดยสมบูรณ์ ซึ่ง *P. aeruginosa* ATCC10145 และ *S. epidermidis* ATCC35984 ใช้เวลาในการพัฒนาไบโอฟิล์มเพื่อเข้าสู่ระยะดังกล่าว 3 และ 3-5 วัน ตามลำดับ หลังจากนั้นไบโอฟิล์มจะเข้าสู่ระยะแพร่กระจายเป็นระยะสุดท้ายของวงจรการเกิดไบโอฟิล์ม **(รูปที่ 5.1)**



รูปที่ 5.1 Biofilm development (linear charts) of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC10145 (●), *Staphylococcus epidermidis* ATCC35984 (■) and *Staphylococcus epidermidis* ATCC12228 (▲). Bacterial growth (bar charts) of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC10145 (white bars), *Staphylococcus epidermidis* ATCC35984 (grey bars) and *Staphylococcus epidermidis* ATCC12228 (black bars). Each symbol indicates the means±SD for three independent experiments performed in duplicate.

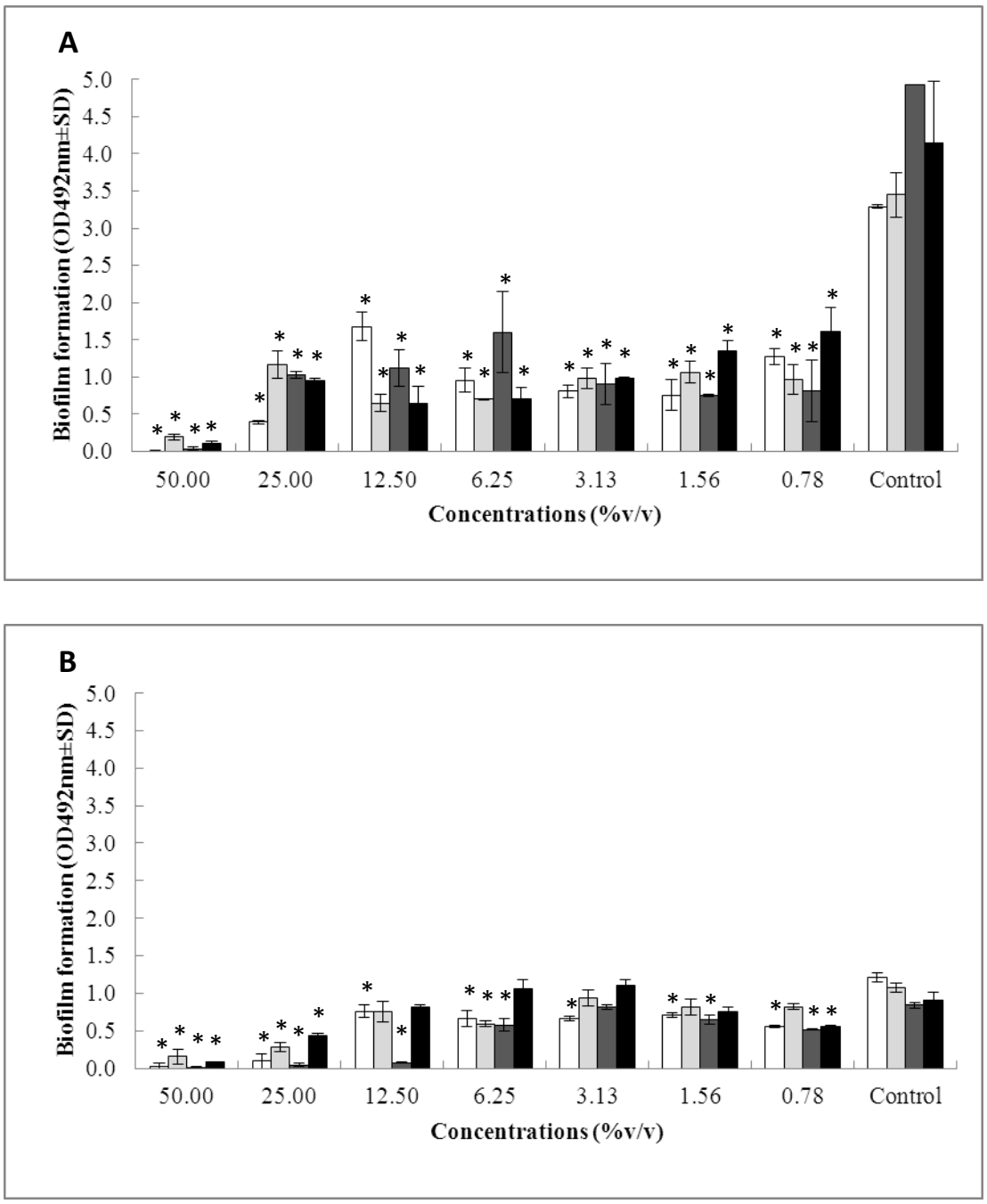
ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม

ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม โดยวิธี crystal violet assay

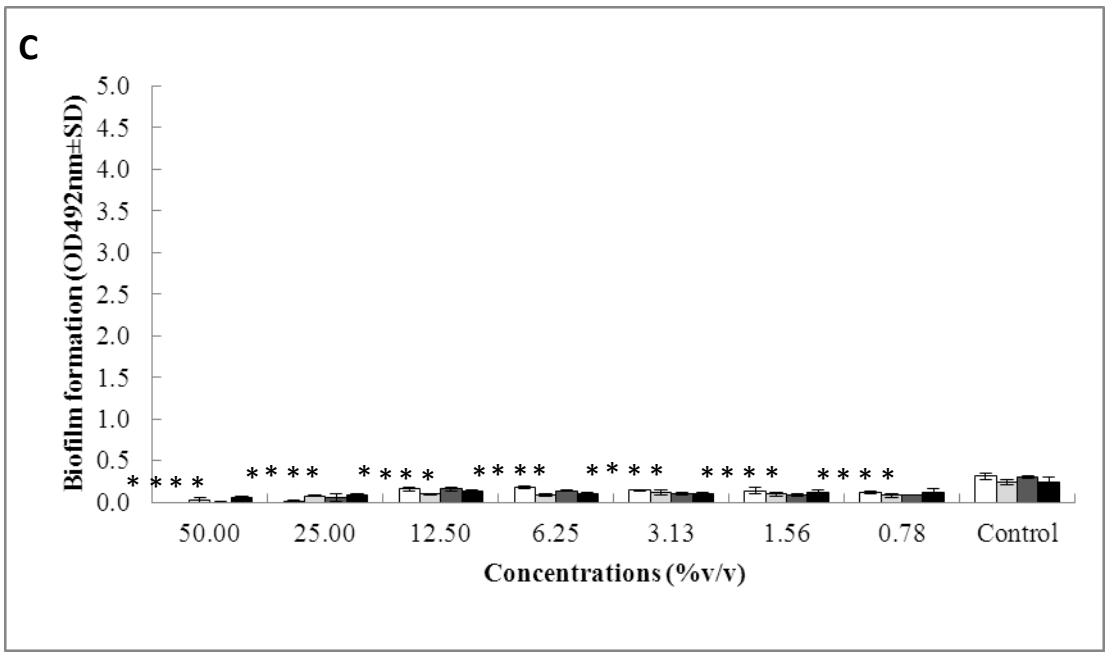
ผลการทดสอบยาสมานแผลเตรียมจากสมุนไพรแห้ง ยาสมานแผลเตรียมจากสมุนไพรสด น้ำมันสกัดเปลือกมังคุดแห้ง และน้ำมันสกัดเปลือกมังคุดสดต่อการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของ *P. aeruginosa* ATCC10145, *S. epidermidis* ATCC35984 และ *S. epidermidis* ATCC12228 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สามารถแสดงผลการทดลองได้ดังนี้

ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของ *P. aeruginosa* ATCC 10145 พบว่าสารทดสอบทั้ง 4 ชนิด ที่ความเข้มข้น 0.78-50 %v/v มีประสิทธิภาพยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของ *P. aeruginosa* ATCC10145 ได้แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p<0.05$) โดยที่ความเข้มข้น 50 %v/v ยาสมานแผลเตรียมจากสมุนไพรแห้งและน้ำมันสกัดเปลือกมังคุดแห้งมีประสิทธิภาพดีใกล้เคียงกัน อย่างไรก็ตามที่ความเข้มข้น 12.5-50 %v/v มีผลต่อการเจริญเติบโตของ *P. aeruginosa* ATCC10145 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

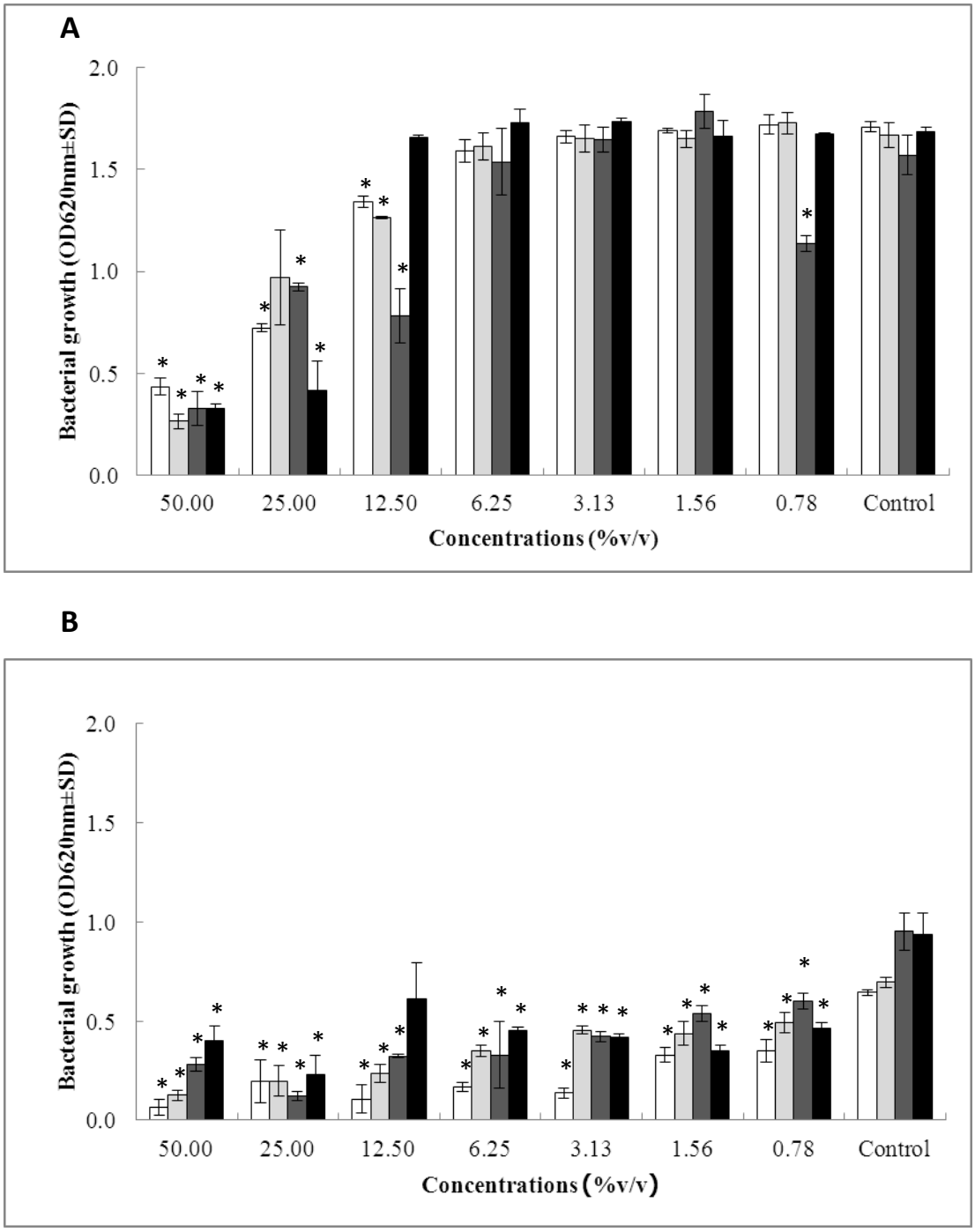
ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของ *S. epidermidis* ATCC 35984 พบว่าสารทดสอบทั้ง 4 ชนิด ที่ความเข้มข้น 25-50 %v/v มีประสิทธิภาพยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของ *S. epidermidis* ATCC35984 ได้แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p<0.05$) โดยที่ความเข้มข้น 50 %v/v ยาสมานแผลเตรียมจากสมุนไพรแห้งและน้ำมันสกัดเปลือกมังคุดแห้งมีประสิทธิภาพดีใกล้เคียงกัน อย่างไรก็ตามสารทดสอบทั้ง 4 ชนิดที่ความเข้มข้น 25-50 %v/v มีผลต่อการเจริญเติบโตของ *S. epidermidis* ATCC35984 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของ *S. epidermidis* ATCC 12228 พบว่าสารทดสอบทั้ง 4 ชนิด ที่ความเข้มข้น 0.78-50 %v/v มีประสิทธิภาพยับยั้งการสร้าง
ไบโอฟิล์มของ *S. epidermidis* ATCC12228 ได้แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p<0.05$) โดยที่ความเข้มข้น 50 %v/v ยาสมานแผลเตรียมจากสมุนไพรแห้งและน้ำมันสกัดเปลือกมังคุดแห้งมีประสิทธิภาพดีใกล้เคียงกัน อย่างไรก็ตามที่ความเข้มข้น 12.5-50 %v/v มีผลต่อการเจริญเติบโตของ *S. epidermidis* ATCC12228 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม



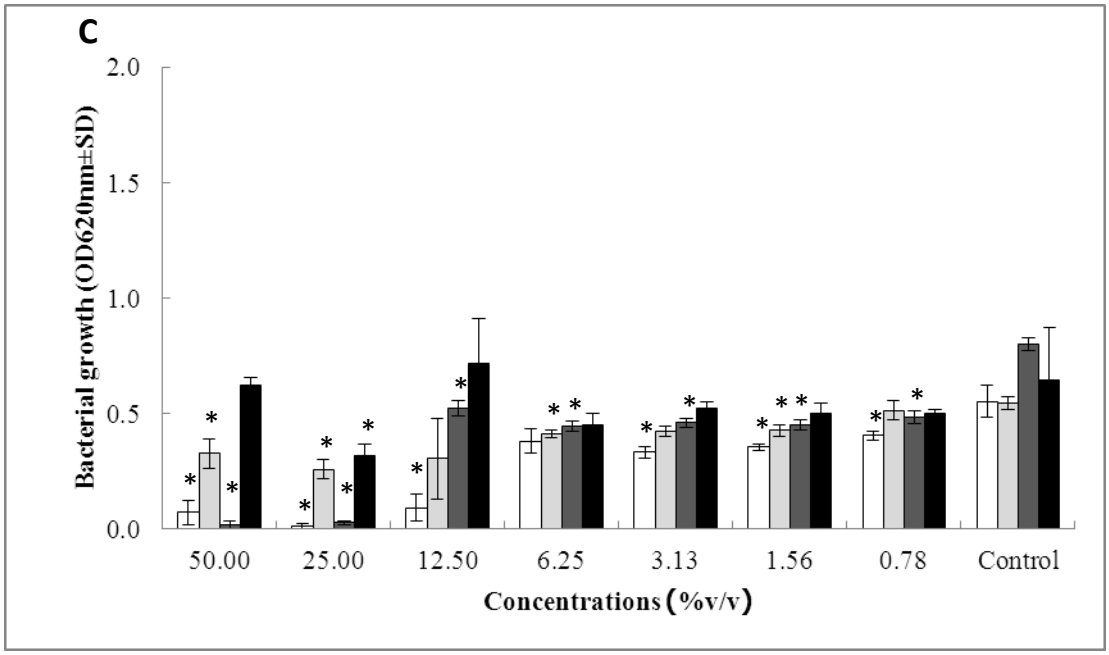
รูปที่ 5.2 Effect of different concentrations of Ya-Sa-Marn-Phlae made from dried herbs (D-YSMP; white bars), Ya-Sa-Marn-Phlae made from fresh herbs (F-YSMP; gray bars), hot oil extractions prepared from dried *G. mangostana* pericarp (D-GM; dark gray bars) and fresh *G. mangostana* pericarp (F-GM; black bars) on the biofilm development of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC10145 (A), *Staphylococcus epidermidis* ATCC35984 (B) and *Staphylococcus epidermidis* ATCC12228 biofilm (C). Each symbol indicates the means±SD for three independent experiments performed in duplicate. *p value of 0.05.



รูปที่ 5.2 (ต่อ) Effect of different concentrations of Ya-Sa-Marn-Phlae made from dried herbs (D-YSMP; white bars), Ya-Sa-Marn-Phlae made from fresh herbs (F-YSMP; gray bars), hot oil extractions prepared from dried *G. mangostana* pericarp (D-GM; dark gray bars) and fresh *G. mangostana* pericarp (F-GM; black bars) on the biofilm development of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC10145 (A), *Staphylococcus epidermidis* ATCC35984 (B) and *Staphylococcus epidermidis* ATCC12228 biofilm (C). Each symbol indicates the means±SD for three independent experiments performed in duplicate. *p value of 0.05.



รูปที่ 5.3 Effect of different concentrations of Ya-Sa-Marn-Phlae made from dried herbs (D-YSMP; white bars), Ya-Sa-Marn-Phlae made from fresh herbs (F-YSMP; gray bars), hot oil extractions prepared from dried *G. mangostana* pericarp (D-GM; dark gray bars) and fresh *G. mangostana* pericarp (F-GM; black bars) on growth of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC10145 (A), *Staphylococcus epidermidis* ATCC35984 (B) and *Staphylococcus epidermidis* ATCC12228 (C). Each symbol indicates the means±SD for three independent experiments performed in duplicate. *p value of 0.05.



รูปที่ 5.3 (ต่อ) Effect of different concentrations of Ya-Sa-Marn-Phlae made from dried herbs (D-YSMP; white bars), Ya-Sa-Marn-Phlae made from fresh herbs (F-YSMP; gray bars), hot oil extractions prepared from dried *G. mangostana* pericarp (D-GM; dark gray bars) and fresh *G. mangostana* pericarp (F-GM; black bars) on growth of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC10145 (A), *Staphylococcus epidermidis* ATCC35984 (B) and *Staphylococcus epidermidis* ATCC12228 (C). Each symbol indicates the means±SD for three independent experiments performed in duplicate. *p value of 0.05.

ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope; SEM)

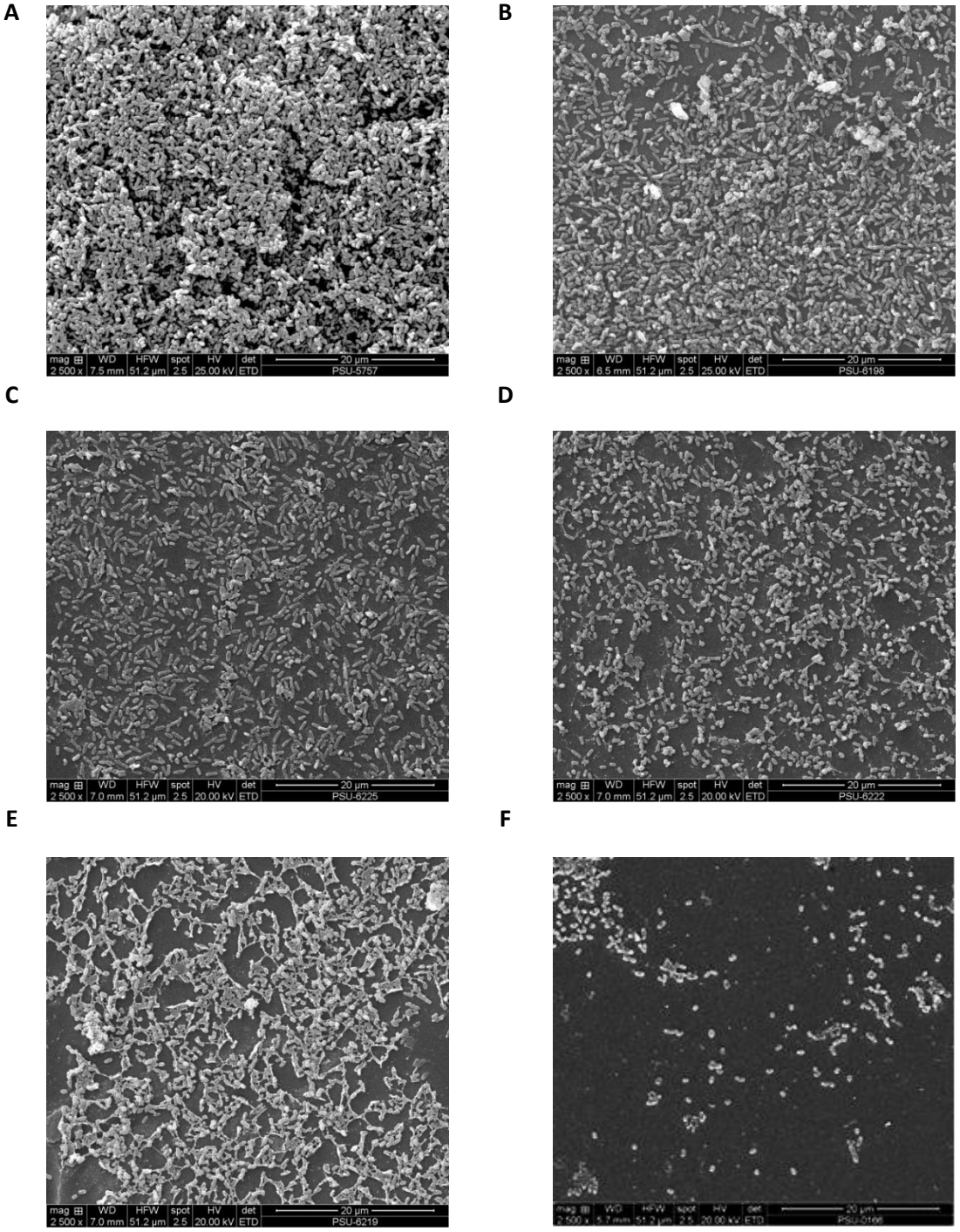
ผลการทดสอบยาสมานแผลเตรียมจากสมุนไพรแห้ง ยาสมานแผลเตรียมจากสมุนไพรสด น้ำมันสกัดเปลือกมังคุดแห้งและน้ำมันสกัดเปลือกมังคุดสดที่ความเข้มข้น 50 %v/v ต่อการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของ *P. aeruginosa* ATCC10145 และ *S. epidermidis* ATCC35984 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยการทดสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด แสดงให้เห็นถึงการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของไบโอฟิล์ม

ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของ *P. aeruginosa* ATCC 10145

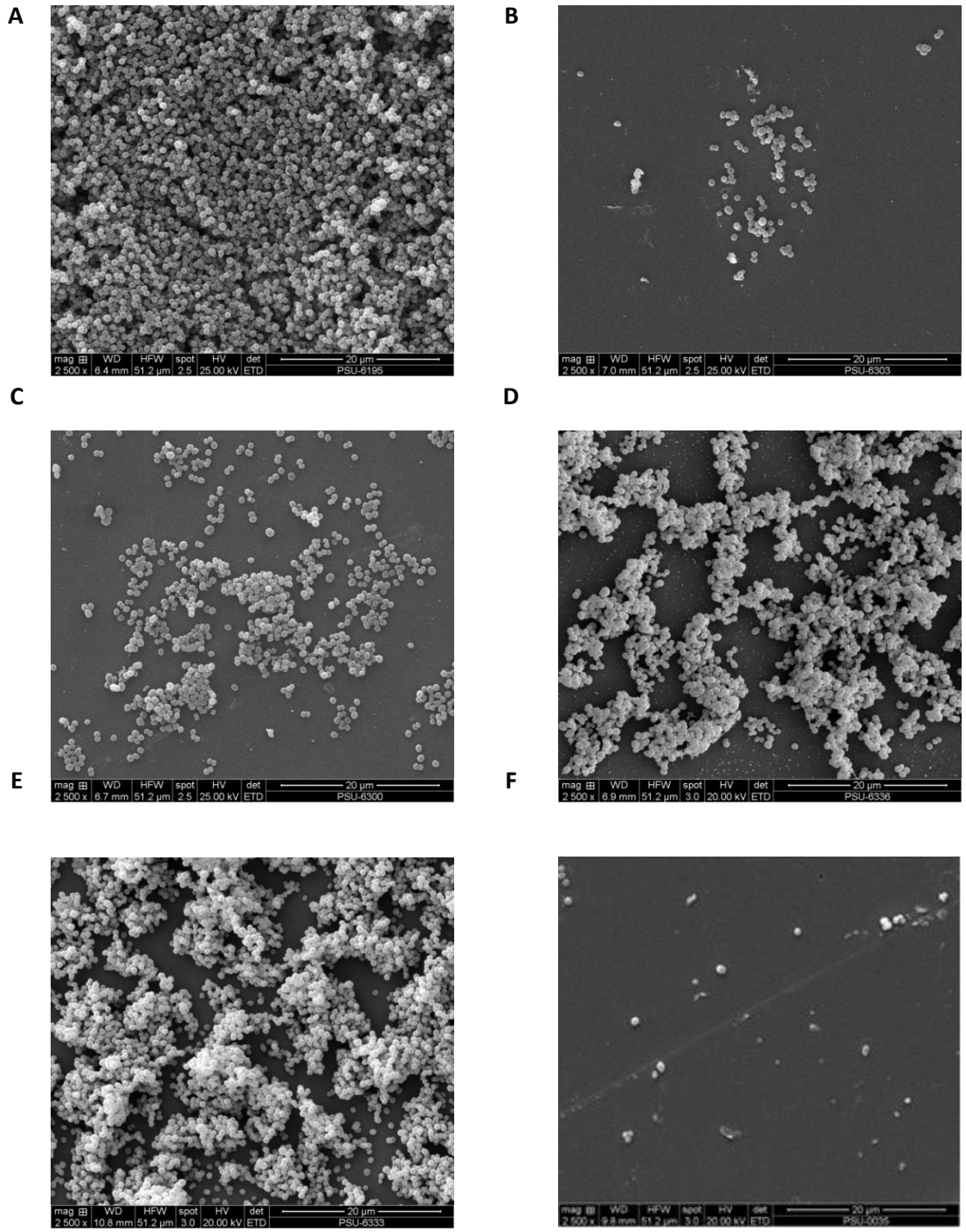
ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดของ *P. aeruginosa* ATCC 10145 ที่เจริญเติบโตในอาหาร TSBGlc ซึ่งใช้เป็นกลุ่มควบคุม พบว่าเซลล์จัดเรียงตัวอย่างหนาแน่น เกิดชั้นของไบโอฟิล์มชัดเจน เมื่อทดสอบด้วยยาสมานแผลเตรียมจากสมุนไพรแห้ง ยาสมานแผลเตรียมจากสมุนไพรสด น้ำมันสกัดเปลือกมังคุดแห้ง และน้ำมันสกัดเปลือกมังคุดสด พบว่าเซลล์จัดเรียงตัวอย่างกระจัดกระจาย ความหนาแน่นของเซลล์น้อยลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ไม่พบการพัฒนาชั้นของไบโอฟิล์ม เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม เช่นเดียวกับการทดสอบด้วยสารองค์ประกอบทางเคมี alpha-mangostin ของมังคุดที่ความเข้มข้น 2 µg/ml ซึ่งใช้เป็นสารมาตรฐานเปรียบเทียบ พบว่าเซลล์จัดเรียงตัวอย่างกระจัดกระจาย ไม่มีความหนาแน่นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของ *S. epidermidis* ATCC 35984

ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดของ *S. epidermidis* ATCC 35984 ที่เจริญเติบโตในอาหาร TSBGlc ซึ่งใช้เป็นกลุ่มควบคุม พบว่าเซลล์จัดเรียงตัวอย่างหนาแน่น เกิดชั้นของไบโอฟิล์มชัดเจน เมื่อทดสอบด้วยยาสมานแผลเตรียมจากสมุนไพรแห้ง ยาสมานแผลเตรียมจากสมุนไพรสด น้ำมันสกัดเปลือกมังคุดแห้ง และน้ำมันสกัดเปลือกมังคุดสด พบว่าเซลล์จัดเรียงตัวอย่างกระจัดกระจาย ความหนาแน่นของเซลล์น้อยลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ไม่พบการพัฒนาชั้นของไบโอฟิล์ม เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม เช่นเดียวกับการทดสอบด้วยสารองค์ประกอบทางเคมี alpha-mangostin ของมังคุดที่ความเข้มข้น 2 µg/ml ซึ่งใช้เป็นสารมาตรฐานเปรียบเทียบ พบว่าเซลล์จัดเรียงตัวอย่างกระจัดกระจาย ไม่มีความหนาแน่นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม



รูปที่ 5.4 SEM micrographs of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC10145 biofilm formation on glass surfaces. Biofilms were grown in TSBGlc (A) or in TSBGlc supplemented with Ya-Sa-Marn-Phlae made from dried herbs (B) and fresh herbs (C). TSBGlc supplemented with hot oil extractions prepared from dried *G. mangostana* pericarp (D) and fresh *G. mangostana* pericarp (E) or TSBGlc supplemented with alpha-mangostin (F). All images shown were taken at magnification 2500X.



รูปที่ 5.5 SEM micrographs of *Staphylococcus epidermidis* ATCC35984 biofilm formation on glass surfaces. Biofilms were grown in TSBGlc (A) or in TSBGlc supplemented with Ya-Sa-Marn-Phlae made from dried herbs (B) and fresh herbs (C). TSBGlc supplemented with hot oil extractions prepared from dried *G. mangostana* pericarp (D) and fresh *G. mangostana* pericarp (E) or TSBGlc supplemented with alpha-mangostin (F). All images shown were taken at magnification 2500X.

ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม ด้วยกล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม (atomic force microscope; AFM)

ผลการทดสอบยาสมานแผลเตรียมจากสมุนไพรแห้ง ยาสมานแผลเตรียมจากสมุนไพรสด น้ำมันสกัดเปลือกมังคุดแห้ง และน้ำมันสกัดเปลือกมังคุดสดที่ความเข้มข้น 50 %v/v ต่อการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของ *P. aeruginosa* ATCC10145 และ *S. epidermidis* ATCC35984 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยการทดสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม ในรูปแบบภาพสามมิติ แสดงให้เห็นถึงการเปลี่ยนแปลงความหนาและสภาพพื้นผิวของไบโอฟิล์ม และวัดค่าเฉลี่ยความสูงของไบโอฟิล์ม (roughness average) ค่าจุดสูงสุดของไบโอฟิล์ม (peak height) และค่าความแตกต่างระหว่างจุดสูงสุดและจุดต่ำสุดของไบโอฟิล์ม (peak-valley height) สามารถแสดงผลการทดลองได้ดังนี้

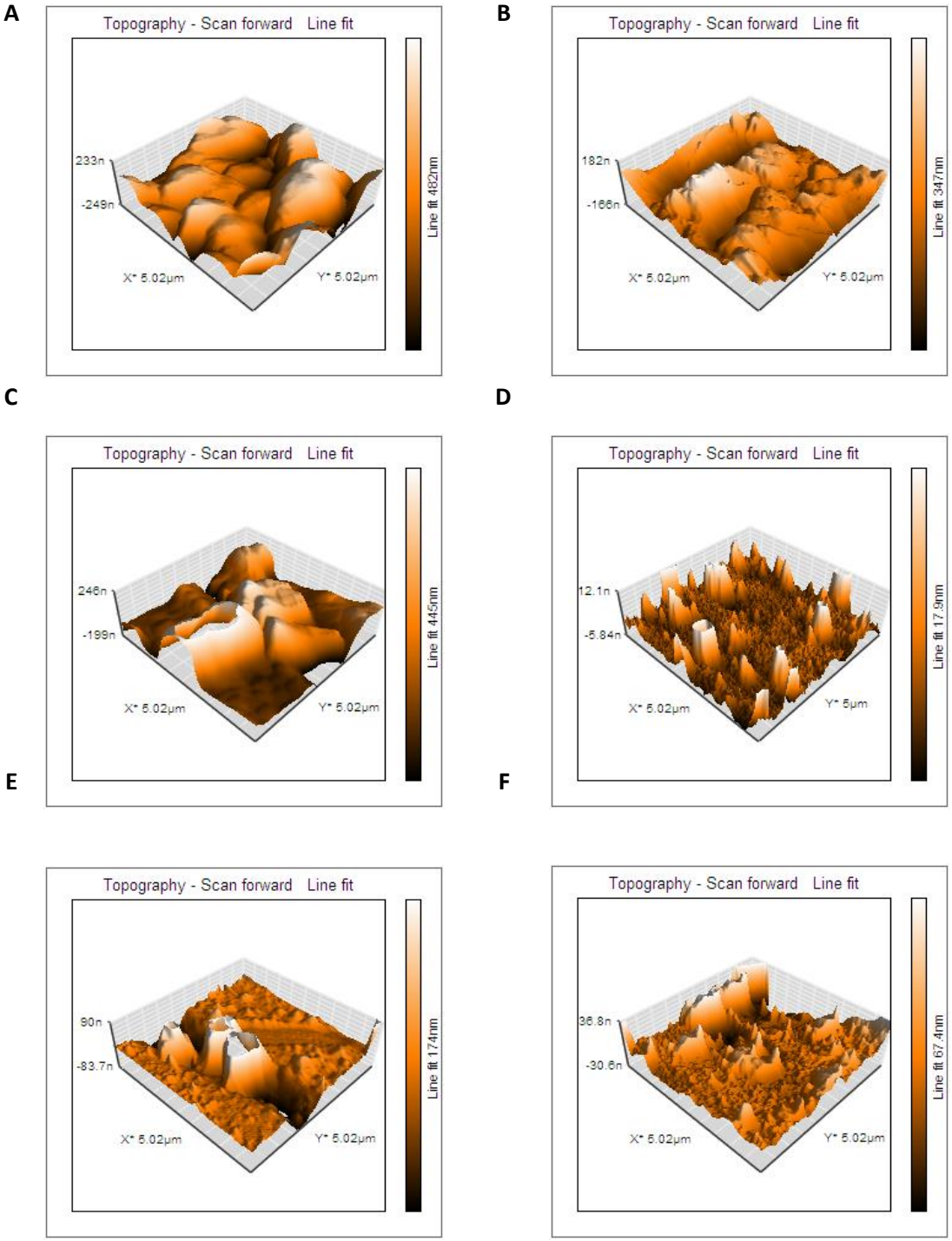
ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของ *P. aeruginosa* ATCC 10145

ภาพจากกล้องจุลทรรศน์แรงอะตอมของ *P. aeruginosa* ATCC10145 ที่เจริญ เติบโตในอาหาร TSBGlc ซึ่งใช้เป็นกลุ่มควบคุม แสดงไบโอฟิล์มที่มีการจัดเรียงตัวอย่างหนาแน่น โดยแสดงค่าเฉลี่ยความสูงของไบโอฟิล์ม ค่าจุดสูงสุดของไบโอฟิล์ม และค่าความแตกต่างระหว่างจุดสูงสุดและจุดต่ำสุดของไบโอฟิล์มเท่ากับ 91.86, 375.13 และ 725.98 นาโนเมตร ตามลำดับ ทดสอบด้วยยาสมานแผลเตรียมจากสมุนไพรแห้ง พบว่าไบโอฟิล์มมีสภาพพื้นผิวเปลี่ยนแปลงไปเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยแสดงค่าเฉลี่ยความสูงของไบโอฟิล์ม ค่าจุดสูงสุดของไบโอฟิล์ม และค่าความแตกต่างระหว่างจุดสูงสุดและจุดต่ำสุดของไบโอฟิล์มเท่ากับ 45.12, 223.32 และ 399.08 นาโนเมตร ตามลำดับ ซึ่งค่าเฉลี่ยความสูงของไบโอฟิล์มและค่าความแตกต่างระหว่างจุดสูงสุดและจุดต่ำสุดของไบโอฟิล์มมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ทดสอบด้วยยาสมานแผลเตรียมจากสมุนไพรสด พบว่าไบโอฟิล์มมีสภาพพื้นผิวเปลี่ยนแปลงไปเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยแสดงค่าเฉลี่ยความสูงของไบโอฟิล์ม ค่าจุดสูงสุดของไบโอฟิล์ม และค่าความแตกต่างระหว่างจุดสูงสุดและจุดต่ำสุดของไบโอฟิล์มเท่ากับ 49.88, 299.85 และ 519.12 นาโนเมตร ตามลำดับ ซึ่งค่าเฉลี่ยความสูงของไบโอฟิล์มมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ทดสอบด้วยน้ำมันสกัดเปลือกมังคุดแห้ง พบว่าไบโอฟิล์มมีสภาพพื้นผิวเปลี่ยนแปลงไปเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยแสดงค่าเฉลี่ยความสูงของไบโอฟิล์ม ค่าจุดสูงสุดของไบโอฟิล์ม และค่าความแตกต่างระหว่างจุดสูงสุดและจุดต่ำสุดของไบโอฟิล์มเท่ากับ 4.64, 61.85 และ 96.33 นาโนเมตร ตามลำดับ ซึ่งมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ทดสอบด้วยน้ำมันสกัดเปลือกมังคุดสด พบว่าไบโอฟิล์มมีสภาพพื้นผิวเปลี่ยนแปลงไปเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (โดยแสดงค่าเฉลี่ยความสูงของไบโอฟิล์ม ค่าจุดสูงสุดของไบโอฟิล์ม และค่าความแตกต่างระหว่างจุดสูงสุดและจุดต่ำสุดของไบโอฟิล์มเท่ากับ 10.83, 172.32 และ 224.18 นาโนเมตร ตามลำดับ ซึ่งค่าเฉลี่ยความสูงของไบโอฟิล์มมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ทดสอบด้วยสารองค์ประกอบทางเคมี alpha-mangostin ของมังคุดที่ความเข้มข้น 2 µg/ml ซึ่งใช้เป็นสารมาตรฐานเปรียบเทียบ พบว่าไบโอฟิล์มมีสภาพพื้นผิวเปลี่ยนแปลงไปเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยแสดงค่าเฉลี่ยความสูงของไบโอฟิล์ม ค่าจุดสูงสุดของไบโอฟิล์ม และค่าความแตกต่างระหว่างจุดสูงสุดและจุดต่ำสุดของไบโอฟิล์มเท่ากับ 11.09, 115.86 และ 167.67 นาโนเมตร ตามลำดับ ซึ่งมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

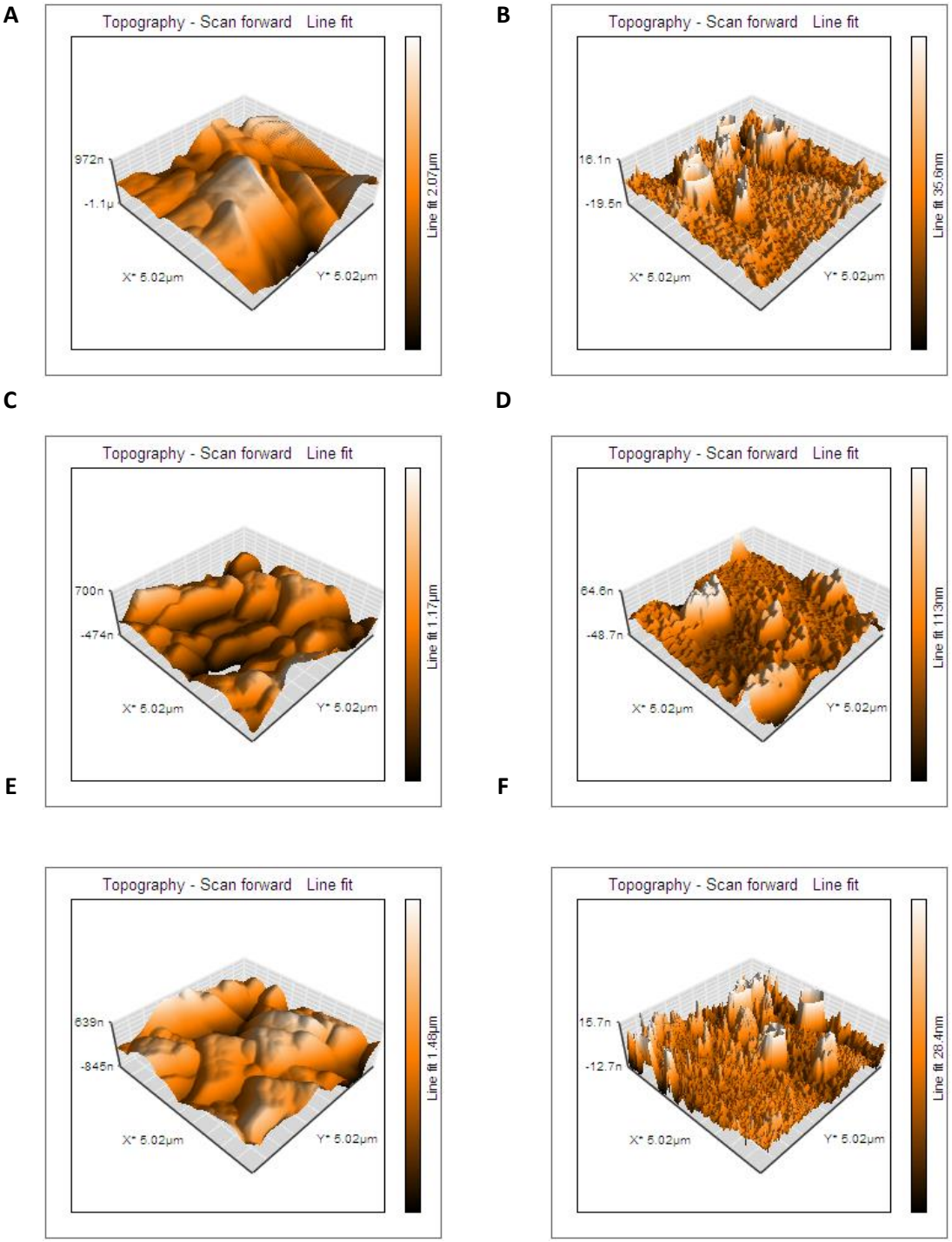
ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของ *S. epidermidis* ATCC 35984

ภาพจากกล้องจุลทรรศน์แรงอะตอมของ *S. epidermidis* ATCC35984 ที่เจริญ เติบโตในอาหาร TSBGlc ซึ่งใช้เป็นกลุ่มควบคุม แสดงไบโอฟิล์มที่มีการจัดเรียงตัวอย่างหนาแน่น โดยแสดงค่าเฉลี่ยความสูงของไบโอฟิล์ม ค่าจุดสูงสุดของไบโอ

ฟิล์ม และค่าความแตกต่างระหว่างจุดสูงสุดและจุดต่ำสุดของไบโอฟิล์มเท่ากับ 214.24, 1055.94 และ 2242 นาโนเมตร ตามลำดับ ทดสอบด้วยยาสมานแผลเตรียมจากสมุนไพรแห้ง พบว่าไบโอฟิล์มมีสภาพพื้นผิวเปลี่ยนแปลงไปเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยแสดงค่าเฉลี่ยความสูงของไบโอฟิล์ม ค่าจุดสูงสุดของไบโอฟิล์ม และค่าความแตกต่างระหว่างจุดสูงสุดและจุดต่ำสุดของไบโอฟิล์มเท่ากับ 3.25, 44.06 และ 63.57 นาโนเมตร ตามลำดับ ซึ่งมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ทดสอบด้วยยาสมานแผลเตรียมจากสมุนไพรสด พบว่าไบโอฟิล์มมีสภาพพื้นผิวเปลี่ยนแปลงไปเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยแสดงค่าเฉลี่ยความสูงของไบโอฟิล์ม ค่าจุดสูงสุดของไบโอฟิล์ม และค่าความแตกต่างระหว่างจุดสูงสุดและจุดต่ำสุดของไบโอฟิล์มเท่ากับ 254.86, 829.86 และ 1965.97 นาโนเมตร ตามลำดับ แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ทดสอบด้วยน้ำมันสกัดเปลือกมังคุดแห้ง พบว่าไบโอฟิล์มมีสภาพพื้นผิวเปลี่ยนแปลงไปเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยแสดงค่าเฉลี่ยความสูงของไบโอฟิล์ม ค่าจุดสูงสุดของไบโอฟิล์ม และค่าความแตกต่างระหว่างจุดสูงสุดและจุดต่ำสุดของไบโอฟิล์มเท่ากับ 12.82, 101.55 และ 166.56 นาโนเมตร ตามลำดับ ซึ่งมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ทดสอบด้วยน้ำมันสกัดเปลือกมังคุดสด พบว่าไบโอฟิล์มมีสภาพพื้นผิวเปลี่ยนแปลงไปเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยแสดงค่าเฉลี่ยความสูงของไบโอฟิล์ม ค่าจุดสูงสุดของไบโอฟิล์ม และค่าความแตกต่างระหว่างจุดสูงสุดและจุดต่ำสุดของไบโอฟิล์มเท่ากับ 180.73, 702.02 และ 1509.63 นาโนเมตร ตามลำดับ ซึ่งค่าความแตกต่างระหว่างจุดสูงสุดและจุดต่ำสุดของไบโอฟิล์มมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ทดสอบด้วยสารองค์ประกอบทางเคมี alpha-mangostin ของมังคุดที่ความเข้มข้น 2 µg/ml ซึ่งใช้เป็นสารมาตรฐานเปรียบเทียบ พบว่าไบโอฟิล์มมีสภาพพื้นผิวเปลี่ยนแปลงไปเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยแสดงค่าเฉลี่ยความสูงของไบโอฟิล์ม ค่าจุดสูงสุดของไบโอฟิล์ม และค่าความแตกต่างระหว่างจุดสูงสุดและจุดต่ำสุดของไบโอฟิล์มเท่ากับ 4.28, 71.50 และ 98.84 นาโนเมตร ตามลำดับ ซึ่งมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม



รูปที่ 5.6 AFM topographic images of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC10145 biofilm formation on glass surfaces. Biofilms were grown in TSBGlc (A), in TSBGlc supplemented with Ya-Sa-Marn-Phlae made from dried herbs (B) and fresh herbs (C), in TSBGlc supplemented with hot oil extractions prepared from dried *G. mangostana* pericarp (D) and fresh *G. mangostana* pericarp (E) or TSBGlc supplemented with alpha-mangostin (F). All images shown were taken at magnification 5 μm^2.



รูปที่ 5.7 AFM topographic images of *Staphylococcus epidermidis* ATCC35984 biofilm formation on glass surfaces. Biofilms were grown in TSBGlc (A), in TSBGlc supplemented with Ya-Sa-Marn-Phlae made from dried herbs (B) and fresh herbs (C), in TSBGlc supplemented with hot oil extractions prepared from dried *G. mangostana* pericarp (D) and fresh *G. mangostana* pericarp (E) or TSBGlc supplemented with alpha-mangostin (F). All images shown were taken at magnification 5 μm^2.

ตารางที่ 5.1 Surfaces of biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC10145 and *Staphylococcus epidermidis* ATCC35984 after treatment with Ya-Sa-Marn-Phlae and hot oil extractions of *Garcinia mangostana* pericarp.

Bacteria and tested agents	Roughness average	Peak height	Peak-valley height
P. aeruginosa **ATCC10145**			
Control	91.86±11.68	375.13±20.93	725.98±59.88 [a]
Ya-Sa-Marn-Phlae made from dried herbs	45.12±11.96 [*]	223.32±49.81	399.08±33.15 [*]
Ya-Sa-Marn-Phlae made from fresh herbs	49.88±25.85 [*]	299.85±47.68	519.12±89.48
Hot oil extraction prepared from dried *G. mangostana* pericarp	4.64±2.11 [*]	61.85±29.66 [*]	96.33±48.60 [*]
Hot oil extraction prepared from fresh *G. mangostana* pericarp	10.83±8.50 [*]	172.32±152.74	224.18±184.67
Alpha-mangostin	11.09±5.45 [*]	115.86±55.47 [*]	167.67±82.01 [*]
S. epidermidis **ATCC35984**			
Control	214.24±63.35	1055.94±154.60	2242.13±317.83
Ya-Sa-Marn-Phlae made from dried herbs	3.25±2.00 [*]	44.06±22.53 [*]	63.57±27.40 [*]
Ya-Sa-Marn-Phlae made from fresh herbs	254.86±141.41	829.86±222.77	1965.97±784.32
Hot oil extraction prepared from dried *G. mangostana* pericarp	12.82±5.63 [*]	101.55±42.40 [*]	166.56±73.35 [*]
Hot oil extraction prepared from fresh *G. mangostana* pericarp	180.73±16.95	702.02±121.88	1509.63±37.11 [*]
Alpha-mangostin	4.28±1.82 [*]	71.50±19.32 [*]	98.84±20.01 [*]

[*] Values are significantly difference by t-test ($p < 0.05$).

ผลการทดสอบฤทธิ์การทำลายไบโอฟิล์ม

ผลการทดสอบฤทธิ์การทำลายไบโอฟิล์มโดยวิธี MTT reduction assay

ในการทดสอบการทำลายไบโอฟิล์มจะทำการทดสอบไบโอฟิล์มที่อยู่ในระยะการเจริญเติบโตโดยสมบูรณ์กับสารทดสอบที่ความเข้มข้น 100 %v/v เป็นเวลา 3, 6, 9 และ 18 ชั่วโมง ซึ่งเป็นระยะเวลาที่ไบโอฟิล์มได้รับสารทดสอบ สามารถแสดงผลการทดลองได้ดังนี้

ผลการทดสอบฤทธิ์การทำลายไบโอฟิล์มของ *P. aeruginosa* ATCC10145

ผลการทดสอบฤทธิ์การทำลายไบโอฟิล์มของ *P. aeruginosa* ATCC10145 หลังจากได้รับสารทดสอบเป็นเวลา 3 ชั่วโมง พบว่ายาสมานแผลเตรียมจากสมุนไพรสด น้ำมันสกัดเปลือกมังคุดสด ยาสมานแผลเตรียมจากสมุนไพรแห้ง และน้ำมันสกัดเปลือกมังคุดแห้ง มีประสิทธิภาพทำลายไบโอฟิล์มได้แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับ PBS คิดเป็นร้อยละ 60.36, 57.17, 53.78 และ 47.85 ตามลำดับ แต่ผลการทดสอบระหว่างยาสมานแผลเตรียมจากสมุนไพรสด น้ำมันสกัดเปลือกมังคุดสด และยาสมานแผลเตรียมจากสมุนไพรแห้ง ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

ผลการทดสอบฤทธิ์การทำลายไบโอฟิล์มของ *P. aeruginosa* ATCC10145 หลังจากได้รับสารทดสอบเป็นเวลา 6 ชั่วโมง พบว่ายาสมานแผลเตรียมจากสมุนไพรแห้งมีประสิทธิภาพทำลายไบโอฟิล์มได้แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับ PBS คิดเป็นร้อยละ 54.39 แต่ผลการทดสอบระหว่างยาสมานแผลเตรียมจากสมุนไพรแห้งและน้ำมันสกัดเปลือกมังคุดแห้งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

ผลการทดสอบฤทธิ์การทำลายไบโอฟิล์มของ *P. aeruginosa* ATCC10145 หลังจากได้รับสารทดสอบเป็นเวลา 9 ชั่วโมง พบว่าสารทดสอบทั้ง 4 ชนิดไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับ PBS

ผลการทดสอบฤทธิ์การทำลายไบโอฟิล์มของ *P. aeruginosa* ATCC10145 หลังจากได้รับสารทดสอบเป็นเวลา 18 ชั่วโมง พบว่ายาสมานแผลเตรียมจากสมุนไพรแห้งและน้ำมันสกัดเปลือกมังคุดสดมีประสิทธิภาพทำลายไบโอฟิล์มได้แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับ PBS คิดเป็นร้อยละ 14.77 และ 11.51 ตามลำดับ แต่ผลการทดสอบระหว่างยาสมานแผลเตรียมจากสมุนไพรแห้งและน้ำมันสกัดเปลือกมังคุดสดไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

หากพิจารณาถึงประสิทธิภาพของสารทดสอบแต่ชนิดหลังจากการทดสอบเป็นเวลา 3, 6 และ 9 ชั่วโมง พบว่ายาสมานแผลเตรียมจากสมุนไพรแห้งมีประสิทธิภาพในการทำลายไบโอฟิล์มได้ใกล้เคียงกันตลอดระยะเวลาของการทดสอบ คิดเป็นร้อยละ 53.78, 54.39 และ 53.95 ตามลำดับ เช่นเดียวกันกับผลการทดสอบในน้ำมันสกัดเปลือกมังคุดแห้ง คิดเป็นร้อยละ 47.85, 44.61 และ 48.31 ตามลำดับ ผลการทดสอบด้วยยาสมานแผลเตรียมจากสมุนไพรสดและน้ำมันสกัดเปลือกมังคุดสด พบว่ามีประสิทธิภาพในการทำลายไบโอฟิล์มลดลง คิดเป็นร้อยละ 60.36, 40.01, 23.92 และ 57.17, 26.34, 10.69 ตามลำดับ สำหรับผลการทดสอบด้วยสารองค์ประกอบ alpha-mangostin พบว่ามีประสิทธิภาพในการทำลายไบโอฟิล์มได้ดีกว่าทุกสารทดสอบ

ผลการทดสอบฤทธิ์การทำลายไบโอฟิล์มของ *S. epidermidis* ATCC35984

ผลการทดสอบฤทธิ์การทำลายไบโอฟิล์มของ *S. epidermidis* ATCC35984 หลังจากได้รับสารทดสอบเป็นเวลา 3 ชั่วโมง พบว่ายาสมานแผลเตรียมจากสมุนไพรแห้ง น้ำมันสกัดเปลือกมังคุดแห้ง และยาสมานแผลเตรียมจากสมุนไพรสดมี

ประสิทธิภาพทำลายไบโอฟิล์มได้แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับ PBS คิดเป็นร้อยละ 45.65, 12.25 และ 7.77 ตามลำดับ นอกจากนี้ยาสมานแผลเตรียมจากสมุนไพรแห้งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับสารทดสอบชนิดอื่น

ผลการทดสอบฤทธิ์การทำลายไบโอฟิล์มของ *S. epidermidis* ATCC35984 หลังจากได้รับสารทดสอบเป็นเวลา 6 ชั่วโมง พบว่ายาสมานแผลเตรียมจากสมุนไพรแห้ง น้ำมันสกัดเปลือกมังคุดแห้ง และยาสมานแผลเตรียมจากสมุนไพรสดมีประสิทธิภาพทำลายไบโอฟิล์มได้แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับ PBS คิดเป็นร้อยละ 68.65, 25.41 และ 22.97 ตามลำดับ นอกจากนี้ยาสมานแผลเตรียมจากสมุนไพรแห้งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับสารทดสอบชนิดอื่น

ผลการทดสอบฤทธิ์การทำลายไบโอฟิล์มของ *S. epidermidis* ATCC35984 หลังจากได้รับสารทดสอบเป็นเวลา 9 ชั่วโมง พบว่ายาสมานแผลเตรียมจากสมุนไพรแห้ง ยาสมานแผลเตรียมจากสมุนไพรสด และน้ำมันสกัดเปลือกมังคุดแห้งมีประสิทธิภาพทำลายไบโอฟิล์มได้แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับ PBS คิดเป็นร้อยละ 71.39, 25.69 และ 23.14 ตามลำดับ นอกจากนี้ยาสมานแผลเตรียมจากสมุนไพรแห้งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับสารทดสอบชนิดอื่น

ผลการทดสอบฤทธิ์การทำลายไบโอฟิล์มของ *S. epidermidis* ATCC35984 หลังจากได้รับสารทดสอบเป็นเวลา 18 ชั่วโมง พบว่ายาสมานแผลเตรียมจากสมุนไพรแห้ง ยาสมานแผลเตรียมจากสมุนไพรสด และน้ำมันสกัดเปลือกมังคุดแห้งมีประสิทธิภาพทำลายไบโอฟิล์มได้แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับ PBS คิดเป็นร้อยละ 72.62, 58.39 และ 39.98 ตามลำดับ นอกจากนี้ยาสมานแผลเตรียมจากสมุนไพรแห้งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับสารทดสอบชนิดอื่น

หากพิจารณาถึงประสิทธิภาพของสารทดสอบแต่ชนิดหลังจากการทดสอบเป็นเวลา 3, 6, 9 และ 18 ชั่วโมง พบว่าประสิทธิภาพในการทำลายไบโอฟิล์มของยาสมานแผลเตรียมจากสมุนไพรแห้ง และยาสมานแผลเตรียมจากสมุนไพรสด มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลาของการทดสอบ โดยยาสมานแผลเตรียมจากสมุนไพรแห้ง คิดเป็นร้อยละ 45.65, 68.65, 71.39 และ 72.62 ตามลำดับ ยาสมานแผลเตรียมจากสมุนไพรสด คิดเป็นร้อยละ 7.77, 22.97, 25.69 และ 58.39 ตามลำดับ สำหรับผลการทดสอบในน้ำมันสกัดเปลือกมังคุดแห้ง คิดเป็นร้อยละ 12.25, 25.41, 23.14 และ 39.98 ตามลำดับ ผลการทดสอบในน้ำมันสกัดเปลือกมังคุดสดไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับ PBS ตลอดระยะเวลาของการทดสอบ สำหรับผลการทดสอบด้วยสารองค์ประกอบ alpha-mangostin พบว่ามีประสิทธิภาพในการทำลายไบโอฟิล์มได้ดีกว่าทุกสารทดสอบ

ตารางที่ 5.2 Biofilm eradication on mature biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC10145 and *Staphylococcus epidermidis* ATCC35984.

Bacteria and tested agents	Percentage of biofilm eradication (%± SD) at difference contact times			
	3 h	6 h	9 h	18 h
P. aeruginosa **ATCC10145**				
Phosphate-buffered saline	27.26±8.58 [a]	40.51±7.53 [a]	38.93±7.96 [a]	-54.18±10.97[a] Ya-Sa-Marn-
Phlae made from dried herbs	53.78±7.036 [bc]	54.39±6.58 [c]	53.95±4.66 [a]	14.77±7.63 [c]
Ya-Sa-Marn-Phlae made from fresh herbs	60.36±9.60 [c]	40.01±8.25 [a]	23.92±7.63 [b]	-11.49±6.44 [b]
Hot oil extraction prepared from dried *G. mangostana* pericarp	47.85±3.04 [b]	44.61±8.41 [ac]	48.31±14.90 [a]	-15.86±1.92 [b]
Hot oil extraction prepared from fresh *G. mangostana* pericarp	57.17±0.13 [bc]	26.34±2.94 [b]	10.69±4.62 [b]	11.51±3.37 [c]
Alpha-mangostin	91.27±1.06 [d]	90.66±2.02 [d]	89.40±5.46 [c]	94.59±2.60 [d]
S. epidermidis **ATCC35984**				
Phosphate-buffered saline	-0.21±5.69 [a]	2.27±1.81[a]	3.85±3.50 [a]	9.14±2.99 [a]
Ya-Sa-Marn-Phlae made from dried herbs	45.65±5.69 [d]	68.65±3.80 [c]	71.39±4.77 [c]	72.62±4.41[d]
Ya-Sa-Marn-Phlae made from fresh herbs	7.77±3.62 [bc]	22.97±10.42 [b]	25.69±1.44 [b]	58.39±4.33 [c]
Hot oil extraction prepared from dried *G. mangostana* pericarp	12.25±2.73 [c]	25.41±9.30 [b]	23.14±11.70 [b]	39.98±9.59 [b]
Hot oil extraction prepared from fresh *G. mangostana* pericarp	2.64±0.02 [ab]	0.86±0.99 [a]	1.26±2.08 [a]	8.41±0.19 [a]
Alpha-mangostin	83.83±1.14 [e]	87.41±3.49 [d]	84.75±1.82 [d]	88.44±2.39 [e]

[a-e] Values in the same column with different superscripts are significantly different by the Duncan's multiple range test ($p<0.05$).

ฤทธิ์การทำลายไบโอฟิล์ม ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบคอนโฟคอลชนิดที่ใช้เลเซอร์ในการสแกน (confocal laser scanning microscope; CLSM)

ในการทดสอบฤทธิ์การทำลายไบโอฟิล์ม ด้วยกล้องจุลทรรศน์ CLSM จะทำการทดสอบไบโอฟิล์มที่อยู่ในระยะการเจริญเติบโตโดยสมบูรณ์กับสารทดสอบที่ความเข้มข้น 100 %v/v เป็นเวลา 3, 6, 9 และ 18 ชั่วโมง ซึ่งเป็นระยะเวลาที่ไบโอฟิล์มได้รับสารทดสอบโดยการย้อมสีไบโอฟิล์มด้วยชุดทดสอบ *LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit L7007 และทำการวิเคราะห์* Z-stack *ได้แก่* มวลชีวภาพ (biomass) ความหนาเฉลี่ย (average thickness) ความหนาสูงสุด (maximum thickness) และอัตราส่วนพื้นที่ผิวต่อปริมาตร (surface to volume ratio) *สามารถแสดงผลการทดลองได้ดังนี้*

ผลการทดสอบฤทธิ์การทำลายไบโอฟิล์มของ *P. aeruginosa* ATCC10145

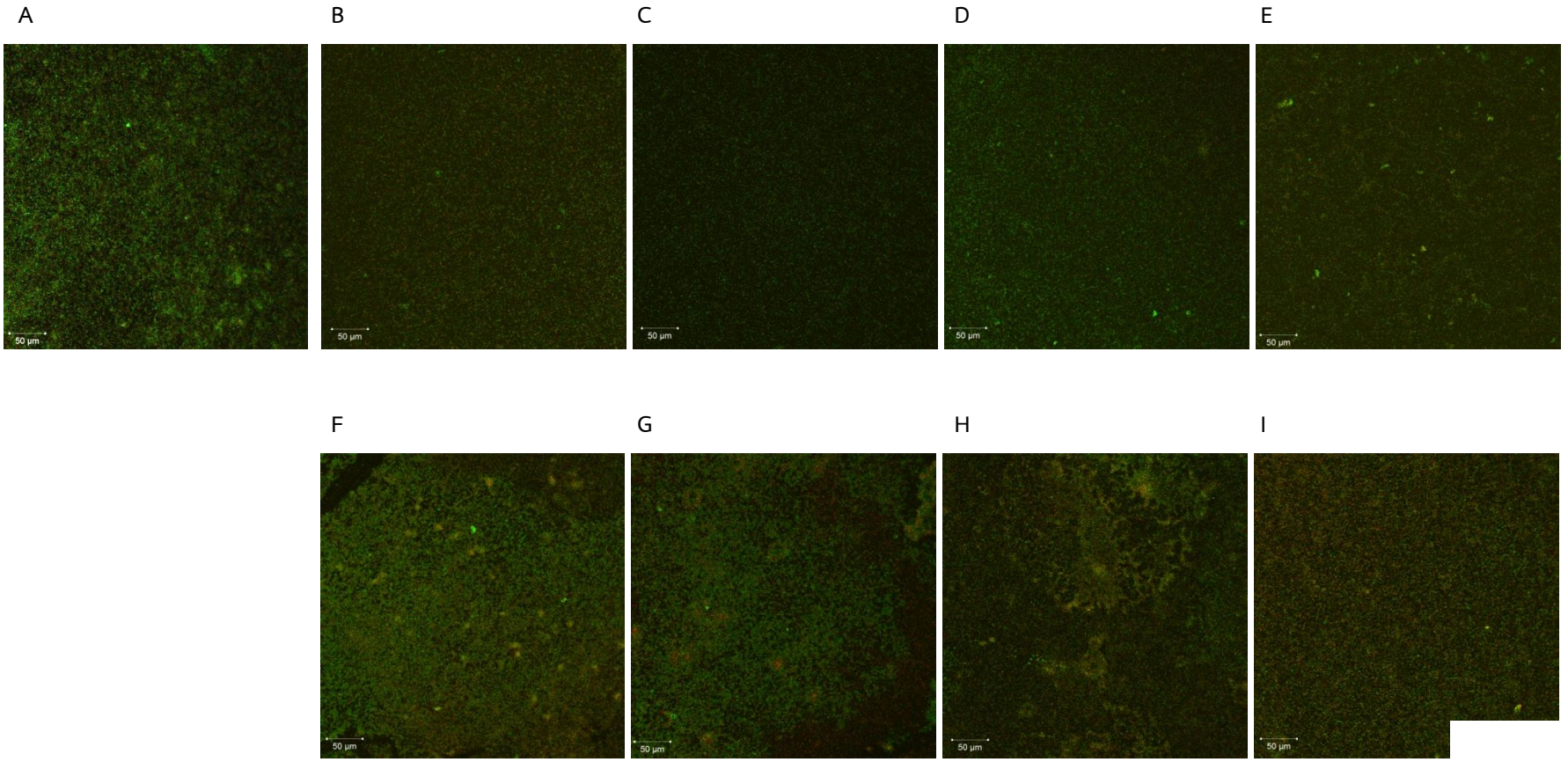
ผลการทดสอบฤทธิ์การทำลายไบโอฟิล์มของ *P. aeruginosa* ATCC10145 ของกลุ่มควบคุมโดยการทดสอบด้วย PBS เป็นเวลา 18 ชั่วโมง เมื่อถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์ CLSM พบว่า*ไบโอฟิล์มมีสภาพสมบูรณ์ย้อมติดสีเขียว และจากการวิเคราะห์* Z-stack *พบว่ามีค่า*มวลชีวภาพ ความหนาเฉลี่ย ความหนาสูงสุด และอัตราส่วนพื้นที่ผิวต่อปริมาตร *เท่ากับ 34, 18, 33 และ 0.034 ตามลำดับ*

ผลการทดสอบฤทธิ์การทำลายไบโอฟิล์มของ *P. aeruginosa* ATCC10145 หลังจากได้รับสารทดสอบเป็นเวลา 3 ชั่วโมง เมื่อถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์ CLSM ไม่พบว่าสารทดสอบทั้ง 4 ชนิด ทำให้เซลล์ภายในไบโอฟิล์มติดสีแดงเพิ่มขึ้น แต่จากผล*การวิเคราะห์* Z-stack พบว่าสารทดสอบทั้ง 4 ชนิดสามารถทำให้ค่ามวลชีวภาพ ความหนาเฉลี่ย ความหนาสูงสุดของไบโอฟิล์มมีค่าลดลง และอัตราส่วนพื้นที่ผิวต่อปริมาตรมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับ PBS

ผลการทดสอบฤทธิ์การทำลายไบโอฟิล์มของ *P. aeruginosa* ATCC10145 หลังจากได้รับสารทดสอบเป็นเวลา 6 ชั่วโมง เมื่อถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์ CLSM ไม่พบว่าสารทดสอบทั้ง 4 ชนิด ทำให้เซลล์ภายในไบโอฟิล์มติดสีแดงเพิ่มขึ้น แต่จากผล*การวิเคราะห์* Z-stack พบว่าสารทดสอบทั้ง 4 ชนิดสามารถทำให้ค่ามวลชีวภาพ ความหนาเฉลี่ย ความหนาสูงสุดของไบโอฟิล์มมีค่าลดลง และอัตราส่วนพื้นที่ผิวต่อปริมาตรมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับ PBS

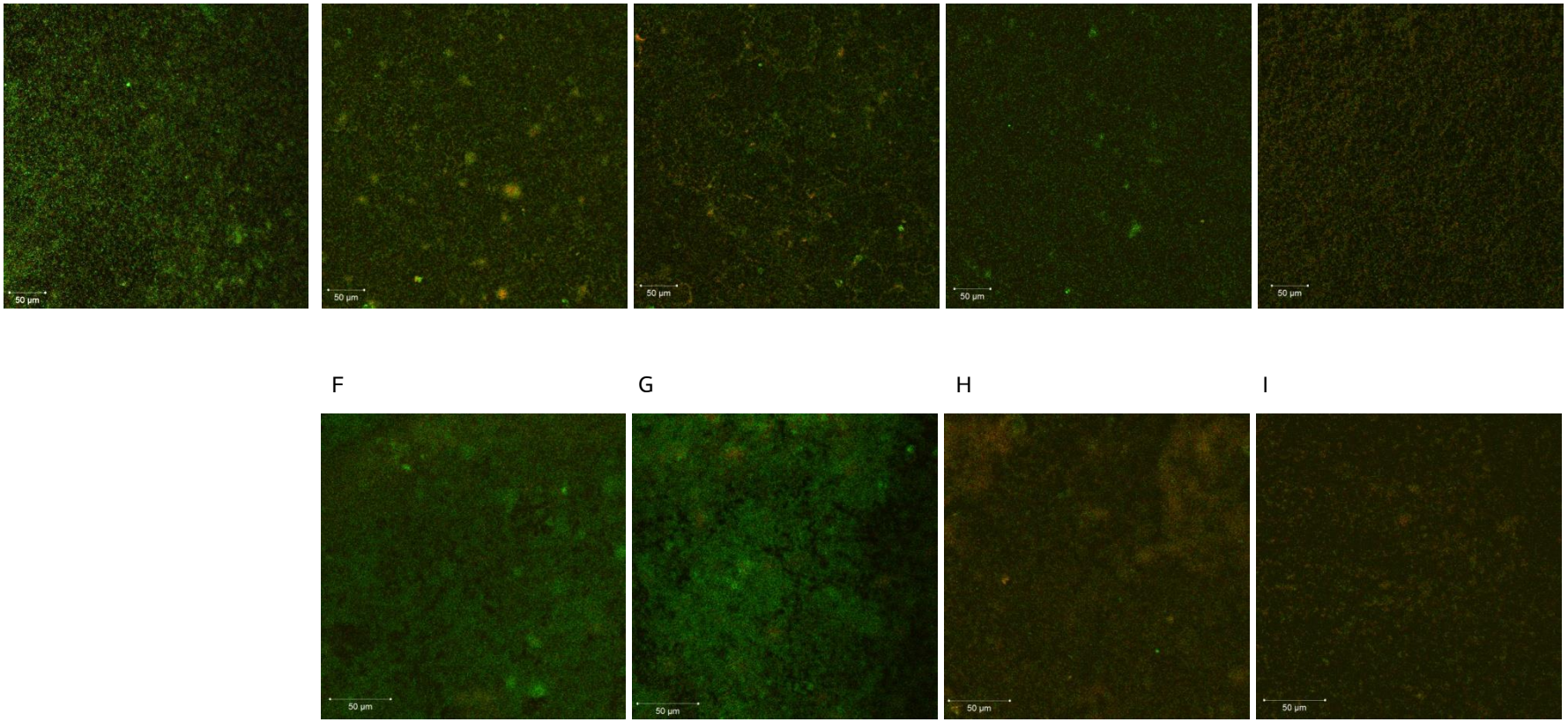
ผลการทดสอบฤทธิ์การทำลายไบโอฟิล์มของ *P. aeruginosa* ATCC10145 หลังจากได้รับสารทดสอบเป็นเวลา 9 ชั่วโมง เมื่อถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์ CLSM ไม่พบว่าสารทดสอบทั้ง 4 ชนิด ทำให้เซลล์ภายในไบโอฟิล์มติดสีแดงเพิ่มขึ้น แต่จากผล*การวิเคราะห์* Z-stack พบว่าสารทดสอบทั้ง 4 ชนิดสามารถทำให้ค่ามวลชีวภาพ ความหนาเฉลี่ย ความหนาสูงสุดของไบโอฟิล์มมีค่าลดลง และอัตราส่วนพื้นที่ผิวต่อปริมาตรมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับ PBS

ผลการทดสอบฤทธิ์การทำลายไบโอฟิล์มของ *P. aeruginosa* ATCC10145 หลังจากได้รับสารทดสอบเป็นเวลา 18 ชั่วโมง เมื่อถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์ CLSM ไม่พบว่าสารทดสอบทั้ง 4 ชนิด ทำให้เซลล์ภายในไบโอฟิล์มติดสีแดงเพิ่มขึ้น แต่จากผล*การวิเคราะห์* Z-stack พบว่าสารทดสอบทั้ง 4 ชนิดสามารถทำให้ค่ามวลชีวภาพ ความหนาเฉลี่ย ความหนาสูงสุดของไบโอฟิล์มมีค่าลดลง และอัตราส่วนพื้นที่ผิวต่อปริมาตรมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับ PBS



รูปที่ 5.8 CLSM micrographs of 3 day-old biofilm of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC10145 on glass surfaces exposed to Ya-Sa-Marn-Phlae made frc
C, D and E) and Ya-Sa-Marn-Phlae made from fresh herbs (F, G, H and I) treatment for 3 (B and F), 6 (C and G), 9 (D and H) and 18 (E and I) h. Control represents the 72 h old untreated biofilm incubated in phosphate-buffered saline during treatment period (A).

A B C D E



รูปที่ 5.9 CLSM micrographs of 3 day-old biofilm of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC10145 on glass surfaces exposed to hot oil extraction prepared from dried *G. mangostana* pericarp (B, C, D and E) and hot oil extraction prepared from fresh *G. mangostana* pericarp (F, G, H and I) treatment for 3 (B and F), 6 (C and G), 9 (D and H) and 18 (E and I) h. Control represents the 72 h old untreated biofilm incubated in phosphate-buffered saline during treatment period (A).

ตารางที่ 5.3 Comstat analysis of mature biofilm of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC10145 after treatment with Ya-Sa-Marn-Phlae and hot oil extraction *Garcinia mangostana* pericarp

Tested agent	Contact time (h)	Parameters analyzed [a]			
		Biomass ($\mu m^3/\mu m^2$)	Average thickness (μm)	Maximum thickness (μm)	Surface to volume ratio ($\mu m^2/\mu m^3$)
Phosphate-buffered saline	18	34.00	18.00	33.00	0.034
Ya-Sa-Marn-Phlae made from dried herbs	3	26.33	13.16	24.69	0.042
	6	19.30	9.653	18.10	0.056
	9	21.50	10.75	18.82	0.051
	18	25.21	12.60	23.64	0.044
Ya-Sa-Marn-Phlae made made from fresh herbs	3	24.58	12.29	23.05	0.045
	6	24.96	12.48	21.84	0.044
	9	24.28	12.14	22.77	0.045
	18	21.22	10.61	17.25	0.051
Hot oil extraction prepared from dried *G. mangostana* pericarp	3	22.56	11.28	21.15	0.049
	6	20.02	10.01	18.77	0.054
	9	20.78	10.39	19.49	0.052
	18	20.14	10.07	18.89	0.054
Hot oil extraction prepared from fresh *G. mangostana* pericarp	3	29.57	14.78	27.73	0.041
	6	32.12	16.06	30.12	0.039
	9	26.77	13.38	25.10	0.045
	18	23.89	11.94	22.40	0.049

ผลการทดสอบฤทธิ์การทำลายไบโอฟิล์มของ *S. epidermidis* ATCC35984

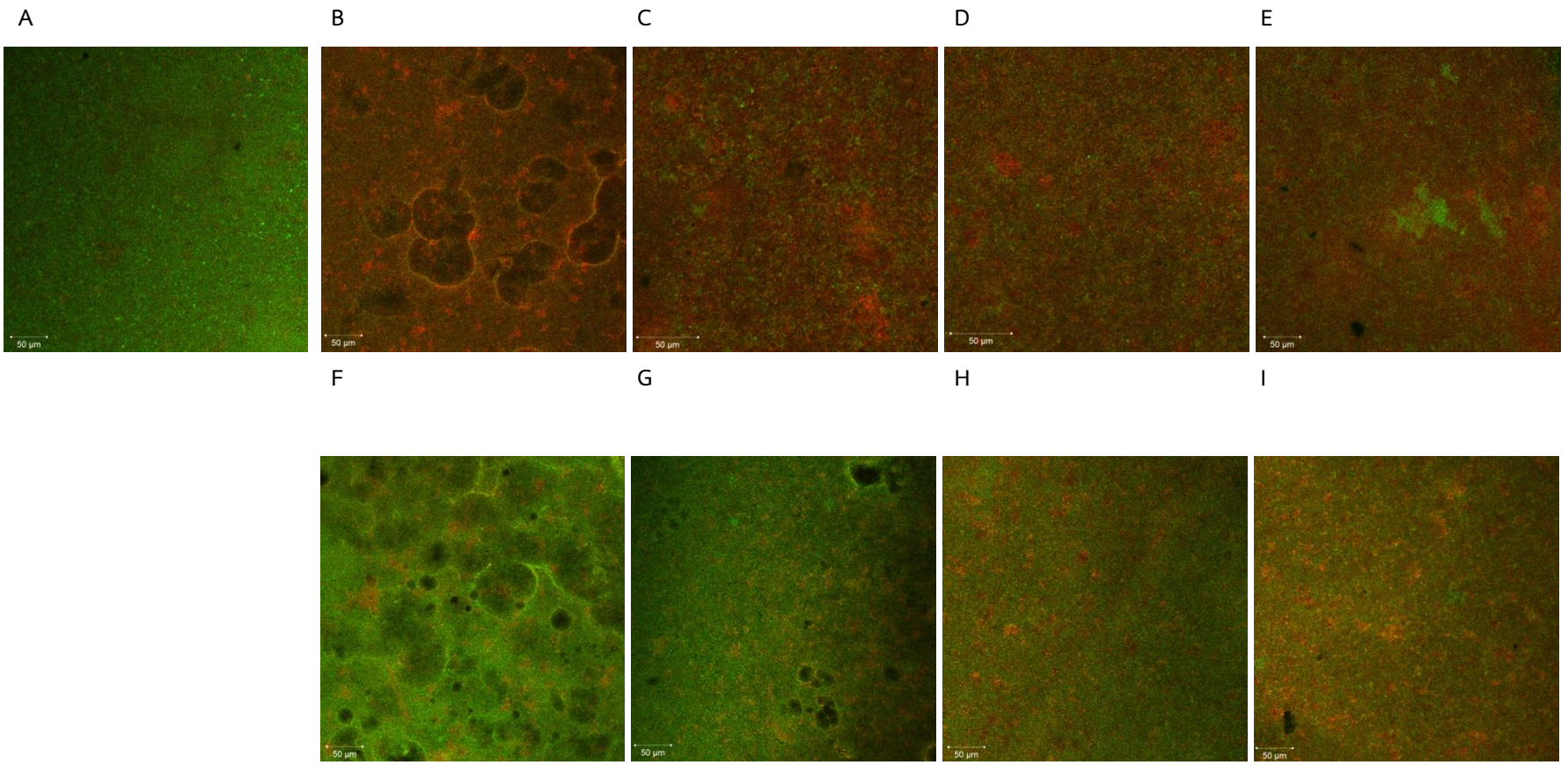
ผลการทดสอบฤทธิ์การทำลายไบโอฟิล์มของ *S. epidermidis* ATCC35984 ของกลุ่มควบคุมโดยการทดสอบด้วย PBS เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากภาพถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์ CLSM พบว่า*ไบโอฟิล์มมีสภาพสมบูรณ์ย้อมติดสีเขียว และจากการวิเคราะห์* Z-stack พบว่ามี*ค่า*มวลชีวภาพ ความหนาเฉลี่ย ความหนาสูงสุด และอัตราส่วนพื้นที่ผิวต่อปริมาตร *เท่ากับ 24.85, 12.42, 23.30 และ 0.049 ตามลำดับ*

ผลการทดสอบฤทธิ์การทำลายไบโอฟิล์มของ *S. epidermidis* ATCC35984 หลังจากได้รับสารทดสอบเป็นเวลา 3 ชั่วโมง เมื่อถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์ CLSM พบว่าเซลล์ภายในไบโอฟิล์มส่วนใหญ่ติดสีแดงหลังจากทดสอบด้วยยาสมานแผลเตรียมจากสมุนไพรแห้ง น้ำมันสกัดเปลือกมังคุดแห้ง และน้ำมันสกัดเปลือกมังคุดสด แสดงว่าสารทดสอบดังกล่าวมีประสิทธิภาพในการฆ่าเซลล์ภายในไบโอฟิล์ม สำหรับการทดสอบด้วยยาสมานแผลเตรียมจากสมุนไพรสด พบว่าเซลล์ภายในไบโอฟิล์มส่วนใหญ่ติดสีเขียว *การวิเคราะห์* Z-stack พบว่ามีเพียงยาสมานแผลเตรียมจากสมุนไพรแห้งที่สามารถทำให้ค่ามวลชีวภาพ ความหนาเฉลี่ยและความหนาสูงสุดลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับ PBS

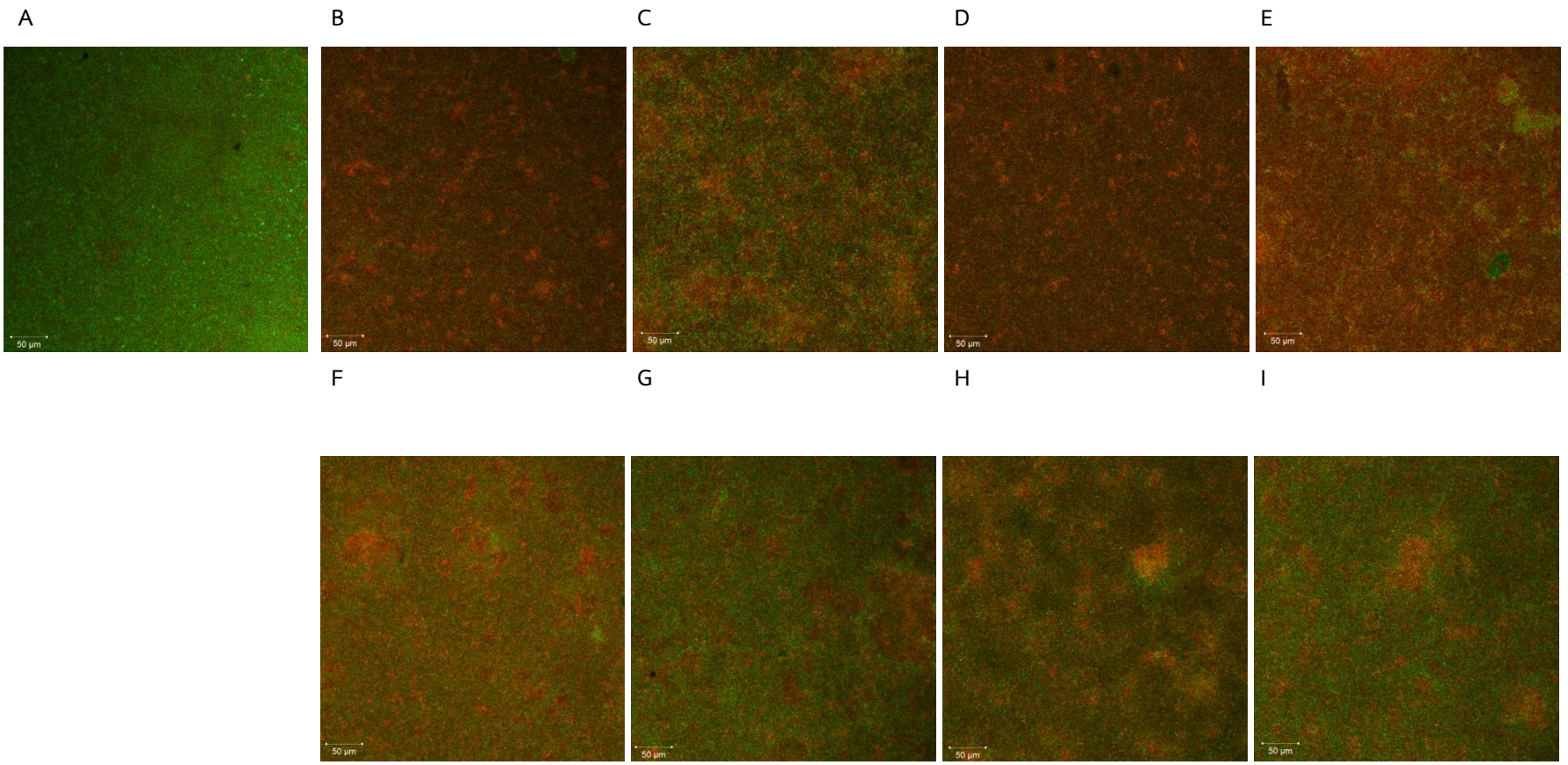
ผลการทดสอบฤทธิ์การทำลายไบโอฟิล์มของ *S. epidermidis* ATCC35984 หลังจากได้รับสารทดสอบเป็นเวลา 6 ชั่วโมง เมื่อถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์ CLSM พบว่าเซลล์ภายในไบโอฟิล์มส่วนใหญ่ติดสีแดงหลังจากทดสอบด้วยยาสมานแผลเตรียมจากสมุนไพรแห้ง และน้ำมันสกัดเปลือกมังคุดแห้ง แสดงว่าสารทดสอบดังกล่าวมีประสิทธิภาพในการฆ่าเซลล์ภายในไบโอฟิล์ม สำหรับการทดสอบด้วยยาสมานแผลเตรียมจากสมุนไพรสดและน้ำมันสกัดเปลือกมังคุดสด พบว่าเซลล์ภายในไบโอฟิล์มส่วนใหญ่ติดสีเขียว *จากการวิเคราะห์* Z-stack พบว่าสารทดสอบทั้ง 4 ชนิดไม่มีผลต่อมวลชีวภาพ ความหนาเฉลี่ย ความหนาสูงสุด และอัตราส่วนพื้นที่ผิวต่อปริมาตรเมื่อเปรียบเทียบกับ PBS

ผลการทดสอบฤทธิ์การทำลายไบโอฟิล์มของ *S. epidermidis* ATCC35984 หลังจากได้รับสารทดสอบเป็นเวลา 9 ชั่วโมง เมื่อถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์ CLSM พบว่าเซลล์ภายในไบโอฟิล์มส่วนใหญ่ติดสีแดงหลังจากทดสอบด้วยยาสมานแผลเตรียมจากสมุนไพรแห้งและน้ำมันสกัดเปลือกมังคุดแห้ง แสดงว่าสารทดสอบดังกล่าวมีประสิทธิภาพในการฆ่าเซลล์ภายในไบโอฟิล์ม สำหรับการทดสอบด้วยยาสมานแผลเตรียมจากสมุนไพรสดและน้ำมันสกัดเปลือกมังคุดสด พบว่าเซลล์ภายในไบโอฟิล์มส่วนใหญ่ติดสีเขียว จาก*การวิเคราะห์* Z-stack พบว่าสารทดสอบทั้ง 4 ชนิดไม่มีผลต่อมวลชีวภาพ ความหนาเฉลี่ย ความหนาสูงสุด และอัตราส่วนพื้นที่ผิวต่อปริมาตรเมื่อเปรียบเทียบกับ PBS

ผลการทดสอบฤทธิ์การทำลายไบโอฟิล์มของ *S. epidermidis* ATCC35984 หลังจากได้รับสารทดสอบเป็นเวลา 18 ชั่วโมง เมื่อถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์ CLSM พบว่าเซลล์ภายในไบโอฟิล์มส่วนใหญ่ติดสีแดงหลังจากทดสอบด้วยยาสมานแผลเตรียมจากสมุนไพรแห้ง และน้ำมันสกัดเปลือกมังคุดแห้ง แสดงว่าสารทดสอบดังกล่าวมีประสิทธิภาพในการฆ่าเซลล์ภายในไบโอฟิล์ม สำหรับการทดสอบด้วยยาสมานแผลเตรียมจากสมุนไพรสดและน้ำมันสกัดเปลือกมังคุดสด พบว่าเซลล์ภายในไบโอฟิล์มส่วนใหญ่ติดสีเขียว *จากการวิเคราะห์* Z-stack พบว่าสารทดสอบทั้ง 4 ชนิดไม่มีผลต่อมวลชีวภาพ ความหนาเฉลี่ย ความหนาสูงสุด และอัตราส่วนพื้นที่ผิวต่อปริมาตรเมื่อเปรียบเทียบกับเมื่อเปรียบเทียบกับ PBS



รูปที่ 5.10 CLSM micrographs of 3 day-old biofilm of *Staphylococcus epidermidis* ATCC35984 on glass surfaces exposed to Ya-Sa-Marn-Phlae made from dried herbs (B, C, D and E) and Ya-Sa-Marn-Phlae made from fresh herbs (F, G, H and I) treatment for 3 (B and F), 6 (C and G), 9 (D and H), and 18 (E and I) h. Control represents the 72 h old untreated biofilm incubated in phosphate-buffered saline during treatment period (A).



รูปที่ 5.11 CLSM micrographs of 3 day-old biofilm of *Staphylococcus epidermidis* ATCC35984 on glass surfaces exposed to hot oil extraction prepared from dried *G. mangostana* pericarp (B, C, D and E) and hot oil extraction prepared from fresh *G. mangostana* pericarp (F, G, H and I) treatment for 3 (B and F), 6 (C and G), 9 (D and H) and 18 (E and I) h. Control represents the 72 h old untreated biofilm incubated in phosphate-buffered saline during treatment period (A).

ตารางที่ 5.4 Comstat analysis of mature biofilm of *Staphylococcus epidermidis* ATCC35984 after treatment with Ya-Sa-Marn-Phlae and hot oil extraction *Garcinia mangostana* pericarp

Tested agent	Contact times (h)	Parameters analyzed [a]			
		Biomass ($\mu m^3/\mu m^2$)	Average thickness (μm)	Maximum thickness (μm)	Surface to volume ratio ($\mu m^2/\mu m^3$)
Phosphate-buffered saline	18	24.85	12.42	23.30	0.049
Ya-Sa-Marn-Phlae made from dried herbs	3	22.42	11.21	21.02	0.049
	6	34.70	17.35	32.54	0.033
	9	26.78	13.39	25.11	0.042
	18	34.93	17.46	32.75	0.33
Ya-Sa-Marn-Phlae made made from fresh herbs	3	27.96	13.98	26.22	0.040
	6	32.00	16.00	30.00	0.035
	9	36.72	18.36	34.43	0.031
	18	37.40	18.70	35.70	0.031
Hot oil extraction prepared from dried *G. mangostana* pericarp	3	34.45	17.22	32.30	0.033
	6	29.65	12.82	27.80	0.038
	9	24.71	12.35	23.17	0.045
	18	26.90	13.45	25.22	0.041
Hot oil extraction prepared from fresh *G. mangostana* pericarp	3	24.72	12.36	23.18	0.045
	6	32.91	16.45	30.86	0.035
	9	24.96	12.48	23.40	0.044
	18	31.33	15.66	29.38	0.036

ผลการทดสอบการระคายเคืองเบื้องต้นในสัตว์ทดลอง

จากผลการทดสอบความระคายเคืองเบื้องต้นโดยใช้ ใช้กระต่ายพันธุ์นิวซีแลนด์ไวท์ ในการทดสอบจำนวน 3 ตัว พบว่าค่าดัชนีความระคายเคืองเบื้องต้น (Primary Irritation Index, PII) ของยาน้ำมันสมานแผลมีค่าเท่ากับ 0.42 ซึ่งจัดเป็นผลิตภัณฑ์ที่ไม่ระคายเคืองตามการแบ่งเกณฑ์ของมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม กระทรวงอุตสาหกรรม (มอก. 152 – 2555) และจัดเป็นสารที่ไม่ระคายเคืองหรือระคายเคืองเล็กน้อยเมื่อแบ่งตามเกณฑ์ของสำนักงานปกป้องสิ่งแวดล้อม (Environmental Protection Agency -EPA)

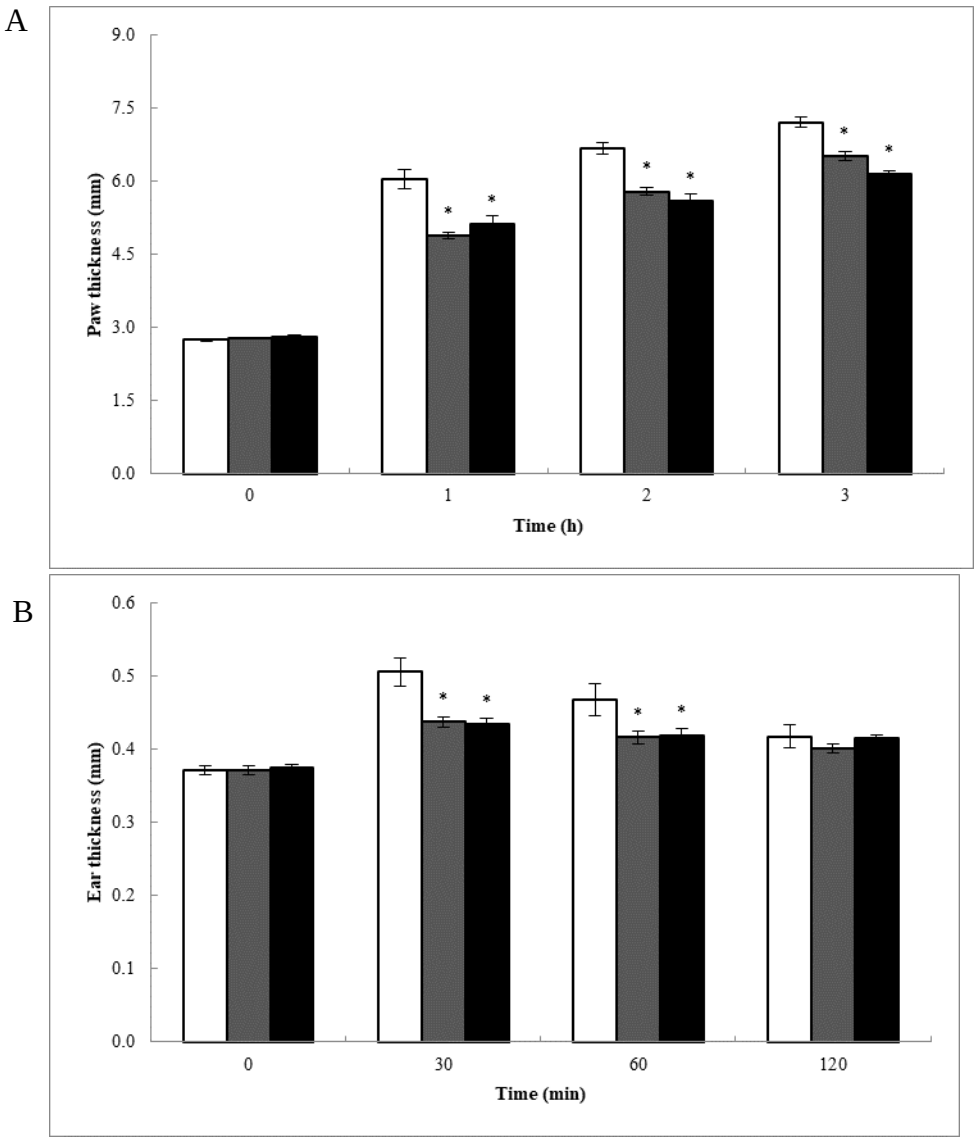
ตารางที่ 5.5 Dermal irritation study of T-YaSP at different time interval in rabbit.

Rabbit No.	Time after removal of patches (h)			
	1	24	48	72
1	1/0	0/0	0/0	0/0
2	1/0	1/0	0/0	0/0
3	1/0	1/0	0/0	0/0
Total	3/0	2/0	0/0	0/0
Mean	1/0	0.7/0	0/0	0/0
Primary Dermal Irritation Index (PDII) =5/ (4x3) = 0.42; Toxicity Category IV (non-to slightly irritating)				

Values are expressed as scores of erythema/edema.

ผลการประเมินการลดการอักเสบในสัตว์ทดลองของยาน้ำมันสมานแผล (T-YaSP)

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านอักเสบของยาสมานแผลในรูปแบบยาน้ำมัน (T-YaSP) โดยใช้วิธี carrageenan induced rat paw edema พบว่า ในกลุ่ม control ซึ่งได้รับ carrageenan ร่วมกับ vehicle มีความหนาของอุ้งเท้าเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องตามระยะเวลาที่นานขึ้น (1, 2 และ 3 ชั่วโมง) และกลุ่มที่ได้รับการรักษาด้วยยาสมานแผลในรูปแบบยาน้ำมัน และ phenylbutazone ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุมบวก พบว่าสามารถลดความหนาของอุ้งเท้าได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม control ($P< 0.001$) ทุกช่วงเวลา และจากการตรวจวิเคราะห์ปริมาณของ malondialdehyde (MDA), nitric oxide (NO) และ myeloperoxidase (MPO) ในเนื้อเยื่ออักเสบของอุ้งเท้า พบว่า ที่เวลา 3 ชั่วโมงหลังจากการเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบด้วย carrageenan กลุ่ม control มีระดับของ MDA, NO และ MPO เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม intact ซึ่งเป็นเนื้อเยื่อปกติ ($P< 0.001$) ในส่วนของกลุ่มที่ได้รับการรักษาด้วยยาสมานแผลในรูปแบบยาน้ำมันและกลุ่มควบคุมบวกพบว่า มีระดับของ MDA, NO และ MPO ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม control ($P< 0.001$) นอกจากนี้ พบว่า ในกลุ่มควบคุมบวกมีปริมาณการสร้าง MDA, NO และ MPO น้อยกว่ากลุ่มที่ได้รับการรักษาด้วยยาสมานแผลในรูปแบบยาน้ำมัน



รูปที่ 5.12 Treatment with traditionally prepared-Ya-Samarn-Phlae (T-YaSP; black bars) and 5% (v/v) of phenylbutazone (grey bars) significantly showed the reduction of carrageenan-induced paw edema (A) and ethyl phenylpropiolate-induced ear edema (B) in rats in a time-dependent manner compared with that of the vehicle-treated group (white bars). Paw edema degree was presented as the mean±SEM of 15 rats per group, *p< 0.001 *vs.* the control (One-way ANOVA followed by Duncan).

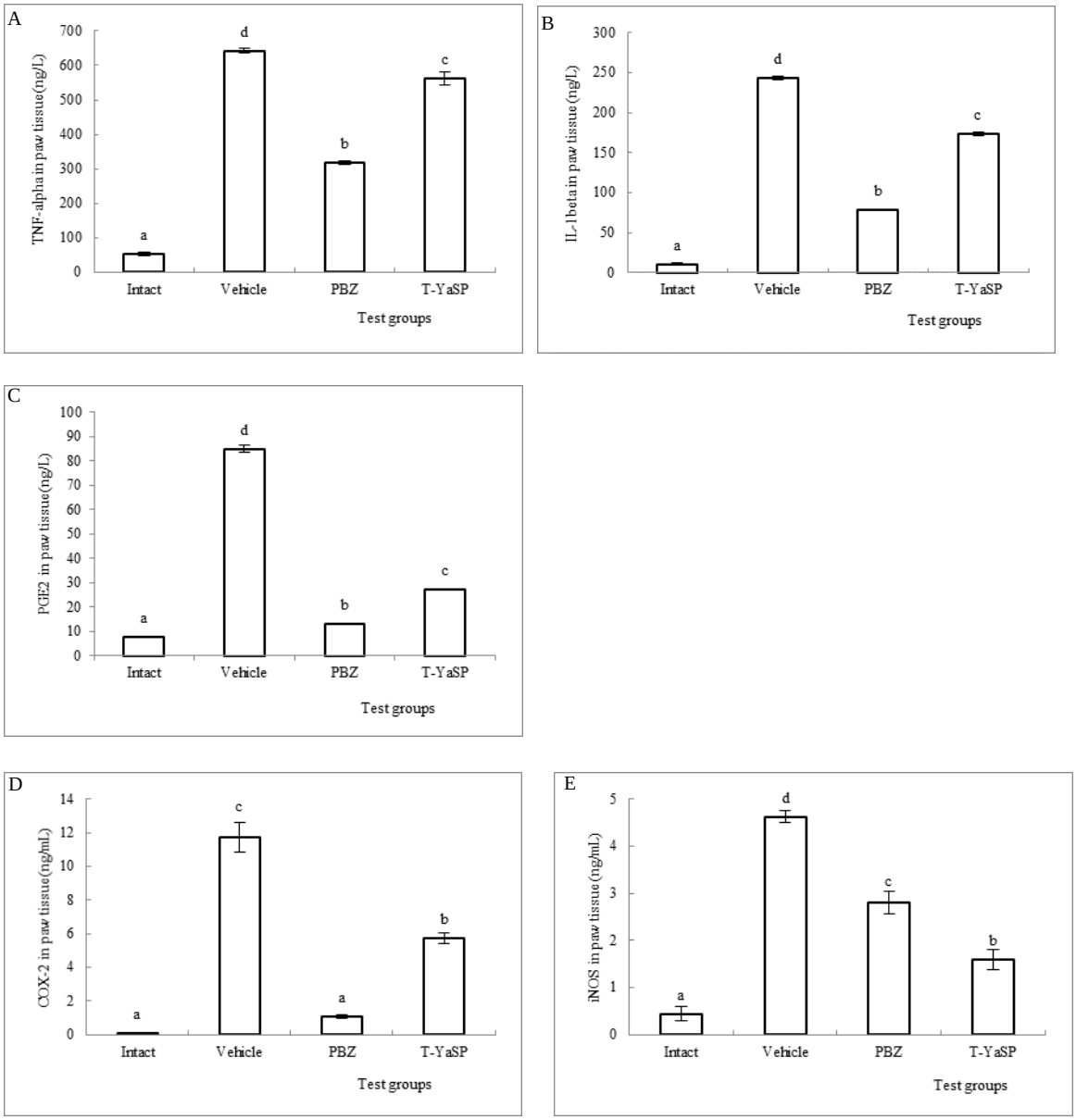
ตารางที่ 5.6 Effect of traditionally prepared-Ya-Samarn-Phlae (T-YaSP) on the production of malondialdehyde (MDA), nitric oxide (NO), and myeloperoxidase (MPO) in carrageenan-induced paw edema in rats.

Test groups	malondialdehyde (nmol/mg protein)	nitric oxide (μmol/g protein)	myeloperoxidase (U/g tissue)
intact	1.43±0.15[a]	11.19±1.15[a]	0.11±0.01[a]
vehicle	5.57±0.23[c]	105.91±2.93[c]	0.04±0.02[c]
phenylbutazone	3.06±0.21[b]	20.98±0.35[ab]	0.30±0.01[b]
T-YaSP	3.67±0.20[b]	29.78±2.04[b]	0.33±0.00[b]

Each value represents as the mean±SEM of five rats per group. [(a-c)] Values in the same column followed by a different letter are significantly different ($p< 0.001$). (One-way ANOVA followed by Duncan)

กลไกการลดการอักเสบในสัตว์ทดลองของยาน้ำมันสมานแผล (T-YaSP)

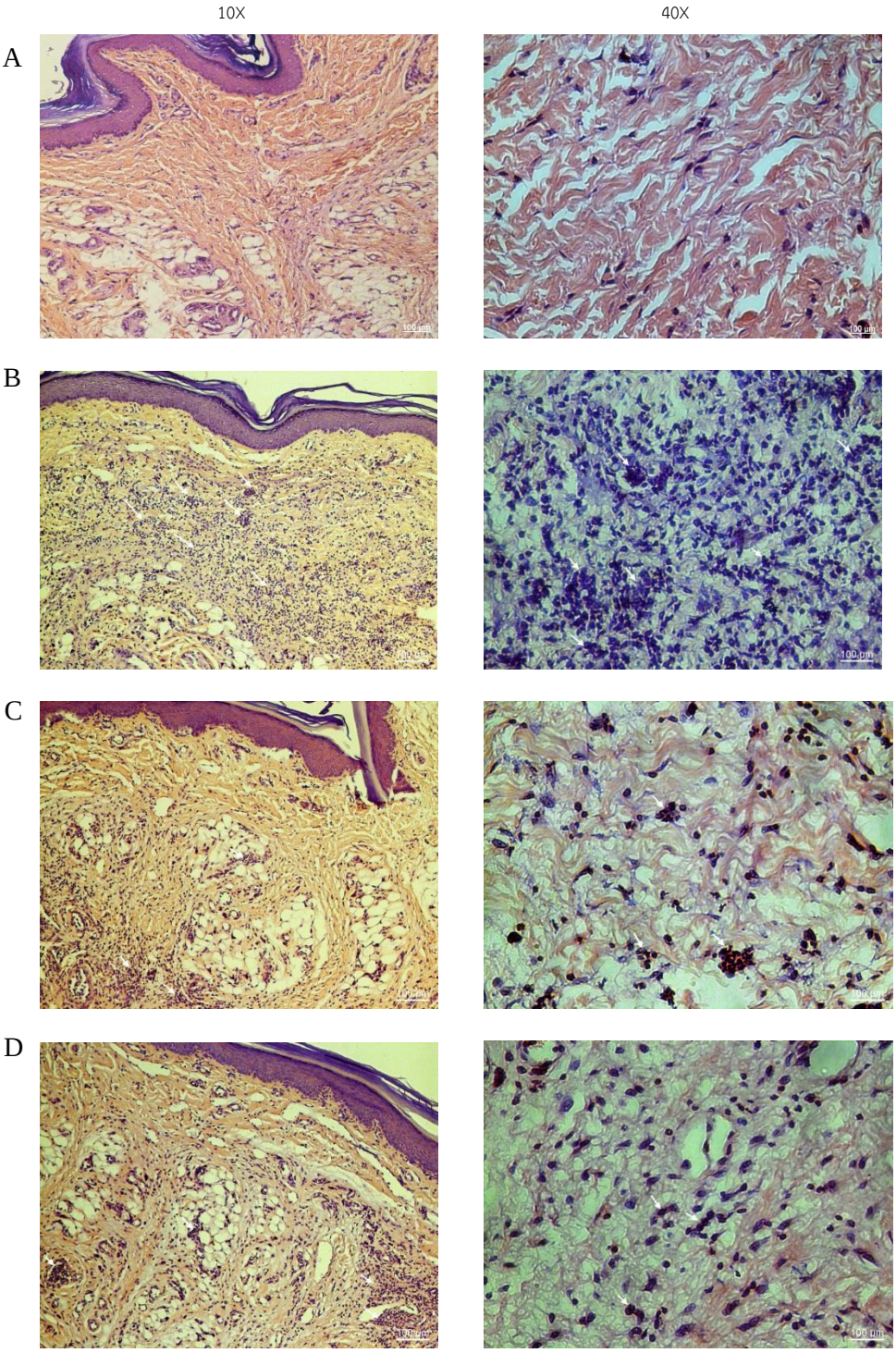
จากการทดสอบฤทธิ์ต้านอักเสบของยาสมานแผลในรูปแบบยาน้ำมันสมานแผล (T-YaSP) โดยใช้วิธี carrageenan induced rat paw edema และเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่ออักเสบ เพื่อตรวจวิเคราะห์ปริมาณของ pro-inflammatory cytokines ซึ่งได้แก่ tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) และ interleukin-1beta (IL-1beta) และตรวจวิเคราะห์ปริมาณของ pro-inflammatory enzymes ซึ่งได้แก่ inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase-2 (COX-2) พบว่า ที่เวลา 3 ชั่วโมงหลังจากการเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบด้วย carrageenan กลุ่ม control มีระดับของ TNF-alpha, IL-1beta, iNOS และ COX-2 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม intact ซึ่งเป็นเนื้อเยื่อปกติ ($P< 0.001$) และพบว่าในกลุ่มที่ได้รับการรักษาด้วย ยาน้ำมันสมานแผล และ phenylbutazone ซึ่งเป็นกลุ่ม positive มีระดับของ TNF-alpha, IL-1beta, iNOS และ COX-2 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม control ซึ่งได้รับ vehicle



รูปที่ 5.13 Effect of traditionally prepared-Ya-Samarn-Phlae (T-YaSP) on the expression of inflammatory cytokines, TNF-alpha (A), IL-1beta (B), and PGE2 (C) and the production of two inducible enzymatic pathways, COX-2 (D) and iNOS (E) in the rat paws treated with carrageenan. The values represent as mean±SEM of five rats. [(a-d)] Values in the same factor followed by a different letter are significantly different ($p< 0.001$). Phenylbutazone (PBZ) was used as a positive control.

ผลการการศึกษาทางจุลกายวิภาคของเนื้อเยื่ออักเสบ (Histological study) หลังจากได้รับของยาน้ำมันสมานแผล (T-YaSP)

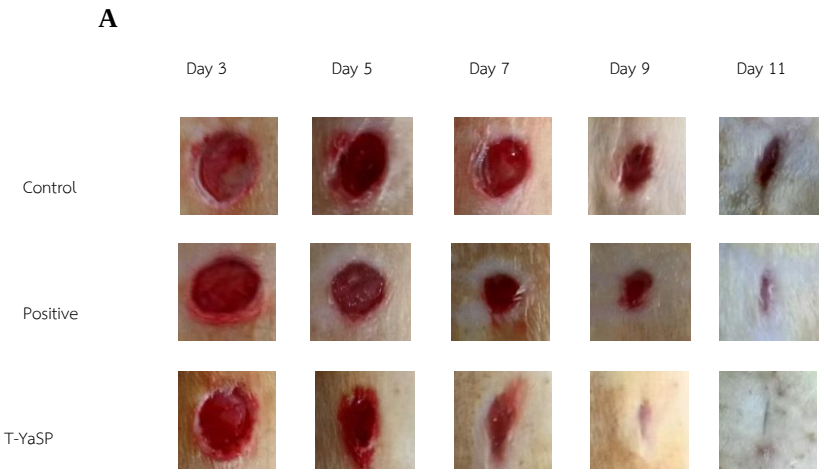
จากการศึกษาลักษณะทางจุลกายวิภาคของเนื้อเยื่ออักเสบ โดยใช้วิธีการย้อมด้วย H&E staining และดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง ที่กำลังขยาย 10X, 20X และ 40X กลุ่ม intact ซึ่งเป็นเนื้อเยื่อปกติ ไม่พบเซลล์อักเสบ ไม่พบการถูกทำลายของเนื้อเยื่อ และไม่พบการบวมของเนื้อเยื่อ กลุ่มควบคุมซึ่งได้รับ carrageenan ร่วมกับ vehicle พบเซลล์อักเสบซึ่งย้อมติดสีม่วงแกมน้ำเงินจำนวนมากในผิวหนังชั้น dermis และพบช่องว่างระหว่างเซลล์ ซึ่งบ่งชี้ถึงสภาวะการบวมของเนื้อเยื่อ กลุ่ม positive ซึ่งได้รับ carrageenan ร่วมกับ phenylburazone พบว่าความหนาแน่นของเซลล์อักเสบน้อยกว่ากลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับ carrageenan ร่วมกับยาน้ำมันสมานแผล (T-YaSP) นอกจากนี้พบว่ากลุ่มที่ได้รับ carrageenan ร่วมกับยาน้ำมันสมานแผล (T-YaSP) พบว่าความหนาแน่นของเซลล์อักเสบน้อยกว่ากลุ่มควบคุม นอกจากนี้พบว่าการเรียงตัวของ connective tissue ซึ่งย้อมติดสีส้มแดง ในกลุ่ม positive มีลักษณะใกล้เคียงกับเนื้อเยื่อปกติในกลุ่ม intact



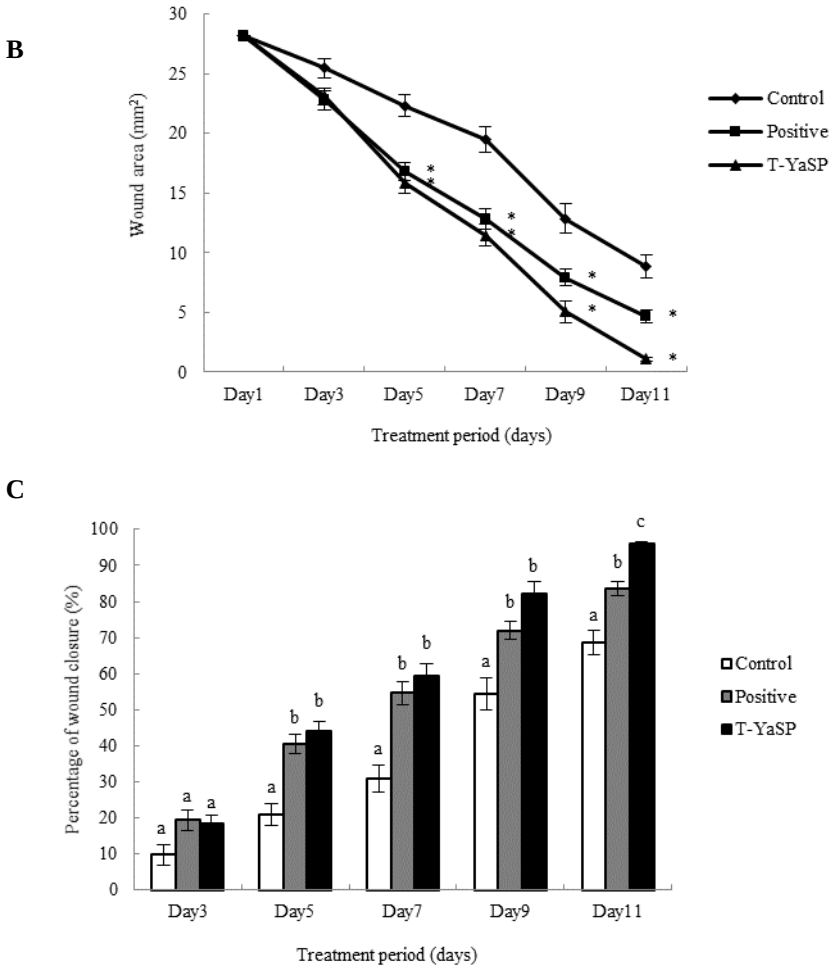
รูปที่ 5.14 Representative photomicrographs of the histopathological analysis from paw tissue of rats showing the protective effect of traditionally prepared-Ya-Samarn-Phlae (T-YaSP; D) compared with the intact group (A) or carrageenan-induced rat paw edema which treated vehicle (B) or phenylbutazone (PBZ; C) added a positive control. White arrows: neutrophils. Scale bar: 100 μm.

ผลการประเมินความสามารถในการสมานแผลของยาน้ำมันสมานแผล (T-YaSP)

จากการทดสอบฤทธิ์สมานแผลของยาน้ำมันสมานแผล (T-YaSP) โดยใช้หนูขาวเพศผู้ สายพันธุ์ Wistar rat และหนูเบาหวาน GK/slac พบว่า ในกลุ่มที่ได้รับการรักษาด้วยยาน้ำมันสมานแผล และ ยาน้ำมันทองนพคุณ ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุมบวก สามารถลดขนาดของแผลดีได้กว่ากลุ่มควบคุมได้ตั้งแต่วันที่ 5 ของการรักษาแผล ($p< 0.05$) และพบว่าการหายของแผลเมื่อใช้ยาน้ำมันสมานแผลเกือบเป็นปกติใช้เวลา 11 วัน ซึ่งดีกว่ายาน้ำมันทองนพคุณและกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



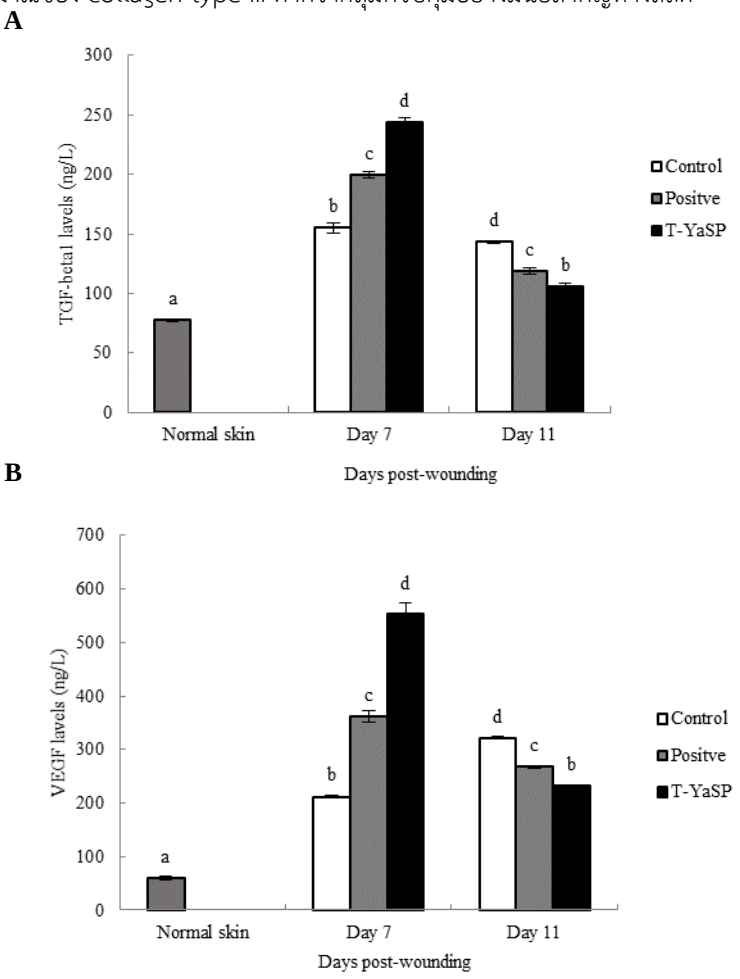
รูปที่ 5.15. Effect of traditionally prepared-Ya-Samarn-Phlae (T-YaSP) on contraction of excisional wound. The macroscopic changes (A), wound area (B) and %wound closure (C) of the skin wound sites in rats treated with simple oil base, TNK oil (positive), or T-YaSP on days 3, 5, 7, 9 and 11 after wounding. The results represent the mean±SEM of 9-10 animals per group. * $p< 0.05$ vs the control. $^{(a-c)}$ Values in the same days followed by a different letter are significantly different ($p< 0.05$). One-way ANOVA followed by Duncan.



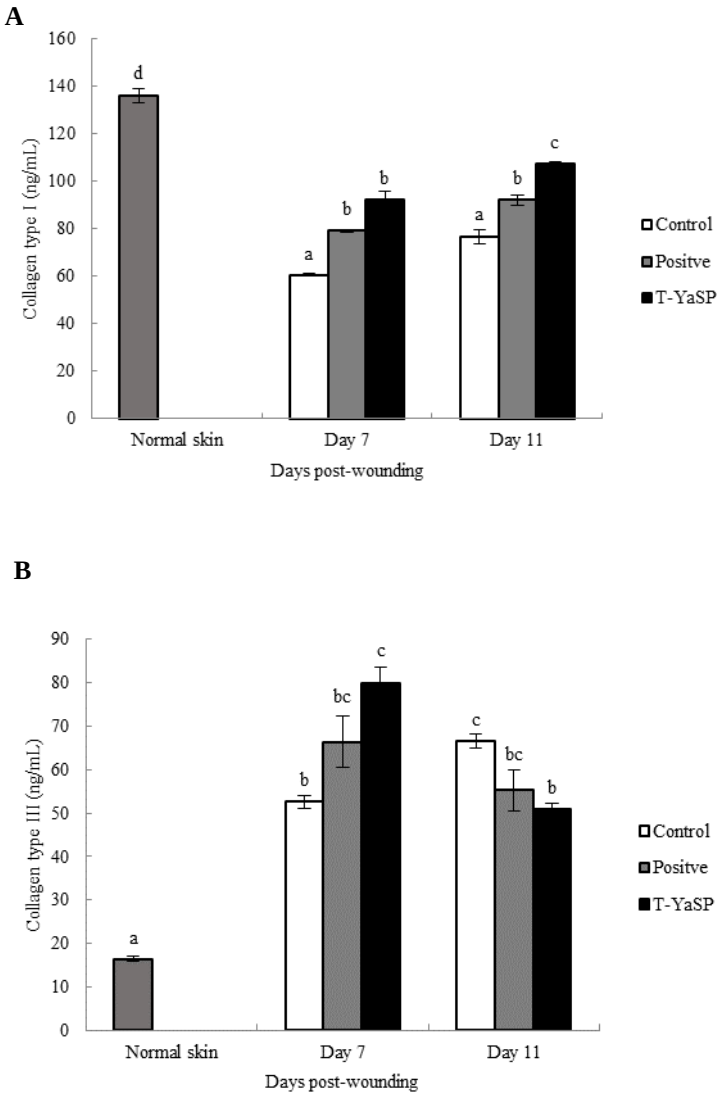
รูปที่ 23. Effect of traditionally prepared-Ya-Samarn-Phlae (T-YaSP) on contraction of excisional wound. The macroscopic changes (A), wound area (B) and %wound closure (C) of the skin wound sites in rats treated with simple oil base, TNK oil (positive), or T-YaSP on days 3, 5, 7, 9 and 11 after wounding. The results represent the mean±SEM of 9-10 animals per group. * $p< 0.05$ vs the control. $^{(a-c)}$ Values in the same days followed by a different letter are significantly different ($p< 0.05$). One-way ANOVA followed by Duncan.

กลไกการสมานแผลในสัตว์ทดลองของยาน้ำมันสมานแผล (T-YaSP)

จากการตรวจวิเคราะห์ปริมาณของ transforming growth factor beta1 (TGF-beta1) และ vascular endothelial growth factor (VEGF) ในเนื้อเยื่อแผล โดยใช้ enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit เมื่อผ่านไปเป็นเวลา 11 วัน พบว่า ในกลุ่มที่ได้รับการรักษาด้วยยาน้ำมันสมานแผล และ ยาน้ำมันทองนพคุณ ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุมบวกมี ปริมาณของ TGF-beta1 และ VEGF น้อยกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p< 0.05$) โดยที่ปริมาณของ TGF-beta1 และ VEGF ของกลุ่มที่ได้รับยาน้ำมันสมานแผลมีค่าต่ำกว่ากลุ่มที่ได้รับยาน้ำมันทองนพคุณอย่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในกลุ่มที่ได้รับการรักษาด้วยยาน้ำมันสมานแผล และ ยาน้ำมันทองนพคุณ มีปริมาณของ collagen type I สูงกว่ากลุ่มควบคุม และมีปริมาณของ collagen type III ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

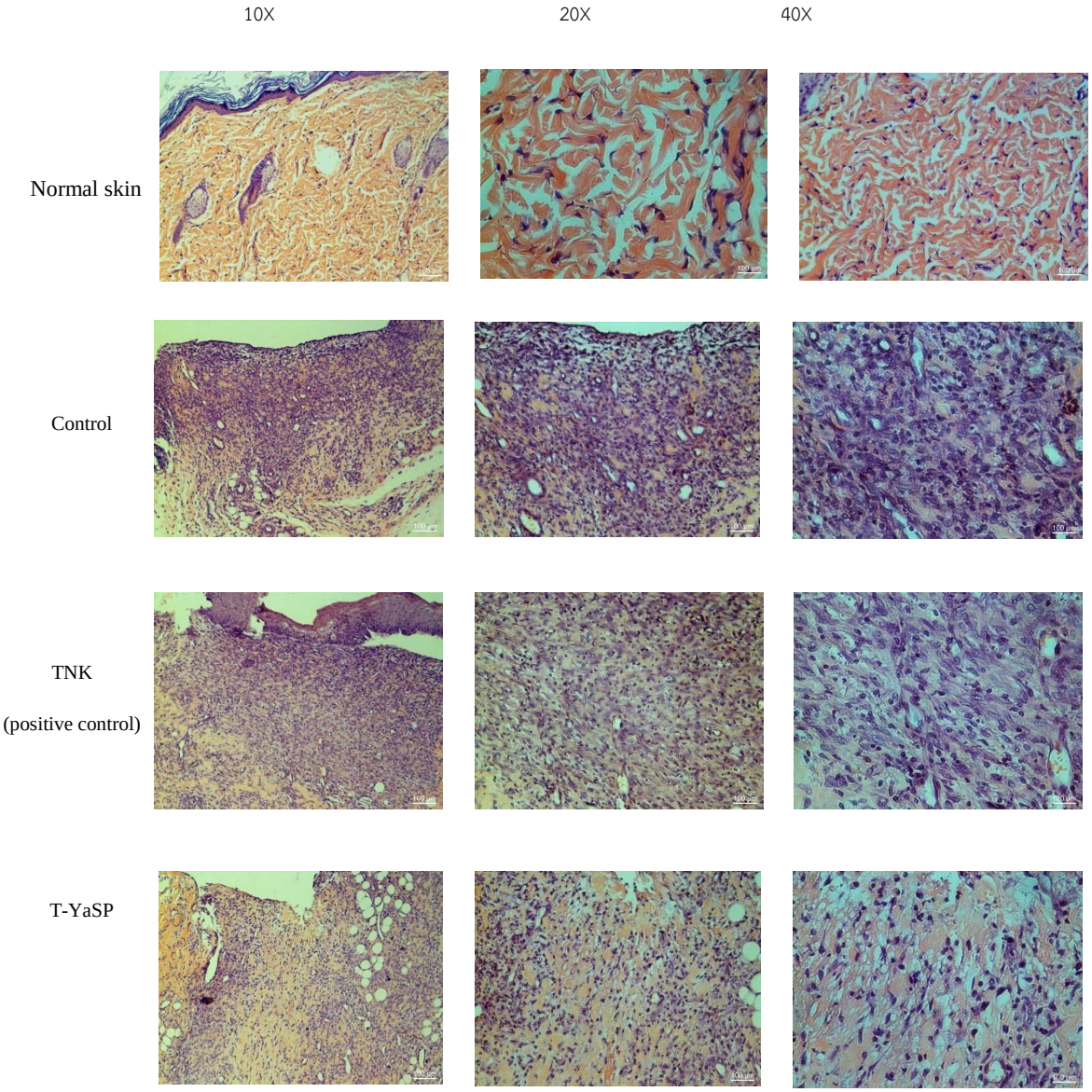


รูปที่ 5.16. The levels of TGF-beta 1 and VEGF in wounds treated with traditionally prepared-Ya-Samarn-Phlae (T-YaSP). Excisional wounds in rat were treated with simple oil base, TNK oil (positive), or T-YaSP during 11 days. The levels of TGF-beta 1 (A) and VEGF (B) evaluated by ELISA. The results represent the mean±SEM of 4-5 animals per group. $^{(a\text{-}c)}$ Values in the same days followed by a different letter are significantly different ($p< 0.001$). One-way ANOVA followed by Duncan.

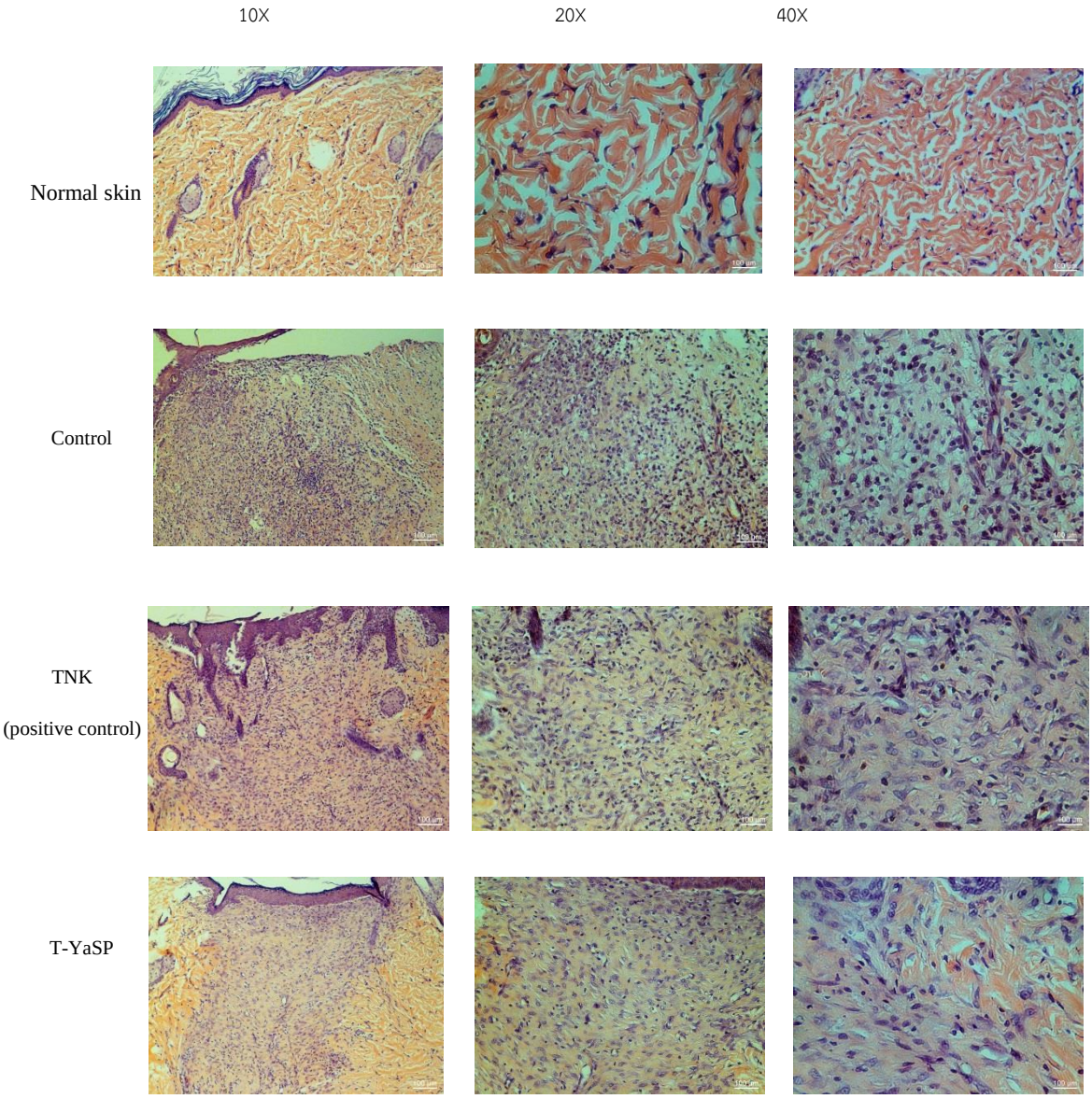


รูปที่ 5.17. The levels of collagen type I and type III in wounds treated with traditionally prepared-Ya-Samarn-Phlae (T-YaSP). Excisional wounds in rat were treated with simple oil base, TNK oil (positive), or T-YaSP for 11 days. The levels of collagen type I (A) and type III (B) evaluated by ELISA. The results represent the mean±SEM of 4-5 animals per group. [(a-c)] Values in the same days followed by a different letter are significantly different ($p< 0.001$). One-way ANOVA followed by Duncan.

ผลการการศึกษาทางจุลกายวิภาคของเนื้อเยื่อ (Histological study) หลังจากได้รับของยาน้ำมันสมานแผล (T-YaSP)



รูปที่ 5.28.. Histology of wound tissue at day 7 after wounding in rats, stained with hematoxylin and eosin and treated with base oil (control), Thongnoppakhun oil (TNK; positive), traditionally prepared-Ya-Samarn-Phlae (T-YaSP) and normal tissue (magnification 10X, 20X and 40X).



รูปที่ 5.19. Histology of wound tissue at day 11 after wounding in rats, stained with hematoxylin and eosin and treated with base oil (control), Thongnoppakhun oil (TNK; positive), traditionally prepared-Ya-Samarn-Phlae (T-YaSP) and normal tissue (magnification 10X, 20X and 40X).

6. วิจารณ์ผล

P. aeruginosa และ *S. epidermidis* เป็นแบคทีเรียฉวยโอกาสที่พบได้บ่อยในการติดเชื้อบริเวณบาดแผล แบคทีเรียจะยึดเกาะบนเนื้อเยื่อและเกิดการสร้างไบโอฟิล์ม ส่งผลให้บาดแผลกลายเป็นแผลเรื้อรังที่รักษาได้ยาก เนื่องจากไบโอฟิล์มมีความต้านทานต่อการถูกทำลายด้วยระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายและยาปฏิชีวนะสูงกว่าแบคทีเรียในสภาวะปกติ (planktonic cell) (Shankar *et al.,* 2005; Galkowska *et al.,* 2009; Metcalf *et al.,* 2015) แม้ว่าการใช้ยาปฏิชีวนะ vancomycin ที่ความเข้มข้นสูงกว่ากว่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย (minimal inhibitory concentration; MIC) และสูงกว่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถฆ่าแบคทีเรีย (minimal bactericidal concentration; MBC) สามารถยับยั้งและฆ่าแบคทีเรียในสภาวะปกติได้ แต่ยังไม่สามารถฆ่า *S. epidermidis* ในสภาวะไบโอฟิล์ม (Drenkard *et al.,* 2003) นอกจากนี้ไบโอฟิล์มยังส่งผลกระทบต่อกระบวนการสมานแผล (wound healing) (Metcalf *et al.,* 2015) ดังนั้นการลดหรือทำลายไบโอฟิล์มจึงเป็นสิ่งที่สำคัญต่อการสมานแผล เช่นสารสกัด *Buchanania lanzan* มีประสิทธิภาพในการสมานแผลในหนูขาว ร่วมกับฤทธิ์ยับยั้งและทำลายไบโอฟิล์ม (Pattnaik *et al.,* 2013) ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์หลักในการอภิปรายผลการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มและการทำลายไบโอฟิล์มของแบคทีเรียที่ก่อไบโอฟิล์มบริเวณบาดแผลคือ *P. aeruginosa* และ *S. epidermidis* ของยาสมานแผล โดยทำการเปรียบเทียบระหว่างยาที่เตรียมจากสมุนไพรสดและสมุนไพรแห้ง

ความต้านทานของไบโอฟิล์มส่งผลให้การรักษาโรคติดเชื้อเป็นไปได้ยากยิ่งขึ้นและยังก่อให้เกิดปัญหาการติดเชื้อซ้ำ ดังนั้นการจัดการกับปัญหาดังกล่าวจึงมีความสำคัญต่อประสิทธิภาพในการรักษาและลดความรุนแรงของการติดเชื้อก่อนที่แบคทีเรียจะเกิดการพัฒนาไบโอฟิล์ม (McCann *et al.,* 2008; Yang *et al.,* 2012) ก่อนหน้านี้มีรายงานงานการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มหลายฉบับทั้งในสมุนไพรเดี่ยวและสารองค์ประกอบทางเคมี เช่น สารสกัดจากใบกระทุและสารองค์ประกอบทางเคมี berberine มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของ *S.epidermidis* (Saising *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2009) สารสกัดจากต้นน้ำนมราชสีห์และน้ำมันอบเชยมีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของ *P. aeruginosa* (Perumal and Mahmud, 2013; Kavanaugh *et al.*, 2012) สารสกัดของใบชุมเห็ดเทศมีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มทั้ง *P. aeruginosa* และ *S. epidermidis* เป็นต้น (Saito *et al.*, 2012) ซึ่งในการศึกษาในครั้งนี้ได้ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มทั้งหมด 3 วิธี ได้แก่ crystal violet assay ทดสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด และกล้องจุลทรรศน์แรงอะตอม พบว่า สารทดสอบทั้ง 4 ชนิดมีประสิทธิภาพยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของ *P. aeruginosa* ATCC10145 และ *S. epidermidis* ATCC35984 ได้ทั้งบนพื้นผิวโพลีสไตรีนและพื้นผิวแก้ว โดยสารทดสอบมีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของ *P. aeruginosa* ได้ดีกว่า *S. epidermidis* โดยที่ความเข้มข้น 50 %v/v ยาสมานแผลเตรียมจากสมุนไพรแห้งและน้ำมันสกัดเปลือกมังคุดแห้งมีประสิทธิภาพดีใกล้เคียงกัน และมีประสิทธิภาพดีกว่ายาสมานแผลเตรียมจากสมุนไพรสดและน้ำมันสกัดเปลือกมังคุดสด อย่างไรก็ตามบางความเข้มข้นที่ทดสอบมีผลต่อการเจริญเติบโตของ *P. aeruginosa* และ *S. epidermidis* โดยที่ความเข้มข้น 0.78 %v/v ซึ่งเป็นค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ใช้ในการทดสอบพบว่าสารทดสอบทั้ง 4 ชนิดมีประสิทธิภาพยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของ *P. aeruginosa* ได้มากกว่าร้อยละ 70 และยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของ *S. epidermidis* ได้ร้อยละ 40 ซึ่งสารทดสอบดังกล่าวมีประสิทธิภาพดีกว่าสารทดสอบชนิดอื่นที่เคยมีรายงานไว้ ดังเช่นรายงานการศึกษาด้วยสาร

oregano, carvacrol และ thymol พบว่าที่ความเข้มข้น 0.06, 0.01 และ 0.03 %v/v ตามลำดับ มีประสิทธิภาพยับยั้งสร้างไบโอฟิล์มของ *P. aeruginosa* ได้ประมาณร้อยละ 35 (Nostro *et al.,* 2007) สารสกัดขิงที่ความเข้มข้น 1, 5, และ 10% ประสิทธิภาพยับยั้งสร้างไบโอฟิล์มของ *S. epidermidis* ได้ร้อยละ 39-56 ทั้งนี้ผลการศึกษาดังกล่าวยังสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Chusri และคณะ ที่ได้รายงานว่าสารสกัดเอทานอลของยาสมานแผลมีประสิทธิภาพในการยับยั้งสร้างไบโอฟิล์มของ *P. aeruginosa* ATCC10145 ได้ทั้งพื้นผิวโพลีสไตรีนและพื้นผิวแก้ว (Chusri *et al.,* 2013) โดยแสดงค่าการยับยั้งไบโอฟิล์มได้มากกว่าร้อยละ 80 และสามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของ *S. epidermidis* ATCC35984 คิดเป็นร้อยละ 30-40 (Chusri *et al.,* 2012) มีรายงานการศึกษาในสารสกัดเอทานอลของยาสมานแผล สารสกัดเอทานอลของมังคุด และขมิ้นที่ความเข้มข้น 1/2MIC-1/32MIC มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของแบคทีเรียกลุ่ม staphylococci ที่แยกได้จากโรคเต้านมโค (สิริรัตน์ ทองรอด, 2556) นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาในสมุนไพรองค์ประกอบของยาสมานแผล พบว่า สารองค์ประกอบทางเคมี alpha-mangostin ในเปลือกมังคุดมีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของ *S. mutans* (Nguyen and Marquis, 2011) แต่ไม่พบรายงานการศึกษาฤทธิ์ต้านไบโอฟิล์มของ *P. aeruginosa* และ *S. epidermidis* ในขณะที่ขมิ้นมีรายงานว่าสารองค์ประกอบทางเคมี curcumin มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของ *P. aeruginosa* (Packiavathy *et al*., 2013) *H. pylori* (Pattiyathanee *et al*., 2009) สำหรับหมากมีรายงานการศึกษาพบว่าสารสกัดจากเมล็ดหมากมีฤทธิ์ยับยั้งระบบ quorum-sensing ของ *P. aeruginosa* (Koh and Tham, 2011) แต่ไม่พบรายงานการศึกษาฤทธิ์ต้านไบโอฟิล์มในข้าวสาร ซึ่งผลการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มอาจเกิดจากสารทดสอบมีผลไปยับยั้งปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการสร้างไบโอฟิล์ม เช่น ยับยั้งการยึดเกาะ ยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์ หรืออาจยับยั้งการสร้างสารเอ็กซ์โซพอลิแซคคาไรด์ (Chusri *et al.,* 2013; Saito *et al*., 2012) ดังที่เคยมีการรายงานว่า oregano oil สามารถทำปฏิกิริยากับโปรตีนที่ผิวเซลล์ซึ่งนำไปสู่การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของผิวเซลล์ ส่งผลให้เกิดการยึดเกาะบนพื้นผิวโพลีสไตรีนได้ลดลง (Nostro *et al*., 2007) ดังนั้นจึงสรุปได้ว่ายาสมานแผลเตรียมจากสมุนไพรแห้งและน้ำมันสกัดเปลือกมังคุดแห้งเป็นสูตรตำรับที่น่าสนใจในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มได้ทั้ง *P. aeruginosa* และ *S. epidermidis*

เมื่อไบโอฟิล์มเกิดการพัฒนาจนเข้าสู่ระยะการเจริญเติบโตโดยสมบูรณ์ ไบโอฟิล์มจะมีความต้านทานสูงต่อการถูกทำลายจากระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายและยาปฏิชีวนะมากถึง 1,000 เท่าเมื่อเทียบกับแบคทีเรียในสภาวะปกติ (Wang *et al*., 2009) ในการศึกษาในครั้งนี้ได้ศึกษาการทำลายไบโอฟิล์มที่มีอายุ 3 วันซึ่งเป็นไบโอฟิล์มที่อยู่ในระยะการเจริญเติบโตโดยสมบูรณ์ สอดคล้องกับรายงานการศึกษาก่อนหน้านี้ที่รายงานว่าไบโอฟิล์มของ *P. aeruginosa* ที่มีอายุ 3 วันเป็นไบโอฟิล์มที่อยู่ในระยะการเจริญเติบโตโดยสมบูรณ์ (Alkawareek *et al.,* 2012) สำหรับ *S. epidermidis* มีรายงานว่าไบโอฟิล์มที่อยู่ในระยะการเจริญเติบโตโดยสมบูรณ์มีอายุ 7 วัน (Chusri *et al.,* 2012) แต่อย่างไรก็ตามมีรายงานของ Oliveira และคณะรายงานว่า *S. epidermidis* จำนวน 22 สายพันธุ์ คิดเป็น 75.9% ของ *S. epidermidis* ทั้งหมด เกิดการสร้างไบโอฟิล์มมากที่สุดในวันที่ 3 (Oliveira *et al*., 2007) ทั้งนี้ความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มอาจมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของแบคทีเรีย ตลอดจนสภาพแวดล้อมที่แบคทีเรียเจริญเติบโต (Donlan, 2002; Vu *et al*., 2009) ในการศึกษาฤทธิ์ทำลายไบโอฟิล์มมีเกณฑ์ในการพิจารณาว่าสารที่มีประสิทธิภาพดีควรมีฤทธิ์ทำลายไบโอฟิล์มได้มากกว่าร้อยละ 40 (Pitts *et* al., 2003) ซึ่งการศึกษาในครั้งนี้ทำการทดสอบฤทธิ์การทำลายไบโอฟิล์มที่ด้วยวิธี MTT reduction assay และทดสอบด้วยกล้อง

จุลทรรศน์แบบคอนโฟคอลชนิดที่ใช้เลเซอร์ในการสแกน จากผลการศึกษาที่ได้พบว่า ยาสมานแผลเตรียมจากสมุนไพรแห้งมีประสิทธิภาพในการทำลายไบโอฟิล์มทั้งบนพื้นผิวโพลีสไตรีนและพื้นผิวแก้ว โดยแสดงฤทธิ์ทำลายไบโอฟิล์มของ *P. aeruginosa* ร้อยละ 50 หลังจากการทดสอบเป็นเวลา 3-9 ชั่วโมง และทำลายไบโอฟิล์มของ *S. epidermidis* ร้อยละ 45-70 หลังจากการทดสอบเป็นเวลา 3-18 ชั่วโมง ในระยะเวลาทดสอบเดียวกันนั้นน้ำมันสกัดเปลือกมังคุดแห้งมีประสิทธิภาพทำลายไบโอฟิล์มได้ร้อยละ 40 และน้อยกว่าร้อยละ 40 ตามลำดับ ในขณะที่ผลการศึกษาที่ได้จากกล้องจุลทรรศน์แบบคอนโฟคอลชนิดที่ใช้เลเซอร์ในการสแกนที่แสดงให้เห็นว่ายาสมานแผลเตรียมจากสมุนไพรแห้งมีประสิทธิภาพในการทำลายไบโอฟิล์มได้ดีเช่นเดียวกับน้ำมันสกัดเปลือกมังคุดแห้ง จากผลการศึกษาที่ได้สอดคล้องกับรายงานการศึกษาก่อนหน้านี้ที่ได้รายงานว่ายาปฏิชีวนะ vancomycin ที่ความเข้มข้น 500 และ 1,000 µg/ml ซึ่งเป็นความเข้มข้นสูงกว่าค่า MIC มีประสิทธิภาพในการทำลายไบโอฟิล์มของ *S. epidermidis* บนพื้นผิวโพลีสไตรีน และจากภาพถ่าย ไบโอฟิล์มด้วยกล้องแบบคอนโฟคอลชนิดที่ใช้เลเซอร์ในการสแกน พบว่ายาปฏิชีวนะดังกล่าวสามารถฆ่าเซลล์ภายในไบโอฟิล์มที่ยึดเกาะบนพื้นผิวพลาสติก (El-Azizi *et al.*, 2005) ยาปฏิชีวนะ ciprofloxacin ที่ความเข้มข้น 1-100 µM พบว่าสามารถทำลายไบโอฟิล์มของ *P. aeruginosa* บนพื้นผิวโพลีสไตรีนได้ประมาณร้อยละ 60 และที่ความเข้มข้น 12.5 µM สามารถฆ่าเซลล์ในไบโอฟิล์ม (Kapoor *et al.*, 2011) และสารสำคัญในพืชมีรายงานว่าสาร carvacrol ที่ความเข้มข้น 1 %v/v มีฤทธิ์ทำลายไบโอฟิล์มของ *S. epidermidis* บนพื้นผิวโพลีสไตรีนได้มากกว่าร้อยละ 50 หลังจากทดสอบเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (Nostro *et al.*, 2012) ในทางกลับกันยาสมานแผลเตรียมจากสมุนไพรแห้งมีประสิทธิภาพทำลายไบโอฟิล์มได้ดีกว่ายาปฏิชีวนะ tobramycin ที่ความเข้มข้น 1-100 µM มีฤทธิ์ทำลายไบโอฟิล์มของ *P. aeruginosa* ได้ร้อยละ 30 (Kapoor *et al.*, 2011) และสาร 3-hydroxydihydrobenzofuran glycosides ซึ่งเป็นสารองค์ประกอบทางเคมีที่พบในใบของ *Helichrysum italicum* ที่ความเข้มข้น 128 µg/ml มีฤทธิ์ทำลายไบโอฟิล์มของ *P. aeruginosa* บนพื้นผิวโพลีสไตรีนได้เพียงร้อยละ 16 (D'Abrosca *et al.*, 2013) นอกจากนี้เคยมีรายงานการศึกษาด้วยสารสกัดเอทานอลของยาสมานแผล ระบุว่าสารสกัดเอทานอลของยาสมานแผลที่ความเข้มข้น 10 µg/ml สามารถทำลายไบโอฟิล์มของ *S. epidermidis* ได้มากกว่าร้อยละ 60 หลังจากได้รับสารทดสอบเป็นเวลา 1 ชั่วโมง และหลังจากทดสอบเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ไบโอฟิล์มถูกทำลายมากกว่าร้อยละ 90 (Chusri *et al.,* 2012) สารสกัดเอทานอลของยาสมานแผลที่ความเข้มข้น 62.5 µg/ml สามารถทำลายไบโอฟิล์มของ *P. aeruginosa* ได้ร้อยละ 50 และไบโอฟิล์มถูกทำลายได้ร้อยละ 97.3 หลังจากทดสอบเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (Chusri *et al.,* 2013) จากผลการศึกษาดังกล่าวแสดงผลไปในทิศทางเดียวกันกับการทดสอบในครั้งนี้ โดยยาสมานแผลที่เตรียมจากสมุนไพรแห้งมีประสิทธิภาพทำลายไบโอฟิล์มของ *P. aeruginosa* และ *S. epidermidis* ได้ดี

การควบคุมคุณภาพและความปลอดภัยเป็นอีกหนึ่งปัญหาสำคัญของการพัฒนาผลิตภัณฑ์สมุนไพร (Xie *et al.,* 2006) ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงทดสอบปริมาณสารองค์ประกอบทางเคมี alpha-mangostin ซึ่งจากรายงานการวิจัยก่อนหน้านี้เป็นสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสารองค์ประกอบทางเคมี catechin ในหมากและสารองค์ประกอบทางเคมี curcumin ในขมิ้น (สิริรัตน์ ทองรอด, 2556) จากผลการศึกษาที่ได้พบว่าน้ำมันสกัดเปลือกมังคุดแห้งมีปริมาณสารองค์ประกอบทางเคมี alpha-mangostin มากที่สุด รองลง มาคือน้ำมันสกัดเปลือกมังคุดสด ยาสมานแผลเตรียมจากสมุนไพรแห้ง และยาสมานแผลเตรียมจากสมุนไพรสด แม้ว่าประสิทธิภาพในการต้านไบโอฟิล์มของยา

สมานแผลเตรียมจากสมุนไพรแห้งและน้ำมันสกัดเปลือกมังคุดแห้งมีประสิทธิภาพดีใกล้เคียงกัน แต่สารองค์ประกอบทางเคมี alpha-mangostin ในน้ำมันสกัดเปลือกมังคุดแห้งมีปริมาณมากกว่ายาสมานแผลเตรียมจากสมุนไพรแห้งประมาณ 2 เท่า แสดงให้เห็นว่าประสิทธิภาพในการต้านไบโอฟิล์มไม่ได้ขึ้นอยู่กับปริมาณสารองค์ประกอบทางเคมี alpha-mangostin เพียงอย่างเดียว ดังตัวอย่างรายงานการศึกษาจากประเทศจีนที่ได้ทำการวิเคราะห์ปริมาณสารองค์ประกอบทางเคมีในยาสมุนไพรจีน SiJunZiTang ซึ่งประกอบ ด้วยสมุนไพร 4 ชนิด พบสารองค์ประกอบทางเคมีทั้งหมด 66 ชนิด โดยมีสาร ginsenosides และ flavonoids เป็นสารองค์ประกอบหลัก (Wang *et al.,* 2013) ดังนั้นในการศึกษาต่อไปควรทำ การศึกษา chemical fingerprints ดังที่มีการวิจัยในยาสมุนไพรต่างๆ เพื่อใช้เป็นแนวทางในการควบคุมภาพต่อไป

นอกจากนี้จากผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนังด้วยสารสกัดเฮกเซนและสารสกัดเอทานอลของสมุนไพรแห้งในองค์ประกอบของยาสมานแผล และเปลือกมังคุดแห้ง พบว่า สารทดสอบทั้ง 4 ชนิด มีค่า IC_{50} มากกว่า 10 µg/ml และสารองค์ประกอบทางเคมี alpha-mangostin มีค่า IC_{50} มากกว่า 4 µg/ml ซึ่งมีความเป็นพิษน้อยกว่า ellipticine (IC_{50} = 3.7 µg/ml) โดยก่อนหน้านี้มีรายงานการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดเอทานอลและสารสกัดน้ำของยาสมานแผลต่อ vero cell พบว่าสารสกัดเอทานอลของยาสมานแผลมีค่า IC_{50} เท่ากับ 45.68 µg/ml ซึ่งมีความเป็นพิษในระดับปานกลาง ในขณะที่สารสกัดน้ำมีค่า IC_{50} มากกว่า 500 µg/ml (Chusri *et al.,* 2013) แสดงให้เห็นว่าสารสกัดเอทานอลของยาสมานแผลมีความเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนังต่ำกว่า vero cell สอดคล้องกับรายงานการศึกษาของ Wang และคณะที่ทำการศึกษาความเป็นพิษของสารแซนโทนที่เป็นสารองค์ประกอบทางเคมีในเปลือกมังคุดต่อเซลล์ผิวหนัง (normal skin fibroblast CCD-1064Sk cell line) พบว่า สารองค์ประกอบทางเคมี alpha-mangostin, gamma-mangostin และ 8-deoxygartanine มีความเป็นพิษต่ำ โดยแสดงค่า IC_{50} เท่ากับ 7.27, 11.33 และ 10.35 µg/ml ตามลำดับ (Wang *et al.,* 2011)

เอกสารอ้างอิง

Abeeleh M.A., Ismail Z.B., Alzaben K.R. Abu-Halaweh S.A., Al-Essa M.K., Abuabeeleh J. and et al. 2009. Induction of diabetes mellitus in rats using intraperitoneal streptozotocin: a comparison between 2 strains of rats. European Journal of Scientific Research. 32, 398-402.

Afrose R., Saha S.K., Banu L.A., Ahmed A.U., Shahidullah A.S., Gani A. and et al. 2015. Antibacterial effect of *Curcuma longa* (turmeric) against *Staphylococcusaureus* and *Escherichia coli*. Mymensingh Medical Journal. 24, 506-515.

Ahima R.S., Prabakaran D., Mantzoros C., Qu D., Lowell B., Maratos-Flier E. and et al. 1996. Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. Nature. 382, 250-252.

Akbik D., Ghadiri M., Chrzanowski W. and Rohanizadeh R. 2014. Curcumin as a wound healing agent. Life Sciences. 116, 1-7.

Akkol E.K., Koca U., Pesin I., Yılmazer D., Toker G. and Yesilada E. 2009. Exploring the wound healing activity of Arnebia densiflora (Nordm.) Ledeb. by in vivo models. Journal of Ethnopharmacology. 124, 137-141.

Alerico G.C., Beckenkamp A., Vignoli-Silva M., Buffon A. and Poser G.L. 2015. Proliferative effect of plants used for wound healing in Rio Grande do Sul state, Brazil. Journal of Ethnopharmacology. 176, 305-310.

Al-Mulla F., Leibovich S.J., Francis I.M. and Bitar M.S. 2011. Impaired TGF-beta signaling and a defect in resolution of inflammation contribute to delayed wound healing in a female rat model of type 2 diabetes. Molecular Biosystems. 7, 3006-3020.

Anajwala C.C., Patel R.M., Dakhara S.L. and Jariwala J.K. 2010. In vitro cytotoxicity study of agave americana, strychnos nuxvomica and areca catechu extracts using mcf-7 cell line. Journal of Advanced Pharmaceutical Technology and Research. 1, 245-52.

Archbold H.C., Yang Y.X., Chen L. and Cadigan K.M. 2012. How do they do Wnt they do? Regulation of transcription by the Wnt/beta-catenin pathway. Acta Physiologica. 204, 74-109.

Arora S., Ojha S.K. and Vohora D. 2009. Characterisation of streptozotocin induced diabetes mellitus in swiss albino mice. Global Journal of Pharmacology. 3, 81-84.

Athar M., Tang X., Lee J.L., Kopelovich L. and Kim A.L. 2006. Hedgehog signalling in skin development and cancer. Experimental Dermatology. 15, 667-677.

Arulmozhi D.K., Veeranjaneyulu A. and Bodhankar S.L. 2004. Neonatal streptozotocin induced rat model of T Neonatal streptozotocin-induced rat model of Type 2 diabetes type 2 diabetes mellitus: A glance mellitus: A glance. Indian Journal of Pharmacology. 36, 217-221.

Arwert E.N., Hoste E. and Watt F.M. 2012. Epithelial stem cells, wound healing and cancer. Nature reviews. 12, 171-180.

Asai J., Takenaka H., Kusano K.F., Ii M., Luedemann C., Curry C. and et al. 2006. Topical sonic hedgehog gene therapy accelerates wound healing in diabetes by enhancing endothelial progenitor cell-mediated microvascular remodeling. Circulation. 113, 2413-2424.

Ashcroft G.S., Yang X., Glick A.B., Weinstein M., Letterio J.L., Mizel D.E. and et al.1999. Mice lacking Smad3 show accelerated wound healing and an impaired local inflammatory response. Nature Cell Biology. 1, 260-266.

Barrientos S., Stojadinovic O., Golinko M.S., Brem H. and Tomic-Canic M. 2008. Growth factors and cytokines in wound healing. Wound Repair and Regeneration. 16, 585-601.

Belhekar S.N., Chaudhari P.D., Saryawanshi J.S., Mali K.K. and Panshare R.B. 2013. Antidiabetic and antihyperlipidemic effects of *Thespesia populnea* fruit pulp extracts on alloxan-induced diabetic rats. Indian Journal of Pharmaceutical Sciences. 75, 217-221.

Belle T.L., Coppieters K.T. and Herrath M.G. 2011. Type 1 diabetes: etiology, immunology, and therapeutic strategies. Physiological Reviews. 91, 79-118.

Bermudez D.M., Herdrich B.J., Xu J., Lind R., Beason D.P., Mitchell M.E. and et al. 2011. Impaired biomechanical properties of diabetic skin. The American Journal of Pathology. 178, 2215-2223.

Beukelman C.J., Berg A.J.J., Hoekstra M.J., Uhl R., Reimer K. and Mueller S. 2008. Anti-inflammatory properties of a liposomal hydrogel with povidone-iodine (Repithel®) for wound healing in vitro. Burns. 34, 845-855.

Bhandare A.M., Kshirsagar A.D., Vyawahare N.S., Hadambar A.A. and Thorve V.S 2010. Potential analgesic, anti-inflammatory and antioxidant activities of hydroalcoholic extract of *Areca catechu* L. nut. Food and Chemical Toxicology 48, 3412-3417.

Bigliardi P.L., Alsagoff S.A.L., El-Kafrawi H.Y., Pyon J., Wa C.T.C. and Villa M.A. 2017. Povidone iodine in wound healing: A review of current concepts and practices. International Journal of Surgery. 44, 260-268.

Birdsey G.M., Shah A.V., Dufton N., Reynolds L.E., Osuna Almagro L., Yang Y., and et al. 2015. The endothelial transcription factor ERG promotes vascular stability and growth through Wnt/beta-catenin signaling. Developmental Cell. 32, 82-96.

Bielefeld K.A., Amini-Nik S. and Alman B.A. 2013. Cutaneous wound healing: recruiting developmental pathways for regeneration. Cellular and Molecular Life Sciences. 70, 2059-2081.

Bradley P.P.,Priebat D.A., Christensen R.D. and Rothstein G. 1982. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzymemarker. The journal of investigative dermatology. 78, 206-209.

Brancato S.K. and Albina J.E. 2011. Wound macrophages as key regulators of repair origin, phenotype, and function. The American Journal of Pathology. 178, 19-25.

Brown R.L., Ormsby I., Doetschman T.C. and Greenhalgh D.G. 1995. Wound healing in the transforming growth factor-b-deficient mouse. Wound Repair and Regeneration. 3, 25-36.

Brussee V., Guo G., Dong Y., Cheng C., Martinez J.A., Smith D. and et al. 2008. Distal degenerative sensory neuropathy in a long-term type 2 diabetes rat model. Diabetes. 57, 1664-1673.

Bueno F.G., Moreira E.A., Morais G.R., Pacheco I.A., Baesso M.L., Leite-Mello E.V.S. and et al. 2016. Enhanced cutaneous wound healing *in vivo* by standardized crude extract of *Poincianella pluviosa*. PLOS ONE, 11, 1-13.

Caiado F., Real C., Carvalho T. and Dias S. 2008. Notch pathway modulation on bone marrow-derived vascular precursor cells regulates their angiogenic and wound healing potential. PLoS ONE. 3, e3752.

Carothers A.M., Rizvi H., Hasson R.M., Heit Y.I., Davids J.S., Bertagnolli M.M., and et al. 2012. Mesenchymal stromal cell mutations and wound healing contribute to the etiology of desmoid tumors. Cancer Research. 72, 346-355.

Charernsriwilaiwat N., Rojanarata T., Ngawhirunpat T., Sukma M. and Opanasopit P. 2013. Electrospun chitosan-based nanofiber mats loaded with *Garcinia mangostana* extracts. International Journal of Pharmaceutics. 452, 333-343.

Chen LG., Yang LL. And Wang CC. 2007. Anti-inflammatory activity of mangostin from *Garcinia mangostana*. Food and Chemical Toxicology. 46, 688-693.

Chen H., Shi R., Luo B., Yang X., Qiu L., Xiong J., et al. 2015. Macrophage peroxisome proliferator-activated receptor gamma deficiency delays skin wound healing through impairing apoptotic cell clearance in mice. Cell Death and Disease. 6, 113.

Cheon S., Poon R., Yu C., Khoury M., Shenker R., Fish J., and et al. 2005. Prolonged beta-catenin stabilization and tcf-dependent transcriptional activation in hyperplastic cutaneous wounds. Laboratory Investigation. 85, 416-425.

Chigurupati S., Arumugam T.V., Son T.G., Lathia J.D., Jameel S., Mughal M.R., and et al. 2007. Involvement of Notch signaling in wound healing. PLoS ONE. 2, e1167.

Cho H., Balaji S., Hone N.L., Moles C.M., Sheikh A.Q., Crombleholme T.M. and et al. 2016. Diabetic wound healing in a MMP9-/- mouse model. Wound Repair and Regeneration. 24, 829-840.

Chomnawang M.T., Surassmo S., Nukoolkarn V.S. and Gritsanapan W. 2007. Effect of *Garcinia mangostana* on inflammation caused by *Propionibacterium acnes*. Fitoterapia. 78, 401-408.

Chung IM., Ali M., Ahmad A., Yu CY., Ma KH., Gwag LG. and Park YJ. 2005. Chemical constituents of brown rice grain (*Oryza sativa*). Chemistry of Natural Compounds. 41, 650-653.

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

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

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

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

Dasu M.R. and Jialal I. 2013. Amelioration in wound healing in diabetic toll-like receptor 4 knockout mice. Journal of Diabetes and Its Complications. 27, 417-421.

De A. 2011. Wnt/Ca^{2+} signaling pathway: a brief overview. Acta Biochimica et Biophysica Sinica. 43, 745-756.

Delavary B.M., Veer W.M., Egmond M., Niessen F.B. and Beelen R.H.J. 2011. Macrophages in skin injury and repair. Immunobiology. 216, 753-762.

Dorsett-Martin W.A. and Wysocki A.B. 2008. Rat models of skin wound healing. In: Source Book of Models for Biomedical Research. Humana Press, 631-638.

Durgaprasad S., Reetesh R., Hareesh K. and Rajput R. 2011. Effect of a topical curcumin preparation (BIOCURCUMAX) on burn wound healing in rats. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Sciences. 8, 1-3.

Dwivedi D., Dwivedi M., Malviya S. and Singh V. 2017. Evaluation of wound healing, anti-microbial and antioxidant potential of *Pongamia pinnata* in wistar rats. Journal of Traditional and Complementary Medicine. 7, 79-85.

Egozi E.I., Ferreira A.M., Burns A.L., Gamelli R.L. and DiPietro L.A. 2003. Mast cells modulate the inflammatory but not the proliferative response in healing wounds. Wound Repair and Regeneration. 11, 46-54.

Eming S.A., Krieg T. and Davidson J.M. 2007. Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. Journal of Investigative Dermatology. 127, 514-525.

Eming S.A., Werner S., Bugnon P., Wickenhauser C., Siewe L., Utermohlen O., et al. 2007. Accelerated wound closure in mice deficient for interleukin-10. The American Journal of Pathology. 170, 188-202.

Engvall E. 2010. The ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay. Clin Chem. 56, 319-320.

Finnson K.W., McLean S., Di Guglielmo G.M. and Philip A. 2013. Dynamics of transforming growth factor beta signaling in wound healing and scarring. 2,195-214.

Flanders K.C., Sullivan C.D., Fujii M., Sowers A., Anzano M.A., Arabshahi A. and et al. 2002. Mice lLacking Smad3 are protected against cutaneous injury induced by Ionizing radiation. American Journal of Pathology. 160, 1057-1068.

Freitasa K.M., Barcelosb L.S., Caliaric M.V. Salasd C.E. and Lopesa M.T.P. 2017. Healing activity of proteolytic fraction (P1G10) from *Vasconcellea cundinamarcensis* in a cutaneous wound excision model. Biomedicine and Pharmacotherapy. 96, 269-278.

Fronzaa M., Heinzmannb B., Hamburger M., Laufer S. and Merfort I. 2009.Determination of the wound healing effect of Calendula extracts using the scratch assay with 3T3 fibroblasts. Journal of Ethnopharmacology. 126. 463 467.

Fukui T., Kawaguchi A.T., Takekoshi S., Miyasaka M., Sumiyoshi H. and Tanaka R. 2017. Liposome-encapsulated hemoglobin accelerates skin wound healing in diabetic *db/db* mice. Artificial Organs. 41, 319-326.

Gal P., Kilik R., Mokry M., Vidinsky B., Vasilenko T., Mozes S. and et al. 2008. Simple method of open skin wound healing model in corticosteroid-treated and diabetic rats: standardization of semi-quantitative and quantitative histological assessments. Veterinarni Medicina. 53, 652-659.

Gal P., Vasilenko T., Kovac I., Kostelnikova M., Jakubco J., Szabo P. and et al. 2012. *Atropa belladonna* L. water extract: modulator of extracellular matrix formation in vitro and in vivo. Physiological Research. 61, 241-50.

Galiano R.D., Tepper O.M., Pelo C.R., Bhatt K.A., Callaghan M., Bastidas N. and et al. 2004. Topical vascular endothelial growth factor accelerates diabetic wound healing through increased angiogenesis and by mobilizing and recruiting bone marrow-derived cells. American Journal of Pathology. 164, 1935-1947.

Garcia-Salas P., Arraez-Roman D., Segura-Carretero A., Garcia-Villanova B., Guerra Hernandez E. and Fernandez-Gutierrez A. 2010. *Garcinia mangostana* fruit: determination of the total anti-oxidant activity in extract and phenolic compound characterization using CE-MS (TOF). Functional Plant Science and Biotechnology. 4, 11-16.

Gay A.N., Mushin O.P., Lazar D.A., Naik-Mathuria B.J., Yu L., Gobin A. and et al. 2011. Wound healing characteristics of ICAM-1 null mice devoid of all isoforms of ICAM-1. Journal of Surgical Research. 171, e1-e7.

Golebiewska E.M. and Poole A.W. 2015. Platelet secretion: From haemostasis to wound healing and beyond. Blood Reviews. 29, 153-162.

Gottrup F., Agren M.S. and Karlsmark T. 2000. Models for use in wound healing research: a survey focusing on in vitro and in vivo adult soft tissue. Wound Repair Regeneration. 8, 83-96.

Goren I., Muller E., Schiefelbein D., Christen U., Pfeilschifter J., and et al. 2007. Systemic anti-TNF-alpha treatment restores diabetes-impaired skin repair in *ob/ob* mice by inactivation of macrophages. Journal of Investigative Dermatology. 127, 2259-2267.

Goto Y. and Kakizaki M. 1981. The spontaneous-diabetes rat: a model of noninsulin dependent diabetes mellitus. Proceedings of the Japan Academy. 57, 381-384.

Goto Y., Kakizaki M. and Masaki N. 1975. Spontaneous diabetes produced by selective breeding of normal wistar rat. Proceedings of the Japan Academy. 51, 80-85.

Goto Y., Kakizaki M. and Masaki N. 1976. Production of spontaneous diabetic rats by repetition of selective breeding. The Tohoku Journal of Experimental Medicine. 119, 85-90.

Greenhalgh D.G., Sprugel K.H., Murray M.J. and Rosst R. 1990. PDGF and FGF stimulate wound healing in the genetically diabetic mouse. American Journal of Pathology. 136, 1235-1246.

Gridley T. 2010. Notch signaling in the vasculature. Current Topics in Developmental Biology. 92, 277-309.

Grose R. and Werner S. 2003. Wound-healing studies in transgenic and knockout mice. Molecular biotechnology. 28, 147-166.

Gupta A., Mahajan S. and Sharma R. 2015. Evaluation of antimicrobial activity of *Curcuma longa* rhizome extract against *Staphylococcus aureus*. Biotechnology Reports. 6, 51-55.

Hardwicke J., Schmaljohann D., Boyce D. and Thomas D. 2008. Epidermal growth factor therapy and wound healing – past, present and future perspectives. Surgeon. 6, 172-177.

Harishkumar M., Masatoshi Y., Hiroshi S., Tsuyomu I. and Masugi M. 2013. Revealing the mechanism of in vitro wound healing properties of Citrus tamurana extract. Biomedical Research International. 963457, 1-10.

Henderson A.J., Ollila C.A., Kumar A., Borresen E.C., Raina K., Agarwal R. and Ryan EP. Chemopreventive properties of dietary rice bran: current status and future prospects. American Society for Nutrition. 3, 643-653.

Hesketh M., Sahin K.B., West Z.E. and Murray R.Z. 2017. Macrophage phenotypes regulate scar formation and chronic wound healing. International Journal of Molecular Sciences. 18, 1-10.

Hormozia M., Assaeic R. and Boroujenid M.B. 2017. The effect of *Aloe vera* on the expression of wound healing factors (TGFb1 and bFGF) in mouse embryonic fibroblast cell: In vitro study. Biomedicine and Pharmacotherapy. 88, 610-616.

Houschyar K.H., Momeni A., Pyles M.N., Maan Z.N., Whittam A.J. and Siemers F. 2015. Wnt signaling induces epithelial differentiation during cutaneous wound healing. Organogenesis. 11, 95-104.

Huang L., Nakagami G., Minematsu T., Kinoshita A., Sugama J., Nakatani T. and et al. 2010. Ulceration and delayed healing following pressure loading in hyperglycemic rats with an immature dermal collagen fiber network. Wound. 22, 237-244.

Huang P.L, Chi C.W. and Liu T.Y. 2010. Effects of *Areca catechu* L. containing procyanidins on cyclooxygenase-2 expression *in vitro* and *in vivo*. Food and Chemical Toxicology. 48, 306-313.

Huang Q., Ma Y., Adebayo A. and Pope RM. 2007. Increased macrophage activation mediated through toll-like receptors in rheumatoid arthritis. Arthritis & Rheumatology. 56, 2192-2201.

Imran H., Ahmad M., Rahman A., Yaqeen Z., Sohail T., Fatima T. and et al. 2015. Evaluation of wound healing effects between *Salvadora persica* ointment and Solcoseryl jelly in animal model. Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences. 28, 1777-1780.

Ito M., Yang Z., Andl T., Cui C., Kim N., Millar S.E. and et al. 2007. Wnt-dependent de novo hair follicle regeneration in adult mouse skin after wounding. Nature. 447, 316-320.

Ishida Y., Kondo T., Takayasu T., Iwakura Y. and Mukaida N. 2004. The essential involvement of cross-talk between IFN-g and TGF-b in the skin wound healing process. The Journal of Immunology. 172, 1848-1855.

Ishida Y., Kondo T., Kimura A., Matsushima K. and Mukaida N. 2006. Absence of IL-1 Receptor antagonist impaired wound healing along with aberrant NF-kB vactivation and a reciprocal suppression of TGF-beta signal pathway. The Journal of Immunology. 176, 5598-5606.

Ismail NE., Samad MA. , Effendi TJB. and Hasan MH. 2010. Cytotoxicity studies of aqueous extracts of *Curcuma longa* and *Quercus infectoria*. International Conference on Science and Social Research. 5, 746-751.

Jaiswal P., Kumar P., Singh VK. and Singh DK. 2011. *Areca catechu* L.: A valuable herbal medicine against difference health problems. Resesearch Journal ofMedicinal Plant. 5, 145-152.

Jarukamjorn K., Lao-ong T. and Chatuphonprasert W. 2011. Diabetic induction in experimental mouse model. Thai Pharmaceutical and Health Science Journal. 6, 229-239.

Jridi M., Sellimi S., Lassoued K.B., Beltaief S., Souissi N., Mora L., and et al. 2017.Wound healing activity of cuttlefish gelatin gels and films enriched by henna (*Lawsonia inermis*) extract. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. 512, 71-79.

Jung HA., Su BN., Keller WJ., Mehta RG. and Kinghorn AD. 2006. Antioxidant xanthones from the pPericarp of *Garcinia mangostana* (Mangosteen). Journal of Agricultural and Food Chemistry. 54, 2077-2082.

Kahn S.E., Cooper M.E. and Prato S.D. 2014. Pathophysiology and treatment of type 2 diabetes: perspectives on the past, present, and future. Lancet. 383, 1068-1083.

Kakehashi A., Saito Y., Mori K., Sugi N., Ono R., Yamagami H. and et al. 2006. Characteristics of diabetic retinopathy in SDT rats. Diabetes/Metabolism Research and Reviews. 22, 455-461.

Kant V., Gopal A., Pathak N.N., Kumar P., Tandan S.K. and Kumar D. 2014. Antioxidant and anti-inflammatory potential of curcumin accelerated the cutaneous wound healing in streptozotocin-induced diabetic rats. International Immunopharmacology. 20, 322-330.

Kato K., Hamaguchi Y., Okawa S., Ishikawa E. and Kobayashi K. 1977. Use of rabbit antibody IgG bound onto plain and aminoalkylsilyl glass surface for the enzyme linked sandwich immunoassay. J Biochem. 82, 261-266.

Khan S., Mehmood M.H., Ali A.N.A., Ahmed F.S., Dar A. and Gilani A.H. 2011. Studies on anti-inflammatory and analgesic activities of betel nut in rodents. Journal of Ethnopharmacology. 135, 654-661.

Khan I., Kumar N., Pant I., Narra S. and Kondaiah P. 2012. Activation of TGF-betapathway by areca nut constituents: a possible cause of oral submucous fibrosis. PLOS ONE. 7, 1-12.

Khanna S., Biswas S., Shang Y., Collard E., Azad A., Kauh C. and et al. 2010. Macrophage dysfunction impairs resolution of inflammation in the wounds of diabetic. PLOS ONE. 5, e9539- e9539.

King A.F.J. 2012. The use of animal models in diabetes research. British Journal of Pharmacology. 166, 877-894.

Kitisin T., Saewan N. and Luplertlop N. 2015. Potential anti-inflammatory and anti oxidative properties of Thai colored-rice extracts. Plant omics journal. 8, 69-77.

Kisseih E., Lechtenberg M., Petereit F., Sendker J., Zacharski D., Brandt S., and et al. 2015. Phytochemical characterization and in vitro wound healing activity of leaf extracts from *Combretum mucronatum* Schum. & Thonn.: Oligomeric procyanidins as strong inductors of cellular differentiation. Journal of Ethnopharmacology. 174, 628-636.

Kitano T., Yamada H., Kida M., Okada Y., Saika S. and Yoshida M. 2017. Impaired healing of a cutaneous wound in an inducible nitric oxide synthase-knockout mouse. Dermatology Research and Practice. 2017, 1-11.

Ko C.H., Yi S., Ozaki R., Cochrane H., Chung H., Lau W., and et al. 2014. Healing effect of a two-herb recipe (NF3) on foot ulcers in Chinese patients with diabetes: A randomized double-blind placebo-controlled study. Journal of Diabetes. 6, 323-334.

Koh KH. and Tham FY. 2011. Screening of traditional Chinese medicinal plants for quorum-sensing inhibitors activity. Journal of Microbiology, Immunology and Infection. 44, 144-148.

Koh T.J. and Ann DiPietro L. 2011. Inflammation and wound healing: the role of the macrophage. Expert Reviews in Molecular Medicine. 13, 1-12.

Kong P. , Xie X., Li F., Liu Y. and Lu Y. 2013. Placenta mesenchymal stem cell accelerates wound healing by enhancing angiogenesis in diabetic Goto-Kakizaki (GK) rats. Biochemical and Biophysical Research Communications. 438, 410-419.

Kundu S., Biswas TK., Das P., Kumar S. and De DK. 2014. Turmeric (*Curcuma longa*) rhizome paste and honey show similar wound healing potential: a preclinical study in rabbits. The International Journal of Lower Extremity Wounds. 4, 205-213.

Kulac M., Aktas C., Tulubas F., Uygur R., Kanter M., Erboga M. and et al. 2013. The effects of topical treatment with curcumin on burn wound healing in rats. Journal of Molecular Histology. 44, 83-90.

Kumar S. and Chowdhury S. 2015. Anti-inflammatory effect of an ethyl acetate extract of *Garcinia mangostana* L. by downregulation of nitric oxide production in Raw 264.7 cell line. International Journal of Pharmacy and Biological Sciences. 5, 229-233.

Kume T. 2009. Novel insights into the differential functions of Notch ligands in vascular formation. Journal of Angiogenesis Research. 8, 1-9.

Kyriakides T.R., Wulsin D., Skokos E.A., Fleckman P., Pirrone A., Shipley M., et al. 2009. Mice that lack matrix metalloproteinase-9 display delayed wound healing associated with delayed reepithelization and disordered collagen fibrillogenesis. Matrix Biology. 28, 65-73.

Landen N.X., Li D. and Stahle M. 2016. Transition from inflammation to proliferation: a critical step during wound healing. Cellular and Molecular Life Sciences. 73, 3861-3885.

Laua T.W., Lamb F.F.Y., Laua K.M., Chana Y.W., Leea K.M., Sahota D.S. and et al. 2009. Pharmacological investigation on the wound healing effects of *Radix Rehmanniae* in an animal model of diabetic foot ulcer. Journal of Ethnopharmacology. 123, 155-162.

Lee K.H., Kim B.S., Keum K.S., Yu H.H., Kim Y.H., Chang B.S., Ra J.Y. et al. 2011. Essential oil of *Curcuma longa* inhibits *Streptococcus mutans* biofilm formation. Journal of Food Science. 76, H226-230.

Lee P.Y., Chesnoy S. and Huang L. 2004. Electroporatic delivery of TGF-b1 gene works synergistically with electric therapy to enhance diabetic wound healingin *db/db* mice. Journal of Investigative Dermatology. 123, 791-798.

Le H., Kleinerman R., Lerman O.Z., Brown D., Galiano R., Gurtner G.C. and et al. 2008. Hedgehog signaling is essential for normal wound healing. Wound Repair and Regeneration. 16, 768-773.

Levigne D., Modarressi A., Krause K.H. and Pittet-Cuenod B. 2016. NADPH oxidase 4 deficiency leads to impaired wound repair and reduced dityrosine-crosslinking, but does not affect myofibroblast formation. Free Radical Biology and Medicine. 96, 374-384.

Lim Y.S., Lee S.S.H. And Tan BC. 2013. Antioxidant capacity and antibacterial activity of different parts of mangosteen (*Garcinia mangostana* Linn.) extracts. Fruits. 68, 483-489.

Lindstrom P. 2007. The physiology of obese-hyperglycemic mice (ob/ob mice). Scientific world journal. 7, 666-685.

Lindstrom P. and Wager O. 1978. IgG autoantibody to human serum albumin studied by the ELISA-technique. Scand J Immunol. 7, 419-425.

Lin Z.Q., Kondo T., Ishida Y., Takayasu T. and Mukaida N. 2003. Essential involvement of IL-6 in the skin wound-healing process as evidenced by delayed wound healing in IL-6-deficient mice. Journal of Leukocyte Biology. 73, 713-721.

Liu K., Gao Z., Wu X., Zhou G., Zhang W.J., Yang X., et al. 2014. Knocking out Smad3 favors allogeneic mouse fetal skin development in adult wounds. 22, 265-271.

Liu Q., Li D., Wang A., Dong Z., Yin S., Zhang Q. and et al. 2016. Nitric oxide inhibitory xanthones from the pericarps of *Garcinia mangostana*. Phytochemistry, 131 115-123.

Liu X.J., Kong F.Z., Wang Y.H., Zheng J.H., Wan W.D., Deng C.L., et al. 2013. Lumican accelerates wound healing by enhancing a2b1 Integrin-Mediated Fibroblast contractility. PLOS ONE. 8, 1-9.

Liu W.Y., Tzeng T.F. and Liu I.M. 2016. Healing potential of zerumbone ointment on experimental full-thickness excision cutaneous wounds in rat. Journal of Tissue Viability. 26, 202-207.

Macaulay I.C., Thon J.N., Tijssen M.R., Steele B.M., MacDonald B.T., Meade G. and et al. 2013. Canonical Wnt signaling in megakaryocytes regulates proplatelet formation. Blood. 121, 188-196.

Maheshwari R., Singh A., Gaddipati J. and Srimal R. 2006. Multiple biological activities of curcumin: a short review. Life Sciences. 78, 2081-2087.

Maria S., Kamath V.V., Satelur K. and Rajkumar K. 2016. Evaluation of transforming growth factor beta1 gene in oral submucous fibrosis induced in Sprague-Dawley rats by injections of areca nut and pan masala (commercial areca nut product) extracts. Journal of Cancer Research and Therapeutics. 12, 379-385.

Martinez-Ferrer M., Afshar-Sherif A.R., Uwamariya C., de Crombrugghe B., Davidson J.M. and Bhowmick N.A. 2010. Dermal transforming growth factor-beta responsiveness mediates wound contraction and epithelial closure. The American Journal of Pathology. 176, 98-107.

McCarty S.M. and Percival S.L. 2012. Proteases and delayed wound healing. Advance in wound care. 2, 438-447.

McFarland-Mancini M.M., Funk H.M., Paluch A.M., Zhou M., Vummidi Giridhar P., Mercer C.A. and et al. 2010. Differences in wound healing in mice with deficiency of IL-6 versus IL-6 receptor. The Journal of Immunology. 184, 7219-7228.

Mendonca R.J., Mauricio V.B., Teixeira L.B., Lachat J.J. and Coutinho-Netto J. 2010. Increased vascular permeability, angiogenesis and wound healing Induced by the serum of natural latex of the rubber tree *Hevea brasiliensis*. Phytotherapy Research. 24, 764-768.

Meyer M., Muller A.K., Yang J., Moik D., Ponzio G., Ornitz D.M. and et al. 2012. FGF receptors 1 and 2 are key regulators of keratinocyte migration in vitro and in wounded skin. Journal of Cell Science. 125, 5690-5701.

Muangman P., Praditsuktavorn B., Chinaroonchai K. and Chuntrasakul K. 2016. Clinical efficacy test of polyester containing herbal extract dressings in burn wound healing. Clinical and Translational Research. 15, 203-212.

Moghadamtousi S.Z., Kadir H.A., Hassandarvish P., Tajik H., Abubakar S. and Zandi K. 2014. A review on antibacterial, antiviral, and antifunga activity of curcumin. BioMed Research International. ID 186864, 1-12.

Mohanty C., Das M. and Sahoo S.K. 2012. Sustained wound healing activity of curcumin loaded oleic acid based polymeric bandage in a rat model. Molecular Pharmaceutics. 9, 2801-2811.

Mori R., Kondo T., Nishie T., Ohshima T. and Asano M. 2004. Impairment of skin wound healing in beta-1,4-galactosyltransferase-deficient mice with reduced leukocyte recruitment. American Journal of Pathology. 164, 1303-1314.

Mrialles F. and Portha B. 2001. Early development of beta-cells is impaired in the GK rat model of type 2 diabetes. Diabetes. 50, S84-S88.

Muller A.K., Meyer M. and Werner S. 2012. The roles of receptor tyrosine kinases and their ligands in the wound repair process. Seminars in Cell and Developmental Biology. 23, 963-970.

Nafiu A.B. and Rahman M.T. 2015. Selenium added unripe carica papaya pulp extracts enhance wound repair through TGF-beta1 and VEGF-a signalling pathway. BMC Complementary and Alternative Medicine. 15, 1-10.

Nainwal P., Bhagla A. and Nanda D. 2010. Study on antioxidant potential and wound healing activity on the aqueous extract of fruits of *Garcinia mangostana.* IJPI's Journal of Pharmacognosy and Herbal Formulations. 1, 1-5.

Nakatani K., Nakahata N., Arakawa T., Yasuda H. and Ohizumi Y. 2002. Inhibition of cyclooxygenase and prostaglandin E2 synthesis by gamma-mangostin, a xanthone derivative in mangosteen, in C6 rat glioma cells. Biochemical Pharmacology. 63, 73-79.

Namjoyan F., Kiashi F., Moosavi Z.B., Saffari F. and Makhmalzadeh B.S. 2016. Efficacy of Dragon's blood cream on wound healing: A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. Journal of Traditional and Complementary Medicine. 6, 37-40.

Nayak S.B., Rodrigues V., Maharaj S. and Bhogadi V.S. 2013. Wound healing activity of the fruit skin of *Punica granatum*. Journal of Medicinal Food. 16, 857-861.

Negahdari S., Galehdari H., Kesmati M., Rezaie A. and Shariati G. 2017. Wound healing activity of extracts and formulations of *Aloe vera*, henna, *Adiantum capillus-veneris*, and Myrrh on mouse dermal fibroblast cells. International Journal of Preventive Medicine. 8, 18.

Nganlasom J., Suttitum T., Jirakulsomchok D. and Puapairoj A. 2008. Effects of Centella asiatica Linn. leaves and *Garcinia mangostana* Linn. hull on the healing of dermal wounds in diabetic rats. Srinagarind Med J. 23, 402-407.

Ngawhirunpat T., Opanasopi P., Sukma M., Sittisombut C., Kat A. and Adachi I. 2010. Antioxidant, free radical-scavenging activity and cytotoxicity of different solvent extracts and their phenolic constituents from the fruit hull of mangosteen (*Garcinia mangostana*). Pharmaceutical Biology. 48, 55-62.

Nicolaus C., Junghanns S., Hartmann A., Murillo R., Ganzera M. and Merfort I. 2017. *In vitro* studies to evaluate the wound healing properties of *Calendula officinalis* extracts. Journal of Ethnopharmacology. 196, 94-103.

Novak M.L. and Koh T.K. 2013. Phenotypic transitions of macrophages orchestrate tissue repair. The American Journal of Pathology. 183, 1352-1363.

Ogle M.E., Segar C.E., Sridhar S. and Botchwey E.A. 2016. Monocytes and macrophages in tissue repair: Implications for immunoregenerative biomaterial design. Experimental Biology and Medicine. 241, 1084-1097.

Oh H., Oh S.K., Lee J.S., Choi J.S. and Lee S.J. 2016. Brown rice (*Oryza sativa* L. cv. Hiami) extract promotes cellular growth by upregulation of GH and IGF-1 expression and secretion. Food Science and Biotechnology. 25, 335-339.

Okizaki S.I., Ito Y., Okubo H., Kojyou K., Ohba K., Masayoshi S. and et al. 2014. VEGFR1 signaling facilitates diabetic skin wound healing in mice. Microvascular Reviews and Communications. 7, 28.

Okuyama R., Tagami H. and Aiba S. 2008. Notch signaling: its role in epidermal homeostasis and in the pathogenesis of skin diseases. Journal of Dermatological Science. 49, 187-194.

Ostenson C.G. and Efendic S. 2007. Islet gene expression and function in type 2 diabetes; studies in the Goto-Kakizaki rat and humans. Diabetes, Obesity and Metabolism. 9, 180-186.

Outtz H.H., Wu J.K., Wang X. and Kitajewski J. 2010. Notch1 deficiency results in decreased inflammation during wound healing and regulates vascular endothelial growth factor receptor-1 and inflammatory cytokine expression in macrophages. The Journal of Immunology. 185, 4363-4373.

Packiavathy, I.A., Priya, S., Pandian, S.K., Ravi, A.V., 2014. Inhibition of biofilm development of uropathogens by curcumin - an anti-quorum sensing agent from Curcuma longa. Food Chemistry. 148, 453-460.

Packiavathy, I.A., Sasikumar, P., Pandian, S.K., Veera Ravi, A. 2013. Prevention of quorum-sensing-mediated biofilm development and virulence factors production in *Vibrio* spp. by curcumin. Appl Microbiol Biotechnol. 97, 10177-10187.

Palakawong C., Sophanodora P., Pisuchpen S. and Phongpaichit S. 2010. Antioxidant and antimicrobial activities of crude extracts from mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) parts and some essential oils. International Food Research Journal. 17, 583-589.

Paltas ., Saroa R. and Palta A. 2014. Overview of the coagulation system. Indian journal of anaesthesia. 58, 515-523.

Patel S., Maheshwari A. and Chandra A. 2016. Biomarkers for wound healing and their evaluation. Journal of Wound Care. 25, 46-55.

Pearson J.A., Wong F.S. and Wen L. 2015. The importance of the Non Obese Diabetic (NOD) mouse model in autoimmune diabetes. Journal of Autoimmunity. 66, 76-88.

Peters T., Sindrilaru A., Hinz B., Hinrichs R., Menke A., Al-azzeh E. and et al. 2005. Wound healingdefect of $CD18^{-/-}$ mice due to a decrease in TGF-beta1 and myofibroblast differentiation. EMBO J. 24, 3400-3410.

Pick A., Clark J., Kubstrup C., Levisetti M., Pugh W., Bonner-Weir S. and et al. 1998. Role of apoptosis in failure of beta-cell mass compensation for insulin resistance and beta-cell defects in the male Zucker diabetic fatty rat. Diabetes. 47, 358-364.

Piornedo R.R., Souza P., Stefanello M.E.A., Strapasson R.L.B., Zampronio A.R. and Kassuya C.A.L. 2011. Anti-inflammatory activity of extracts and 11,13-dihrdrozaluzanin C from *Gochnatia polymorpha* spp. *floccosa* trunk bark in mice. 133, 1077-1084.

Portou M.J., Baker D., Abrahamb D. and Tsui J. 2015. The innate immune system, toll-like receptors and dermal wound healing: a review. Vascular Pharmacology. 71, 31-36.

Pumirat P. and Luplertlop N. 2013. The *in-vitro* antibacterial effect of colored rice crude extracts against *Staphylococcus aureus* associated with skin and soft-tissue infection. Journal of Agricultural Science. 5, 102-109.

Putranti, N.a.R., Hendrawan, R.D., Rahardjo, M.B., 2013. Effect of mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) pericarp extract on biofilm formation of *Streptococcus mutans* on orthodontic wire (*In-vitro*). Conference of Indonesian Students Association in Korea. NA, 42.

Puripattanavong J.K.W., Khajorndetkun W. and Chansathirapanich. 2006. Improved isolation of alpha-mangostin from the fruit hull of *Garcinia mangostana* and its antioxidant and antifungal activity. Planta Medica. 72, 1078.

Ram M., Singh V., Kumawat S., Kumar D., Lingaraju M.C., Uttam Singh T. and et al. 2015. Deferoxamine modulates cytokines and growth factors to accelerate cutaneous wound healing in diabetic rats. European journal of pharmacology. 746, 9-21.

Raphael I., Nalawade S., Eagar T.N. and Forsthuber T.G. 2015. T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases. Cytokine. 74, 5-17.

Reinke J.M. and Sorg H. 2012. Wound repair and regeneration. European Surgical Research. 49, 35-43.

Rigby K.M. and DeLeo F.R. 2012. Neutrophils in innate host defense against *Staphylococcus aureus* infections. Semin Immunopathol. 34, 237-259.

Saharinen P., Eklund L., Pulkki K., Bono P., Alitalo K. 2011. VEGF and angiopoietin signaling in tumor angiogenesis and metastasis. Trends in Molecular Medicine. 17, 347-362.

Sarrazy V., Billet F., Micallef L., Coulomb B. and Desmouliere A. 2011. Mechanisms of pathological scarring: role of myofibroblasts and current developments. Wound Repair and Regeneration. 19, s10-15.

Sasase T., Ohta T., Masuyama T., Yokoi N., Kakehashi A., and Shinohara M. 2013. The spontaneously diabetic Torii rat: an animal model of nonobese type 2 diabetes with severe diabetic complications. Journal of Diabetes Research. ID 976209, 1-12.

Sato N., Komatsu K. and Kurumatani H. 2003. Lateonset of diabetic nephropathy in spontaneously diabetic GK rats. American Journal of Nephrology. 23, 334-342.

Shah J.M., Omar E., Pai D.R. and Sood S. 2012. Cellular events and biomarkers of wound healing. Indian Journal of Plastic Surgery. 45, 220-228.

Shalini V., Bhaskar S. and Helen A. 2011. Anti-inflammatory Activty of *Oryza sativa* L. (Njavara). Journal of Natural Remedies. 11, 24-30.

Shinohara M., Masuyama T., Shoda T., Takahashi T., Katsuda Y., Komeda K. and et al. 2000. A new spontaneously diabetic non-obese Torii rat strain with severe ocular complications. International Journal of Experimental Diabetes Research. 1, 89-100.

Sindrilaru A. and Scharffetter-Kochanek K. 2013. Disclosure of the culprits: macrophages- versatile regulators of wound healing. Advances in wound care. 3, 357-368.

Singh P., Wig J.D. and Srinivasan R. 2011. The Smad family and its role in pancreaticcancer. Indian Journal of Cancer. 48, 351-360.

Singhal A.K., Gupta H. and Bhati V.S. 2011. Wound healing activity of *Argyreia nervosa* leaves extract. International Journal of Applied and Basic Medical Research. 1, 36-39.

Slavkovsky R., Kohlerova R., Tkacova V., Jiroutova A., Tahmazoglu B., Velebny V. and et al. 2011. Zucker diabetic fatty rat: A new model of impaired cutaneous wound repair with type II diabetes mellitus and obesity. Wound Repair and Regeneration. 19, 515-525.

Soehnlein O. and Lindbom L. 2010. Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. Nature Reviews Immunology. 10, 427-439.

Soehnlein O., Steffens S., Hidalgo A., and Weber C. 2017. Neutrophils as protagonists and targets in chronic inflammation. Immunology. 17, 248-261.

Soehnlein O., Weber C. and Lindbom L. 2014. Neutrophil granule proteins tune monocytic cell function. Trends in Immunology. 30, 539-546.

Soley Bda S., Morais R.L., Pesquero J.B., Bader M., Otuki M.F. and Cabrini DA. 2016. Kinin receptors in skin wound healing. Journal of Dermatological Science. 82, 95-105.

Spirig R., Tsui J. and Shaw S. 2012. The emerging role of TLR and innate immunity in cardiovascular disease. Cardiology Research and Practice. 2012, 1-11.

Srinivasan K. and Ramarao P. 2007. Animal models in type 2 diabetes research: an overview. Indian journal medicinal research. 125, 451-472.

Staal F.J., Luis T.C. and Tiemessen M.M. 2008. WNT signaling in the immune system: WNT is spreading its wings. Nature Reviews Immunology. 8, 581-593.

Steele B.M., Harper M.T., Macaulay I.C., Morrell C.N., Perez-Tamayo A., Foy M., and et al. 2009. Canonical Wnt signaling negatively regulates platelet function. Proceedings of the National Academy of Sciences. 106, 19836-19841.

Su Y., Lei X., Wu L. and Liu L. 2012. The role of endothelial cell adhesion molecules P-selectin, E-selectin and intercellular adhesion molecule-1 in leucocyte recruitment induced by exogenous methylglyoxal. Immunology, 137, 65-79.

Sudsai T., Wattanapiromsakul C., Nakpheng T. and Tewtrakul S. 2013. Evaluation of the Wound Healing Property of *Boesenbergia longiflora* Rhizomes. Journal of Ethnopharmacology. 150, 223-231.

Suga H., Sugaya M., Fujita H., Asano Y., Tada Y., Kadono T., et al. 2014. TLR4, rather than TLR2, regulates wound healing through TGF-beta and CCL5 expression. Journal of Dermatological Science. 73, 117-124.

Sugihartini N. and Wiradhika R.Y. 2017. Gel Formulation of ethanol extract of mangosteen peel (*Garcinia mangostana* L.) as a medication for burns in wistar rats. Indonesian Journal of Medicine and Health. 8, 110-117.

Sumagin R., Prizant H., Lomakina E., Waugh R.E. and Sarelius I.H. 2010. LFA-1 and Mac-1 Define Characteristically Different Intralumenal Crawling and Emigration Patterns for Monocytes and Neutrophils In Situ. The Journal of Immunology. 185, 7057-7066.

Tan S.M., Hyland R.H., Al-Shamkhani A., Douglass W.A., Shaw J.M. and Alex Law S.K. 2000. Effect of integrin beta$_2$ subunit truncations on LFA-1 (CD11a/CD18) and Mac-1 (CD11b/CD18) assembly, surface expression, and function. The Journal of Immunology. 165, 2574-2581.

Tang T., Yin L., Yang J. and Shan G. 2007. Emodin, an anthraquinone derivative from *Rheum officinale* Baill, enhances cutaneous wound healing in rats. European Journal of Pharmacology. 567, 177-185.

Takagi N., Kawakami K., Kanno E., Tanno H., Takeda A., Ishii K., et al. 2016. IL-17A promotes neutrophilic inflammation and disturbs acute wound healing in skin. Experimental Dermatology. 26, 137-144.

Talekar Y.P., Apte K.G., Paygude S.V., Tondare P.R. and Parab P.B. 2017. Studies on wound healing potential of polyherbal formulation using in vitro and in vivo assays. Journal of Ayurveda and Integrative Medicine. 8, 73-81.

Tatiya-aphiradeea N., Chatuphonprasertb W. and Jarukamjorna K. 2016. In vivo antibacterial activity of *Garcinia mangostana* pericarp extract against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a mouse superficial skin infection model. Pharmaceutical Biology. 54, 2606-2615.

Tellechea A., Leal E.C., Kafanas A., Auster M.E., Kuchibhotla S., Ostrovsky Y., et al. 2016. Mast cells regulate wound healing in diabetes. Diabetes. 65, 2006-2019.

Tewtrakul S., Wattanapiromsakul C. and Mahabusarakam W. 2009. Effects of compounds from *Garcinia mangostana* on inflammatory mediators in RAW264.7 macrophage cells. Journal of Ethnopharmacology. 121, 379-382.

Thomas M.R. and Storey R.F. 2015. The role of platelets in inflammation. Thrombosis and Haemostasis. 1114, 449-458.

Tjahjania S., Widowati W., Khiong K., Suhendra A. and Tjokropranoto R. 2014. Antioxidant properties of *Garcinia mangostana* L. (mangosteen) rind. Procedia Chemistry. 13, 198-203.

Tredget E.E., Yang L., Delehanty M., Shankowsky H. and Scott P.G. 2006. Polarized Th2 cytokine production in patients with hypertrophic scar following thermal injury. J. Interferon Cytokine Res. 26, 179-189.

Tsuji K., Taminato T., Usami M., Ishida H., Kitano N., Fukumoto H. and et al. 1988. Characteristic features of insulin secretion in the streptozotocin-induced NIDDM rat model. Metabolism. 37, 1040-1044.

Tsuura Y., Ishida H., Okamto Y., Kato S., Sakamoto K., Horie M. and et al. 1993. Glucose sensitivity of ATP-sensitive K+ channels is impaired in beta-cells of the GK rat. Diabetes. 42, 1446-1453.

Uttama1 S. and Ittharat A. 2010. Cytotoxic activity of Hommali 105 rice bran extract against human cancer cells. Thai Journal of Pharmacology. 32, 102-105.

Velnar T., Bailey T. and Smrkolj V. 2009. The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. The Journal of International Medical Research. 37, 1528-1542.

Verma DK., Bharat M., Nayak K., Shanbhag T., Shanbhag V. and Rajput S. 2012. *Areca catechu*: Effect of topical ethanolic extract on burn wound healing in albino rats. International Journal of Pharmacology and Clinical Sciences. 1, 74-78.

Wang JJ., Zhang W. and Sanderson BJS. 2013. Altered mRNA expression related to the apoptotic effect of three xanthones on human melanoma SK-MEL-28 cell line. BioMed Research International. 2013, 1-10.

Watt F.M., Estrach S. and Ambler C.A. 2008. Epidermal Notch signalling: differentiation, cancer and adhesion. Current Opinion in Cell Biology. 20, 171-179.

Wakutta M., Morishige N., Chikama T., Seki K., Nagano T. and Nishida T. 2007. Delayed wound closure and phenotypic changes in corneal epithelium of the spontaneously diabetic Goto-Kakizaki rat. Investigative Ophthalmology & Visual Science. 48, 590-596.

Weisberg S.P., McCann D., Desai M., Rosenbaum M., Leibel R.L. and et al. 2003. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. Journal of Clinical Investigation. 112, 1796-1808.

Werner S., Peters K.G., Longaker M.T., Fuller- Pace F., Banda M. and Williams L.T. 1992. Large induction of keratinocyte growth factor expression in the dermis during wound healing. Proceedings of the National Academy of Sciences. 89, 6896-6900.

Werner S., Breeden M., Hubner G., Greenhalgh D.G. and Longaker M.T. 1994. Induction of keratinocyte growth factor expression is reduced and delayed during wound healing in the genetically diabetic mouse. The Journal of Investigation Dermatology. 103, 469-473.

Werner S. and Grose R. 2003. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. Physiological Reviews. 83, 835-870.

Winzell M.S. and Ahren B. 2004. The high-fat diet-fed mouse: a model for studying mechanisms and treatment of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes. Diabetes. 53, S215-S219.

Wolcott R.D., Rhoads D.D. and Dowd S.E. 2008. Biofilms and chronic wound inflammation. Journal of wound care. 17, 333-341.

Wu Y.S. and Chen S.N. 2014. Apoptotic cell: linkage of inflammation and wound healing. Frontiers in Pharmacology. 5, 1-6.

Wu J. and Yan L.J. 2015. Streptozotocin-induced type 1 diabetes in rodents as a model for studying mitochondrial mechanisms of diabetic beta-cell glucotoxicity. Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy. 8, 181-188.

Xu J.F. and Jin B.L. 2015. Treatment of infective ulcer patients with yang syndrome by external use of Shengji ointment: a multicenter Rrandomized controlled trial. Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi. 35, 1455-1458.

Yagihashi S., Tonosaki A. and Yamada K. 1982. Peripheral neuropathy in selectively-inbred spontaneously diabetic rats: electrophysiological, morphometrical and freeze-replica studies. Tohoku Journal of ExperimentalMedicine. 138, 39-48.

Yang Y. and Ma H. 2009. Western blotting and ELISA techniques. Researcher. 1, 67-86.

Yang W.Q., Wang H.C., Wang W.J., Wang Y., Zhang X.Q. and Ye W.C. 2012. Chemical constituents from the fruits of *Areca catechu*. Journal of Chinese medicinal materials. 35, 400-403.

Yang Y. and Santamaria P. 2006. Lessons on autoimmune diabetes from animal models. Clinical Science. 110, 627-639.

Yeh J.T., Yeh L.K., Jung S.M., Chang T.J., Wu H.H., Shiu T.F., et al. 2010. Impaired skin wound healing in lumican-null mice. British Journal of Dermatology. 163,1174-1180.

Zhang D.L., Gu L.J., Liu L., Wang C.Y., Sun B.S., Li Z. and Sung C.K. 2009. Effect of Wnt signaling pathway on wound healing. Biochemical and Biophysical Research Communications. 378, 149-151.

Zhao H., Lu S., Chai J., Zhang Y., Ma X., Chen J. and et al. 2017. Hydrogen sulfide improves diabetic wound healing in *ob/ob* mice via attenuating inflammation. Journal of Diabetes and its Complications. 31, 1363-1369.

Yincharoen K. 2014. In vitro anti-biofilm efficacy of Ya-Sa-Marn-Phlae and its medicinal plants. Thesis.

Yorde D.E., Sasse E.A., Wang T.Y., Hussa R.O. and Garancis J.C. 1976. Competitive enzyme-liked immunoassay with use of soluble enzyme/antibody immune complexes for labeling I. Measurement of human choriogonadotropin. Clinical Chemistry. 22, 1372-1377.

ภาคผนวก

Microbial Pathogenesis 128 (2019) 354–362

Contents lists available at ScienceDirect

Microbial Pathogenesis

journal homepage: www.elsevier.com/locate/micpath

Effects of a traditional Thai polyherbal medicine 'Ya-Samarn-Phlae' as a natural anti-biofilm agent against *Pseudomonas aeruginosa*

Julalak Chokpaisarn[a,b], Kanyatorn Yincharoen[a,c], Sineenart Sanpinit[a], Shunmugiah Thevar Karutha Pandian[d], Janarthanam Rathna Nandhini[d], Shanmugaraj Gowrishankar[d], Surasak Limsuwan[a,c], Nongluk Kunworarath[a], Supayang Piyawan Voruthikunchai[c,e], Sasitorn Chusri[a,c,*]

[a] Faculty of Traditional Thai Medicine, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla, 90112, Thailand
[b] Natural Product Research Center of Excellence, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla, 90112, Thailand
[c] Department of Thai Traditional Medicine, Faculty of Science and Technology, Rajamangala University of Technology Srivijaya (RMUTSV), Nakhon Si Thammarat Campus, Thung Song, Nakhon Si Thammarat, 80110, Thailand
[d] Department of Biotechnology, Alagappa University, Science Campus, Karaikudi, Tamil Nadu, 630 003, India
[e] Department of Microbiology, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla, 90112, Thailand

ARTICLE INFO

Keywords:
Thai traditional medicine
Biofilms
Pseudomonas aeruginosa
Ya-Samarn-Phlae

ABSTRACT

Ya-Samarn-Phlae (YaSP) is a traditional Thai polyherbal formula for the treatment of chronic wounds. Although its ethanol extract has been proven to possess several wound-related biological activities, there is no scientific information available for the infused oil of YaSP, which is its traditionally prepared form. This present study therefore aimed to evaluate the efficacy of different infused oils obtained from either fresh or oven-dried herbal parts of YaSP (F-YaSP and D-YaSP) against biofilms of *Pseudomonas aeruginosa,* which reside in chronic wounds. Its main active herbal component, *Garcinia mangostana* (F-GM and D-GM), as well as α-mangostin were also tested in this study. All infused oils significantly inhibited the biofilm formation of *P. aeruginosa* with a percentage of reduction ranging from 50 to 90%. Visualization of the inhibition of biofilm development was confirmed using scanning electron and atomic force microscopes. All tested agents resulted in a reduction in the mean average roughness of the biofilm, whereas only treating with D-YaSP, D-GM, and α-mangostin led to a decrease in both peak height and peak-valley height.

MTT reduction assays revealed that the metabolic activity of *P. aeruginosa* mature biofilms decreased considerably up to 50% after only 3 h of incubation and after only 9 h of exposure to D-YaSP. Confocal laser scanning micrographs illustrated that a maximum biofilm eradication was found when treated with the extracts for 3 h, whereas the biomass, the average thickness, maximum thickness, and the surface to volume ratio of the treated biofilm was reduced after up to 18 h of contact time. It can be concluded that D-YaSP can effectively inhibit biofilm formation and eradicate mature biofilms of *P. aeruginosa*. It should be noted that *G. mangostana* and α-mangostin contribute in YaSP as principle active agents for anti-biofilm efficacy.

1. Introduction

Pseudomonas aeruginosa is an opportunistic pathogen commonly involved in a variety of different healthcare-associated infections, including pneumonia, bloodstream infections, urinary tract infections, and surgical site infections. Recently, this pathogen has become more resistant to nearly all antibiotics such as aminoglycosides, cephalosporins, fluoroquinolones, and carbapenems, leading to an increase in morbidity/mortality, length of hospital stay, and overall cost of the treatment [1]. Moreover, the pathogen is known to be a very problematic bacterium due to its ability to form resistant biofilms, and it has been identified as one of the most common pathogens in chronic wounds [2].

Several lines of evidence from both clinical experiences [3,4] and *in vivo* studies [5,6] have demonstrated that the presence of bacterial biofilms, in particular, *P aeruginosa* biofilms, are associated with the chronicity of unhealed wounds by a prolonged inflammatory phase and cause the impairment of epithelialization and granulation tissue

* Corresponding author. Faculty of Traditional Thai Medicine, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla, 90112, Thailand.
E-mail address: sasitorn.chu@psu.ac.th (S. Chusri).

https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.01.036
Received 1 December 2017; Received in revised form 21 January 2019; Accepted 22 January 2019
Available online 23 January 2019
0882-4010/ © 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.

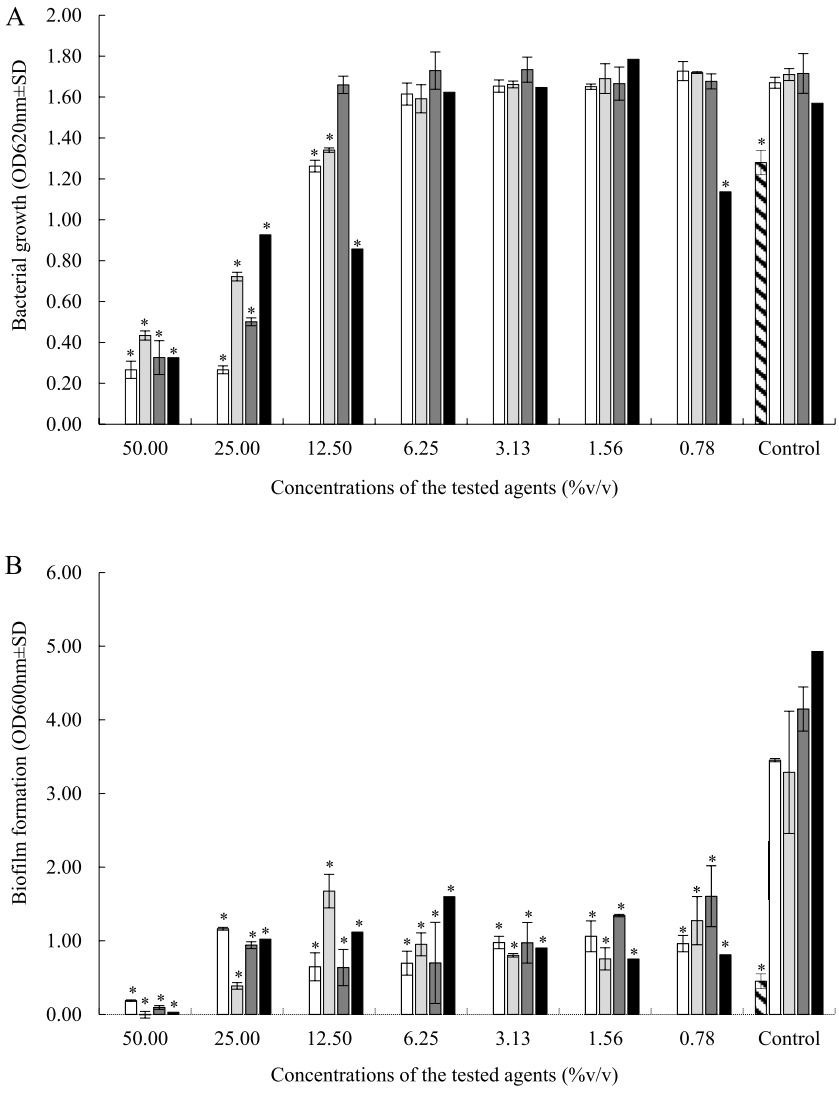


Fig. 1. Effect of Ya-Samarn-Phlae made from dried herbs (white bars) or fresh herbs (grey bars), hot oil extractions prepared from dried (dark grey bars) or fresh (black bars) pericarp of *Garcinia mangostana,* and pre-heated virgin coconut oil (50% v/v) as traditional extracting solvent (diagonal stripe bars), on the bacterial growth (A) and biofilm development (B) of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145. Growth or biofilm production of *P. aeruginosa* was significantly inhibited compared with that of bacteria without the test compounds (*$p < 0.05$).

formation. The available data also indicate that *P. aeruginosa* biofilms have been found to be promoted by treatment with insulin in a diabetic mouse model [7]. Interruption of bacterial adhesion and biofilm formation therefore should be considered as novel treatment strategies for chronic wounds. Over the past few years, there has been growing interest in searching for natural compounds that act as new potential antibacterial drugs as well as anti-biofilm agents to overcome this issue.

Ya-Samarn-Phlae (YaSP) (*in Thai*; *Ya* means medicine, *Samarn* means healing, and *Phlae* means wound) has been traditionally employed for the treatment of chronic wounds and skin infections. It is composed of *Curcuma longa* L. (rhizome), *Areca catechu* L. (seed), *Oryza sativa* L. (seed), and *Garcinia mangostana* L. (pericarp). Our previous study revealed that the ethanol extract of the formula possessed strong antibacterial activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [8]. Moreover, it has been documented to inhibit biofilm formation of *P. aeruginosa* [9] and *Staphylococcus epidermidis* [9]. In addition to its antibacterial and anti-biofilm activities, YaSP also has remarkable anti-inflammation and antioxidant abilities [8]. Our previous study also revealed that among its herbal components, only *Garcinia mangostana* ethanol extract and α-mangostin were found to possess notable antibacterial and anti-biofilm activity against bovine mastitis-isolated staphylococci [10].

During its traditional preparation, the formula is prepared by extraction with freshly prepared coconut milk and low-temperature cooking to obtain an active oil. Although our previous work indicated an anti-biofilm activity of the ethanol extract of YaSP, the anti-biofilm capability of a traditionally prepared form of YaSP has not been proven yet. Therefore, this study aimed to investigate the anti-biofilm activity of YaSP prepared from both oven-dried and fresh plant parts. G*arcinia mangostana* and α-mangostin were additionally tested as active ingredients of YaSP. This study revealed that a poly-herbal formula, YaSP, remarkably disturbs *P. aeruginosa* biofilm formation and affects its biofilm architecture. The eradication of *P. aeruginosa* mature biofilms after treating with YaSP was also demonstrated.

2. Materials and methods

2.1. Preparation and standardization of infused oil

Ya-Samarn-Phlae (YaSP) consists of equal proportions of *Curcuma longa* L. (rhizome), *Areca catechu* L. (seed), *Oryza sativa* L. (seed), and *Garcinia mangostana* L. (pericarp) [8]. To prepare the solution of YaSP,

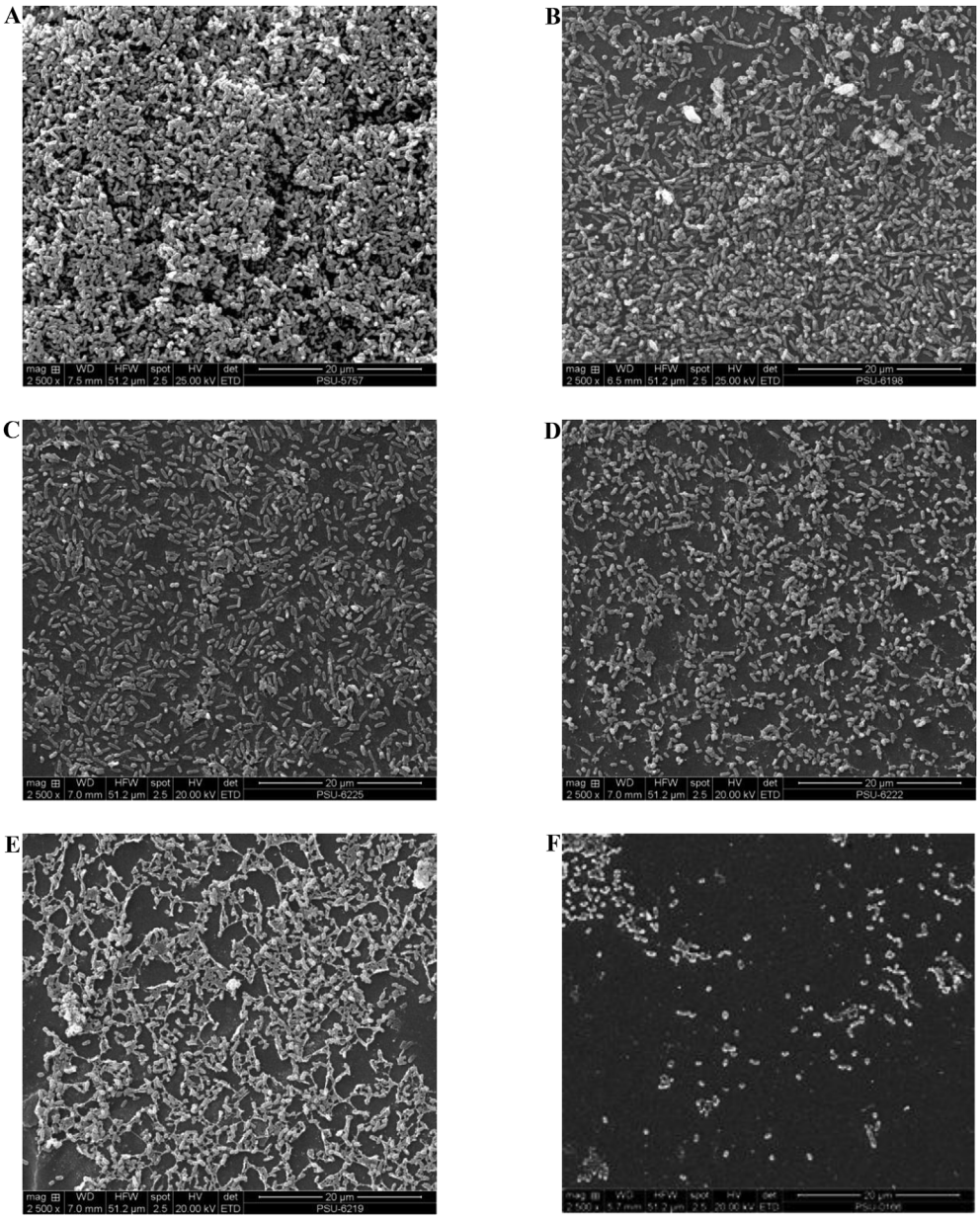


Fig. 2. Scanning electron micrograph images of biofilm formed by *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 on the surfaces of glass after incubation with 50% (v/v) of D-YaSP (B), F-YaSP (C), D-GM (D) or F-GM (E). Tryptic soy broth containing 2% glucose (A) was used as the negative control and 2 μg/mL of α-mangostin (F) was included as a representative active constituent.

the dried (D-YaSP) or fresh (F-YaSP) plants (125 g) were simmered together with pre-heated virgin coconut oil (Tropicana® VCO; 1.5 L) at 60 °C for 4 h, while dried (D-GM) or fresh (F-GM) pericarps of *Garcinia mangostana* (500 g) were used in preparation of either D-GM or F-GM infused oil. After cooling, the infused oil was stored in a sterile amber and airtight sealed bottle at room temperature until use. A patent for "the preparation method of Ya-Samarn-Phlae (YaSP) as a topical wound healing agent" has been granted under Thailand patent number 10008 (22nd June 2015).

To preliminarily confirm it as an active ingredient of the infused oils, the α-mangostin content was analysed using a modification of a previously described reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) method [11]. The HPLC model Agilent 1200 Series (Agilent Technologies, USA) equipped with a 1200 series binary pump, 1200 Series autosampler, 1200 thermostatted column compartment, and Agilent 1200 series diode array detector was used. The concentration of α-mangostin was determined on a reverse-phase ODS Hypersil C18 column (4 × 250 mm i.d., 5 μm). Acetonitrile:2% formic acid buffer in a ratio of 70:30% (v/v) was used as the mobile phase at flow rate of 1 ml/min with a run time of 20 min at ambient temperature. The samples dissolved in 80% methanol were injected using an Agilent 1200 Series autosampler with an injection volume of 20 μL and the monitoring wavelength was 245 nm. The standard solution of α-mangostin was prepared by accurately weighing and dissolving α-mangostin (Sigma Aldrich Chemie GmBH, Steinheim, Germany) in 80% methanol to obtain a final concentration of 100 μg/ml. The solution was then diluted to achieve the desired concentrations.

2.2. Bacterial strain and culture conditions

P. aeruginosa ATCC 10145 was used in this study as a biofilm positive strain. The pathogen was grown overnight at 37 °C on tryptic soy agar (TSA). To promote biofilm formation, well-isolated colonies were used to inoculate tryptic soy broth supplemented with 2% glucose

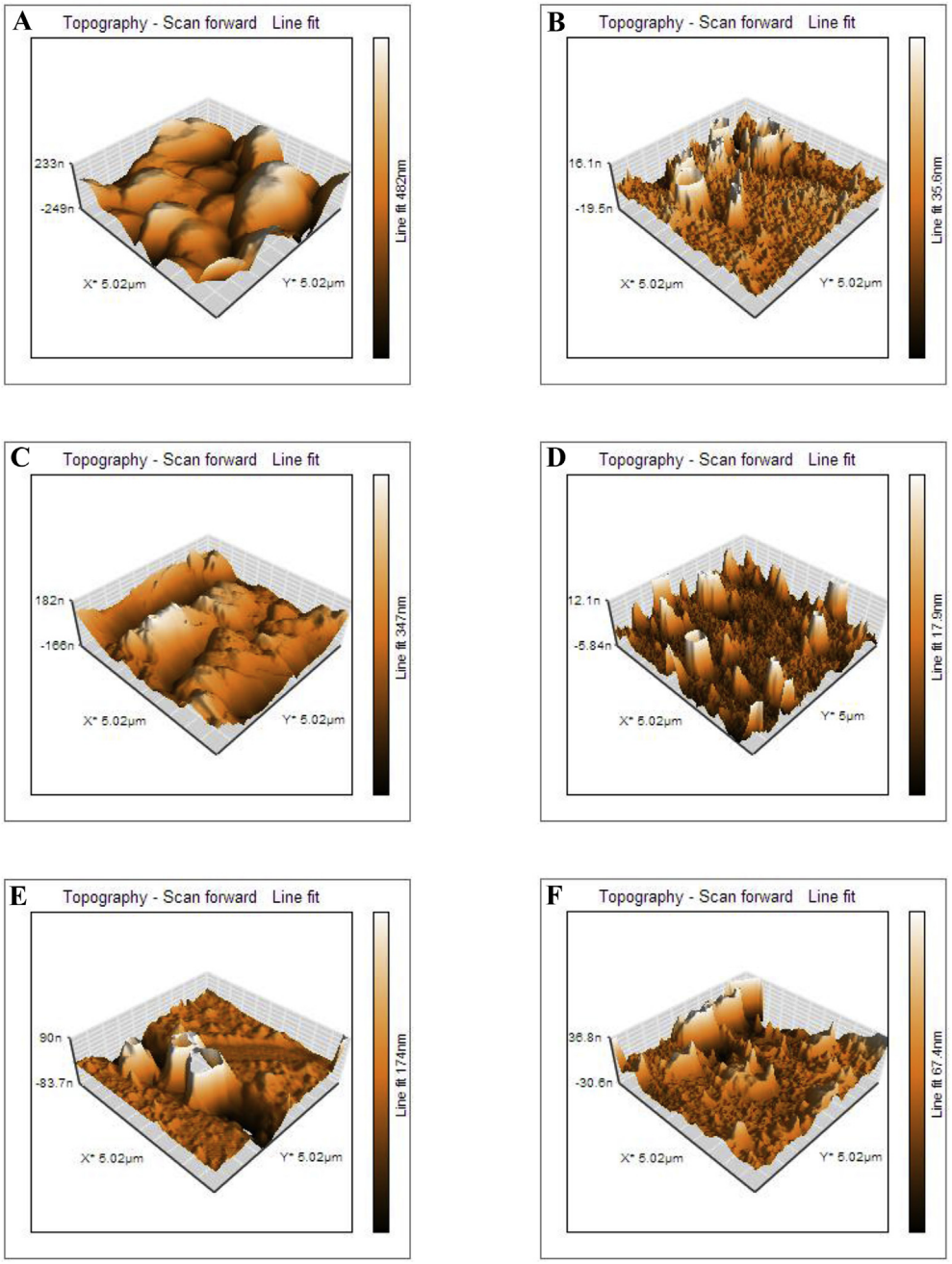


Fig. 3. Atomic force microscopy 3D images of biofilm formed by *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 on surfaces of glass after incubation with 50% (v/v) of D-YaSP (B), F-YaSP (C), D-GM (D) or F-GM (E). Tryptic soy broth containing 2% glucose (A) was used as the negative control and 2 µg/mL of α-mangostin was included as a representative active constituent (F). All images show an area of 5 × 5 μm^2.

(TSBGlc) for 18 h at 37 °C. For the experiments, the suspension was then diluted in TSBGlc to adjust the bacterial final concentration to 1×10^6 CFU/ml.

2.3. Assessment of biofilm inhibition by crystal violet assay

The biofilm formation of the tested bacteria after treatment with YaSP made from dried herbs (D-YaSP) and fresh herbs (F-YaSP) or hot oil extractions prepared from the dried (D-GM) or fresh (F-GM) pericarp of *G. mangostana* was performed by crystal violet assay in 96-well polystyrene microtiter plates ((Nunclon™, Nunc, Thermo Scientific) [12]. Each sample was serially diluted to obtain final concentrations ranging from 100 to 1.53% v/v in TSBGlc containing 0.5% (v/v) of the nonionic surfactant Tween 80, which was added to facilitate the solubilization of the infused oil in the solution [13]. One hundred microliters of the bacterial suspension (1×10^6 CFU/ml) was added to each well along with 100 µl of the tested samples. After 48 h of incubation, bacterial growth was measured at 620 nm by a multimode plate reader (Varioskan Flash, Thermo Fisher Scientific Inc., USA). Then, the plate was washed with 200 µl of PBS to remove planktonic cells and dried for 1 h at room temperature. The biofilm was stained with 0.1% crystal violet (200 µl) for 30 min before washing with PBS. DMSO was added to each well to leach the crystal violet from the stained biofilm. The biofilm biomass based on crystal violet absorbance was then measured at 600 nm. The pre-heated virgin coconut oil was additionally tested to describe its biofilm inhibition ability as traditional extracting solvent. The test was performed in triplicate and TSBGlc containing 0.5% (v/v) Tween 80 served as a negative control.

Table 1
Mean values of roughness average, peak height, and peak-valley height of biofilm formed by *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 over a 25-μm^2 area after incubation with 50% (v/v) of Ya-Samarn-Phlae made from dried herbs (D-YaSP) and fresh herbs (F-YaSP) or hot oil extractions prepared from dried (D-GM) or fresh (F-GM) pericarp of *Garcinia mangostana*.

Tested agents	Parameters (means ± SD; nm)		
	Roughness average	Peak height	Peak-valley height
TSB + 2% glucose	91.86 ± 11.68	375.13 ± 20.93	725.98 ± 59.88
D-YaSP	45.12 ± 11.96*	223.32 ± 49.81*	399.08 ± 33.15*
F-YaSP	49.88 ± 25.85*	299.85 ± 47.68	519.12 ± 89.48
D-GM	4.64 ± 2.11*	61.85 ± 29.66*	96.33 ± 48.60*
F-GM	10.83 ± 8.50*	172.32 ± 152.74	224.18 ± 184.67
α-mangostin[#]	11.09 ± 5.45*	115.86 ± 55.47*	167.67 ± 82.01*

*The values are significantly decreased compared with those of biofilm without the tested agents ($p < 0.05$).
[#]: 2 μg/ml of α-mangostin was included as a representative active constituent.

2.4. Visualization of biofilm architecture using scanning electron microscopy (SEM) and atomic force microscopy (AFM)

The samples were prepared and examined as described previously [12]. *P. aeruginosa* (1×10^6 CFU/ml) was grown in 24-well polystyrene plates with a glass slide in the presence or absence of the tested samples at a final concentration of 50% (v/v) for 48 h at 37 °C. After incubation, cells were washed with PBS and fixed with 2.5% glutaraldehyde for 1 h at room temperature. The fixed specimens were dehydrated using ethanol at 50%, 70%, 80%, and 90% (v/v) for 15 min, and 100% (v/v) for 30 min, followed by a critical point drying procedure (Quorum Technologies EmiTech K850). The specimens were then sputter-coated with gold and visualized by FEI-Quanta™ 400 scanning electron microscopy (SEM).

The biofilms were treated, and the samples were prepared as described above. Sample measurements were carried out with an AFM (Nanosurfe EasyScan 2 FlexAFM, Liestal, Switzerland) at the Centre of Excellence in Nanotechnology for Energy, Department of Physics, Faculty of Science, Prince of Songkla University [14].

2.5. Biofilm eradication by MTT assay

Biofilms were grown as described above and the diluted bacterial suspension (1×10^6 CFU/ml) was added into 96-well polystyrene microtiter plates. The medium was changed every 24 h until a mature biofilm was achieved. Then, the biofilm was gently washed with PBS (200 μl) and the plate was left at room temperature for 1 h. After drying, the biofilm was exposed to 100% v/v of the tested samples for 3, 6, 9, and 18 h. At each time point, the medium was removed by washing with 250 μl PBS and the plate was left to dry for 1 h. Bacterial viability was analysed using a 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) −2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT; Sigma) reduction assay as described previously [15]. Briefly, an aliquot of MTT solution (2 mg/ml; 20 μl) along with 180 μl of TSBGlc were added into each well. The plate was then incubated for 3 h in the dark at 37 °C. Following the incubation, the MTT solution was removed and replaced with 200 μl of DMSO. The colour intensity of the DMSO dissolved formazan was determined by a microplate reader at 482 nm. The test was performed in triplicate. TSBGlc containing PBS served as a negative control.

2.6. Visualization of mature biofilm architecture of P. aeruginosa using confocal laser scanning microscopy

Mature biofilms of *P. aeruginosa* were prepared as previously described [16]. Three-day-old biofilms were exposed to 1 ml each of D-YaSP, F-YaSP, D-GM, and F-GM for different time intervals (3 h, 6 h, 9 h, and 18 h). At each time point, the biofilm slides were taken out and rinsed with hexane. The samples were analysed by confocal laser scanning microscopy (CLSM; Zeiss LSM 710, Germany) after staining for 30 min in the dark with a LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit, a known indicator of cell viability, related to cell membrane integrity. Parameters including biofilm biomass, average and maximum thickness, and surface to volume ratio were used to evaluate the mature biofilm architecture of *P. aeruginosa*. A total of six image stacks were acquired and quantified by COMSTAT image analysis software as previously described [17].

2.7. Statistical analysis

All data are expressed as the means ± SD or the means ± SE. Differences between groups were described by the Duncan's multiple range test. *P* values less than 0.05 were considered statistically significant.

3. Results

3.1. D-YaSP, F-YaSP, D-GM, and F-GM reduce biofilm formation by P. aeruginosa

The results of the biofilm inhibition, presented in Fig. 1, revealed that D-YaSP, F-YaSP, D-GM, and F-GM at 0.78–6.25% (v/v) significantly reduced *P. aeruginosa* ATCC 10145 biofilm formation without any change in bacterial growth when compared with the control ($p < 005$). Reduced biofilm formation was even observed at concentrations 12.50–50% (v/v), but there was also a significant decrease in bacterial number (Fig. 1A). An inhibition of *P. aeruginosa* biofilm formation of 75.64 ± 7.01% was found for the pre-heated virgin coconut oil at concentration of 50% (v/v).

Table 2
Mature biofilm eradication ability of Ya-Samarn-Phlae made from dried herbs (D-YaSP) and fresh herbs (F-YaSP) or hot oil extractions prepared from dried (D-GM) or fresh (F-GM) pericarp of *Garcinia mangostana* on 3-day biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 measured by an MTT reduction assay.

Tested agents	Percentage of biofilm eradication (% ± SD) at difference contact times (h);			
	3 h	6 h	9 h	18 h
PBS	27.26 ± 8.58^{d}	40.51 ± 7.53^{c}	38.93 ± 7.96^{c}	−54.18 ± 10.97^{d}
D-YaSP	53.78 ± 7.036 ^{bc}	54.39 ± 6.58 ^{b}	53.95 ± 4.66 ^{b}	14.77 ± 7.63 ^{b}
F-YaSP	60.36 ± 9.60 ^{b}	40.01 ± 8.25^{c}	23.92 ± 7.63^{c}	−11.49 ± 6.44^{c}
D-GM	47.85 ± 3.04^{c}	44.61 ± 8.41 ^{bc}	48.31 ± 14.90 ^{b}	−15.86 ± 1.92^{c}
F-GM	57.17 ± 0.13 ^{bc}	26.34 ± 2.94^{d}	10.69 ± 4.62^{d}	11.51 ± 3.37 ^{b}
α-mangostin[#]	91.27 ± 1.06^{a}	90.66 ± 2.02^{a}	89.40 ± 5.46^{a}	94.59 ± 2.60^{a}

[a-e]Values in the same column with different superscripts are significantly different by the Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).
[#]: 2 μg/mL of α-mangostin was included as a representative active constituent.

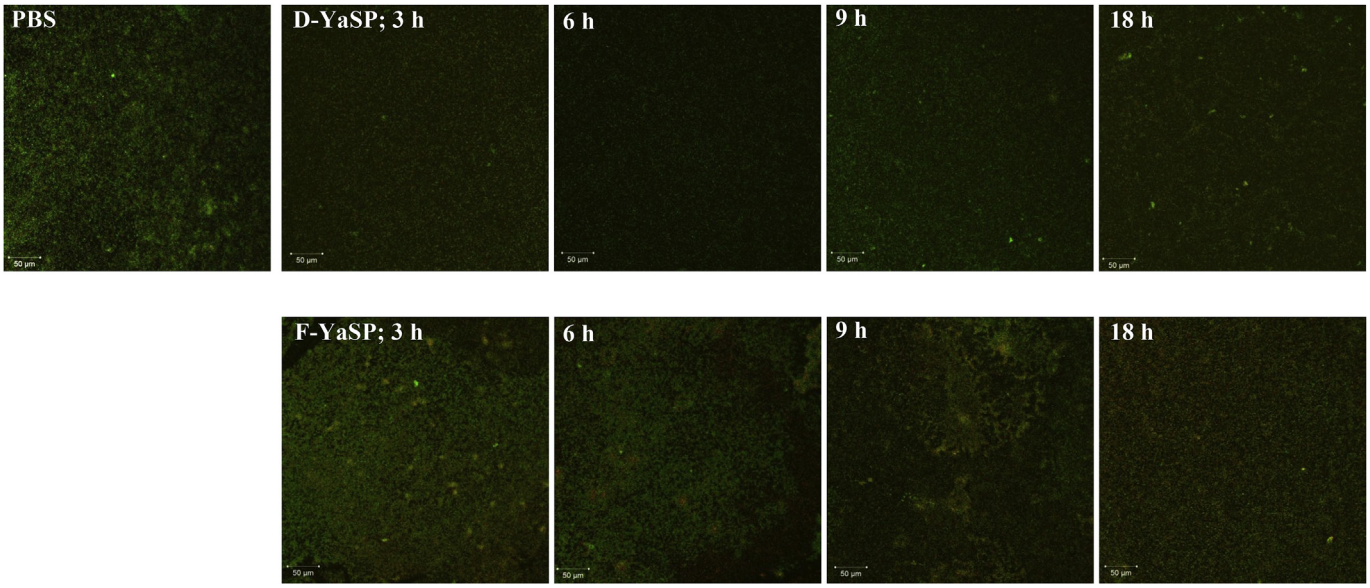


Fig. 4. Confocal laser scanning microscopy analysis of 3-day biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 on glass surfaces after incubation with 100% (v/v) Ya-Samarn-Phlae made from dried herbs (D-YaSP; upper panel) and fresh herbs (F-YaSP; upper panel) for 3, 6, 9, or 18 h. Control represents the 3-day biofilms incubated in phosphate buffered saline for 18 h. Scale bars are 50 μm.

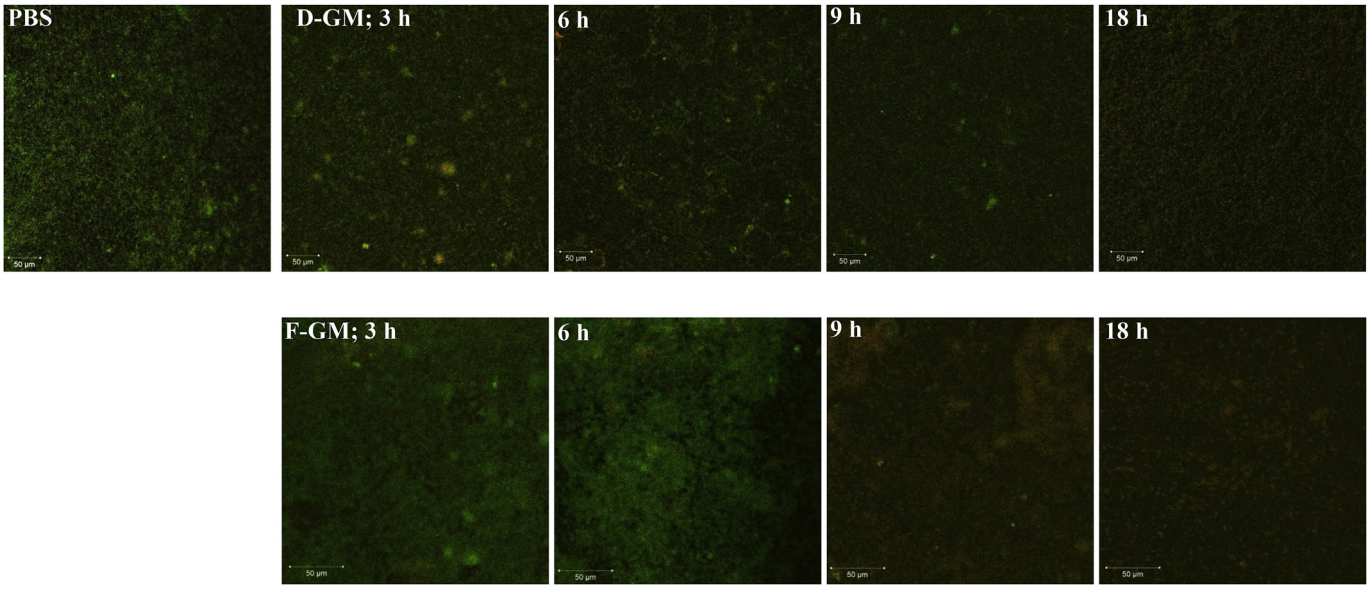


Fig. 5. Confocal laser scanning microscopy analysis of 3-day biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 on glass surfaces after incubation with 100% (v/v) hot oil extractions prepared from dried (D-GM; upper panel) or fresh (F-GM; lower panel) pericarp of *G. mangostana* for 3, 6, 9, or 18 h. The control represents the 3-day biofilms incubated in phosphate buffered saline for 18 h. Scale bars are 50 μm.

3.2. Biofilm formation of P. aeruginosa affected by YaSP and its constituents

The architecture of the *P. aeruginosa* biofilm formed on a glass slide after 48 h was investigated by SEM, which is illustrated in Fig. 2. SEM images showed rod-shaped cells of *P. aeruginosa* in the control condition, forming a dense cell aggregation and biofilm formation (Fig. 2A). In contrast, cells treated with D-YaSP (Fig. 2B), F-YaSP (Fig. 2C), D-GM (Fig. 2D), and F-GM (Fig. 2E) displayed fewer bacterial clusters and slight aggregation with poor formation of the biofilm when compared with the control cells. Alpha-mangostin, a standard biomarker of *G. mangostana*, also profoundly inhibited the biofilm formation of the bacteria on a glass surface (Fig. 2F).

The three-dimensional topography of the *P. aeruginosa* biofilm in different conditions examined by AFM is also given in Fig. 3. A highly dense biofilm surface was observed in the control *P. aeruginosa* biofilm (Fig. 3A), which showed a roughness average, peak height, and peak-valley height of 91.86 ± 11.68, 375.13 ± 20.93, and 725.98 ± 59.88 nm, respectively (Table 1). Loss of the bacterial biofilm surface was observed in the D-YaSP (Fig. 3B), F-YaSP (Fig. 3C), D-GM (Fig. 3D), F-GM (Fig. 3E), and α-mangostin (Fig. 3F) treatment groups, which all had a significant reduction ($p < 0.05$) in roughness average when compared with those of the control biofilm. The roughness averages for the treatment groups were 45.12 ± 11.96, 49.88 ± 25.85, 4.64 ± 2.11, 10.83 ± 8.50, and 11.09 ± 5.45 nm for D-YaSP, F-YaSP, D-GM, F-GM, and α-mangostin, respectively. All parameters, including roughness average, peak height, and peak-valley height, were significantly decreased ($p < 0.05$) in the D-GM and α-

Table 3
Quantitative structural parameters of 3-day biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 after treatment with Ya-Samarn-Phlae made from dried herbs (D-YaSP) and fresh herbs (F-YaSP) or hot oil extractions prepared from dried (D-GM) or fresh (F-GM) pericarp of *Garcinia mangostana*.

Tested agents	Contact times (h)	Biomass ($\mu m^3/\mu m^2$)	Average thickness (μm)	Maximum Thickness (μm)	Surface to volume ratio ($\mu m^2/\mu m^3$)
PBS	18	34.00	18.00	33.00	0.034
D-YaSP	3	26.33	13.16	24.69	0.042
	6	19.30	9.653	18.10	0.056
	9	21.50	10.75	18.82	0.051
	18	25.21	12.60	23.64	0.044
F-YaSP	3	24.58	12.29	23.05	0.045
	6	24.96	12.48	21.84	0.044
	9	24.28	12.14	22.77	0.045
	18	21.22	10.61	17.25	0.051
D-GM	3	22.56	11.28	21.15	0.049
	6	20.02	10.01	18.77	0.054
	9	20.78	10.39	19.49	0.052
	18	20.14	10.07	18.89	0.054
F-GM	3	29.57	14.78	27.73	0.041
	6	32.12	16.06	30.12	0.039
	9	26.77	13.38	25.10	0.045
	18	23.89	11.94	22.40	0.049

mangostin treatment group compared with the control (Table 1).

3.3. Mature biofilms of *P. aeruginosa* were interrupted by YaSP and its constituents

To investigate the effects of all tested agents on biofilm eradication, biofilms were grown for 3 days and then treated with the tested agents for 3, 6, 9, and 18 h. Table 2 shows that D-YaSP (53.78%), F-YaSP (60.36%), D-GM (47.85%), and F-GM (57.17%) treatment effectively eradicated the mature *P. aeruginosa* biofilm after 3 h of incubation compared with the PBS control ($p < 0.05$). Interestingly, treatment with the solution made from the fresh part of the herbal constituents (F-YaSP and F-GM) for 3 h significantly decreased biofilms more than the solution prepared from the dry plants. After 6 h of incubation time, only D-YaSP significantly destroyed the biofilm formation by 54.39%. There were no effects of all tested agents on biofilm eradication after 9 h of incubation. However, at 18 h, the ability of D-YaSP and F-GM to destroy the biofilms was clearly lost when compared with the PBS-treated biofilms. D-YaSP and D-GM still had a similar percentage of biofilm eradication after 9 h of treatment whereas the ability of F-YaSP and F-GM to destroy the biofilm was apparently weakened over the tested times. Alpha-mangostin significantly eliminated the biofilms at all timepoints with percentages up to 89%. Notably, YaSP prepared from both dry and fresh plants had better activity to eradicate the mature biofilm formation than the GM solution.

To further examine the dispersal effects of all tested samples on the established biofilms, the bacteria were grown for 3 days before starting the treatments. CLSM was used to visualize the images. The results

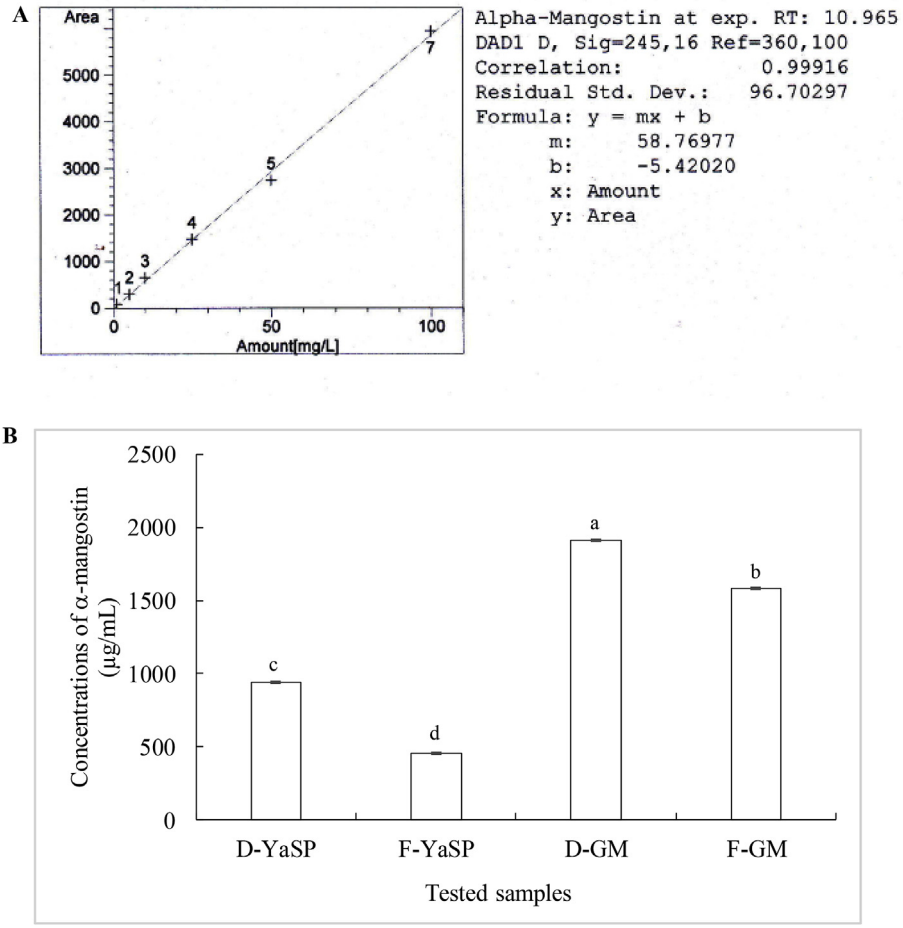


Fig. 6. HPLC calibration curve of α-mangostin (a proposed active constituent; A) and its quantitative analysis in each infused oil prepared from YaSP and *Garcinia mangostana* pericarp (GM; B). Values were subjected to one-way analysis of variance (ANOVA), the letter indicates the *p* value significance ($p < 0.05$).

illustrated that *P. aeruginosa* biofilms treated with PBS for 18 h exhibited complete structures of biofilms with more live cells (green cells) than dead cells (red cells) (Figs. 4 and 5). The biofilms treated with D-YaSP (for 18 h), F-YaSP (for at least 9 h), D-GM (for at least 9 h), and F-GM (for at least 6 h) appeared to contain more bacteria with damaged membranes, which fluoresced yellow and orange. The biofilm structure was eradicated after treatment with all samples for 3 h (Figs. 4 and 5). The quantitative measurements obviously confirmed that all samples certainly influenced the biofilm structures by inducing decreases in biomass and biofilm thickness after 3 h of treatment when compared with the PBS control (Table 3).

3.4. α-mangostin was found in all infused oils

RP-HPLC analysis of YaSP and *G. mangostana* infused oils revealed the presence of α-mangostin as a marker constituent with anti-biofilm activity per millilitre of each infused oil as shown in Fig. 6. D-GM and F-GM possessed higher α-mangostin contents than that of D-YaSP and F-YaSP, and it should be noted our data clearly demonstrated that the anti-biofilm activities of D-YaSP were significantly higher than that of the GM infused oils. Therefore, this study has confirmed that α-mangostin is an active constituent in YaSP.

4. Discussion

A previous study has proposed that biofilms of *P. aeruginosa* proceed through at least five phenotypic steps including (i) initiation of adhesion of planktonic bacteria, (ii) irreversible attachment of the cells, (iii) formation of microcolonies, (iv) development of a three-dimension community, and (v) dispersion of the biofilm [18]. Among these mentioned steps, several studies have revealed that medicinal plants as well as plant-derived compounds possess anti-biofilm activity, in particular, they inhibit bacterial adherence and further interrupt the biofilm formation [16,19]. For example, zingerone isolated from *Zingiber officinale* was found to reduce three flagellum-mediated motilities, swimming, swarming, and twitching, thus resulting in ineffective attachment of *P. aeruginosa* cells to catheter surfaces and leading to either delay or inhibition of biofilm formation of this pathogen [19].

To our knowledge, no previous literature has reported the anti-biofilm development properties of *A. catechu* and *O. sativa*, but acetone-water extracts of *A. catechu* were found to display quorum sensing (QS) antagonistic activity and inhibited flagella motility-dependent swarming of *P. aeruginosa* [20]. It is well-documented that α-mangostin, an active constituent found in the pericarp of *G. mangostana* [21], has stronger antibacterial activity than that of curcumin [22] and arecoline [23], the reported active constituents of *C. longa* and *A. catechu*, respectively. This information is consistent with our previous report, wherein the antibacterial activity of YaSP ethanol extract and α-mangostin had better inhibitory effects towards coagulase-negative and -positive staphylococci isolated from bovine mastitis compared to that of curcumin [10]. Alpha-mangostin was also found to prevent the initial adherence of *Candida albicans* [24] and inhibit the biofilm development of *Streptococcus mutans*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *S. epidermidis*, and *S. aureus* [25–27]. In spite of the antibacterial, antioxidant, and anti-inflammatory activities of curcumin, intensive works have been conducted on its inhibitory activity towards the biofilm formation of several pathogens. Packiavathy et al. [16] found that curcumin is capable of inhibiting the biofilm formation of treated uropathogens including *Escherichia coli*, *P. aeruginosa*, *Proteus mirabilis,* and *Serratia marcescens* by up to 80% in a dose-dependent manner and interrupting their biofilm architecture. Previous studies have demonstrated that curcumin inhibits flagellar-mediated swimming motility, which plays a crucial role in the cell-to-surface adherence of *P. aeruginosa* and other pathogens such as *Salmonella enterica* Typhimurium*, Vibrio* spp.*, E. coli*, *P. mirabilis,* and *S. marcescens* [16,28,29].The compound was additionally found to interfere with the QS system of *E. coli*, *Vibrio* spp., *S. marcescens*, and *P. aeruginosa* [16,28]. This can lead to interruption of the development of signal-mediated biofilm formation and inhibit QS-mediated virulence such as the production of rhamnolipid, exopolysaccharide, alginate, prodigiosin, beta-galactosidase, and acyl homoserine lactone [16,28,29]. Taken together, the anti-biofilm action of YaSP on both hydrophobic and hydrophilic surfaces might be associated with the presence of α-mangostin and curcumin in the formula, which may interrupt the biofilm development via either the inhibition of the QS system or disturb the swimming motility of the pathogen.

The mature biofilm has a complex architecture that increases its resistance against the host defence system and conventional antibiotic treatment. The findings of our study revealed that traditionally prepared YaSP could eradicate a preformed biofilm of *P. aeruginosa* by reducing the number of viable cells and causing cell membrane damage. This corresponds well with the reports of Packiavathy et al. [16], Nguyen et al. [25], and Nguyen et al. [30], who revealed that curcumin extracted from *C. longa* and α-mangostin extracted from *G. mangostana*, which are the components of YaSP, can disrupt the structural integrity of *S. mutans*, *S. aureus*, *E. coli*, *P. mirabilis*, and *S. marcescens* biofilms. Previous studies have reported the ability of plant-derived compounds with anti-biofilm properties to either enhance their inhibitory effect in combination with antibacterial agents such as zingerone/ciprofloxacin, curcumin/ceftazidime, curcumin/ciprofloxacin, etc. [19,31], or enhance *P. aeruginosa* immune clearance in *in vivo* models such as baicalin from *Scutellaria baicalensis* [32], ellagic acid from *Terminalia chebula* [33], etc. Therefore, the alteration of preformed biofilms and modulation of biofilm development resulting in thinner biofilms, as observed in the current study, may lead to an increase in susceptibility to conventional antibiotics and host immune clearance. Even though α-mangostin was previously found to be inactive against *E. coli* and *P. aeruginosa* [34], the compound exhibits strong antimicrobial activity against *S. mutans*, *S. aureus*, and *S. epidermidis* cells by disrupting the integrity of the cytoplasmic membrane of the pathogens [21,25,30]. Furthermore, α-mangostin was found to strongly reduce cell viability in the preformed biofilm, and the hot oil extractions obtained from both YaSP and *G. mangostana* caused cytoplasmic membrane damage of *P. aeruginosa*. It should be noted that the traditional extracting solvent, coconut oil, has also been reported to have inhibitory activity against *C. albicans* [35], *S. mutans* [36], and *Clostridium difficile* [37]. A similar tendency was observed in our study where the preheated virgin coconut oil has found to possess biofilm inhibition property, however, its anti-biofilm activity was lower than that of D-YaSP and D-GM which their percentage of biofilm inhibition was up to 97%. Lack of systematic studies on anti-biofilm mechanisms of both active ingredients as well as the traditional extracting solvent of YaSP can be also mentioned as the limitation of this study and are currently being assessed by our research group.

Therefore, the results of the present work indicated that traditionally prepared YaSP, in particular when extracted from dried herbs, has potent anti-biofilm potency and it may serve as an add-on strategy to reduce the development of biofilms via inhibiting biofilm formation and eradicating preformed biofilms. Although the anti-biofilm mechanisms of YaSP are under ongoing investigation, the formula might be explored in the future for its topical application, especially as a YaSP-containing cleaning solution for chronic wounds.

5. Conclusion and prospects

Traditionally, the hot oil extraction of YaSP has been intensively used in the treatment of chronic wounds, which invariably result in biofilm-associated bacterial infections. This study is the first work that explored the traditional form of YaSP, a complex herbal medicine, instead of its extracts. The anti-biofilm activity of YaSP on both hydrophobic and hydrophilic surfaces might be partly associated with the presence of α-mangostin in the formula. The anti-Pseudomonas biofilm activity of the herbal formula could also be effective in the prevention

of the development and growth of many other pathogens found in chronic wounds such as *Staphylococcus* spp. and *Enterococcus* spp.

Author disclosure statement

The authors have declared that no competing interests exist.

Author contributions

Conceived and designed the experiments: SC, JC, KY, STKP, SPV, and SL; Performed the experiments: JC, KY, JN, SG, and SS; Analysed the data: SC, JC, and KY; Proofread the final version: SC, JC, KY, STKP, SPV, and SL.

Acknowledgements

This work was supported by The Thailand Research Fund-The Commission on Higher Education (MRG 6080019, Fiscal year 2017–2019) and was partly supported by the TRF Senior Research Scholar, the Thailand Research Fund [Grant No. RTA6180006]. Ms. Kanyatorn Yincharoen is funded by a Natural Product Research Centre of Excellence Postgraduate Scholarship.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.01.036.

References

[1] M.E. El Zowalaty, A.A. Al Thani, T.J. Webster, A.E. El Zowalaty, H.P. Schweizer, G.K. Nasrallah, H.E. Marei, H.M. Ashour, *Pseudomonas aeruginosa*: arsenal of resistance mechanisms, decades of changing resistance profiles, and future antimicrobial therapies, Future Microbiol. 10 (2015) 1683–1706.
[2] S.L. Percival, S.M. McCarty, B. Lipsky, Biofilms and wounds: an overview of the evidence, Adv. Wound Care 4 (2015) 373–381.
[3] J. Hurlow, P.G. Bowler, Clinical experience with wound biofilm and management: a case series, Ostomy/Wound Manag. 55 (2009) 38–49.
[4] J. Hurlow, E. Blanz, J.A. Gaddy, Clinical investigation of biofilm in non-healing wounds by high resolution microscopy techniques, J. Wound Care 25 (Suppl 9) (2016) S11–S22.
[5] G. Zhao, P.C. Hochwalt, M.L. Usui, R.A. Underwood, P.K. Singh, G.A. James, P.S. Stewart, P. Fleckman, J.E. Olerud, Delayed wound healing in diabetic (db/db) mice with *Pseudomonas aeruginosa* biofilm challenge: a model for the study of chronic wounds, Wound Repair Regen. 18 (2010) 467–477.
[6] C. Watters, K. DeLeon, U. Trivedi, J.A. Griswold, M. Lyte, K.J. Hampel, M.J. Wargo, K.P. Rumbaugh, *Pseudomonas aeruginosa* biofilms perturb wound resolution and antibiotic tolerance in diabetic mice, Med. Microbiol. Immunol. 202 (2013) 131–141.
[7] C. Watters, J.A. Everett, C. Haley, A. Clinton, K.P. Rumbaugh, Insulin treatment modulates the host immune system to enhance *Pseudomonas aeruginosa* wound biofilms, Infect. Immun. 82 (2014) 92–100.
[8] S. Chusri, S. Settharaksa, J. Chokpaisarn, S. Limsuwan, S.P. Voravuthikunchai, Thai herbal formulas used for wound treatment: a study of their antibacterial potency, anti-inflammatory, antioxidant, and cytotoxicity effects, J. Alternative Compl. Med. 19 (2013) 671–676.
[9] S. Chusri, K. Sompetch, S. Mukdee, S. Jansrisewangwong, T. Srichai, K. Maneenoon, S. Limsuwan, S.P. Voravuthikunchai, Inhibition of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation by traditional Thai herbal recipes used for wound treatment, J. Evid. Based Complementary Altern. Med. 2012 (2012) 159797.
[10] S. Chusri, S. Tongrod, J. Saising, A. Mordmuang, S. Limsuwan, S. Sanpinit, S.P. Voravuthikunchai, Antibacterial and anti-biofilm effects of a polyherbal formula and its constituents against coagulase-negative and -positive staphylococci isolated from bovine mastitis, J. Appl. Anim. Res. 45 (2017) 364–372.
[11] S. Yodhnu, A. Sirikatitham, C. Wattanapiromsakul, Validation of LC for the determination of alpha-mangostin in mangosteen peel extract: a tool for quality assessment of *Garcinia mangostana* L, J. Chromatogr. Sci. 47 (2009) 185–189.
[12] S. Chusri, W. Jittanon, K. Maneenoon, S.P. Voravuthikunchai, An effective antibiofilm agent against *Pseudomonas aeruginosa* biofilm from traditional Thai herbal recipes used for wound treatments, Microb. Drug Resist. 19 (2013) 337–343.
[13] S. Taweechaisupapong, J. Aieamsaard, P. Chitropas, W. Khunkitti, Inhibitory effect of lemongrass oil and its major constituents on *Candida* biofilm and germ tube formation, South Afr. J. Bot. 81 (2012) 95–102.
[14] H.H. Fang, K.Y. Chan, L.C. Xu, Quantification of bacterial adhesion forces using atomic force microscopy (AFM), J. Microbiol. Methods 40 (2000) 89–97.
[15] N.L. Kavanaugh, K. Ribbeck, Selected antimicrobial essential oils eradicate *Pseudomonas* spp. and *Staphylococcus aureus* biofilms, Appl. Environ. Microbiol. 78 (2012) 4057–4061.
[16] I.A. Packiavathy, S. Priya, S.K. Pandian, A.V. Ravi, Inhibition of biofilm development of uropathogens by curcumin - an anti-quorum sensing agent from *Curcuma longa*, Food Chem. 148 (2014) 453–460.
[17] A. Heydorn, A.T. Nielsen, M. Hentzer, C. Sternberg, M. Givskov, B.K. Ersboll, S. Molin, Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT, Microbiol. 146 (2000) 2395–2407.
[18] G. Sharma, S. Rao, A. Bansal, S. Dang, S. Gupta, R. Gabrani, *Pseudomonas aeruginosa* biofilm: potential therapeutic targets, Biologicals 42 (2014) 1–7.
[19] L. Kumar, S. Chhibber, K. Harjai, Zingerone inhibit biofilm formation and improve antibiofilm efficacy of ciprofloxacin against *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, Fitoterapia 90 (2013) 73–78.
[20] K.H. Koh, F.Y. Tham, Screening of traditional Chinese medicinal plants for quorum-sensing inhibitors activity, J. Microbiol. Immunol. Infect. 44 (2011) 144–148.
[21] J.J. Koh, S. Qiu, H. Zou, R. Lakshminarayanan, J. Li, X. Zhou, C. Tang, P. Saraswathi, C. Verma, D.T. Tan, A.L. Tan, S. Liu, R.W. Beuerman, Rapid bactericidal action of alpha-mangostin against MRSA as an outcome of membrane targeting, Biochim. Biophys. Acta 1828 (2013) 834–844.
[22] S.Y. Teow, K. Liew, S.A. Ali, A.S. Khoo, S.C. Peh, Antibacterial action of curcumin against *Staphylococcus aureus*: a brief review, J. Trop. Med. 2016 (2016) 2853045.
[23] C.M. de Miranda, C.W. van Wyk, P. van der Biji, N.J. Basson, The effect of areca nut on salivary and selected oral microorganisms, Int. Dent. J. 46 (1996) 350–356.
[24] R. Kaomongkolgit, K. Jamdee, Inhibitory effect of alpha-mangostin on adhesion of *Candida albicans* to denture acrylic, Open Dent. J. 9 (2015) 388–392.
[25] P.T. Nguyen, M.L. Falsetta, G. Hwang, M. Gonzalez-Begne, H. Koo, Alpha-mangostin disrupts the development of *Streptococcus mutans* biofilms and facilitates its mechanical removal, PLoS One 9 (2014) e111312.
[26] M. Sivaranjani, M. Prakash, S. Gowrishankar, J. Rathna, S.K. Pandian, A.V. Ravi, *In vitro* activity of alpha-mangostin in killing and eradicating *Staphylococcus epidermidis* RP62A biofilms, Appl. Microbiol. Biotechnol. 101 (2017) 3349–3359.
[27] R. Kaomongkolgit, K. Jamdee, Inhibitory effect of alpha-mangostin on *Candida* biofilms, Odontology 105 (2017) 248–253.
[28] I.A. Packiavathy, P. Sasikumar, S.K. Pandian, A. Veera Ravi, Prevention of quorum-sensing-mediated biofilm development and virulence factors production in *Vibrio* spp. by curcumin, Appl. Microbiol. Biotechnol. 97 (2013) 10177–10187.
[29] S.A. Marathe, A. Balakrishnan, V.D. Negi, D. Sakorey, N. Chandra, D. Chakravortty, Curcumin reduces the motility of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by binding to the flagella, thereby leading to flagellar fragility and shedding, J. Bacteriol. 198 (2016) 1798–1811.
[30] N.T.M. Phuong, N. Van Quang, T.T. Mai, N.V. Anh, C. Kuhakarn, V. Reutrakul, A. Bolhuis, Antibiofilm activity of α-mangostin extracted from *Garcinia mangostana* L. against *Staphylococcus aureus*, Asian Pac. J. Trop. Med. 10 (2017) 1154–1160 https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2017.10.022.
[31] S. Roudashti, H. Zeighami, H. Mirshahabi, S. Bahari, A. Soltani, F. Haghi, Synergistic activity of sub-inhibitory concentrations of curcumin with ceftazidime and ciprofloxacin against *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing related genes and virulence traits, World J. Microbiol. Biotechnol. 33 (2017) 50.
[32] J. Luo, B. Dong, K. Wang, S. Cai, T. Liu, X. Cheng, D. Lei, Y. Chen, Y. Li, J. Kong, Y. Chen, Baicalin inhibits biofilm formation, attenuates the quorum sensing-controlled virulence and enhances *Pseudomonas aeruginosa* clearance in a mouse peritoneal implant infection model, PLoS One 12 (2017) e0176883.
[33] S. Sarabhai, P. Sharma, N. Capalash, Ellagic acid derivatives from *Terminalia chebula* Retz. downregulate the expression of quorum sensing genes to attenuate *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 virulence, PLoS One 8 (2013) e53441.
[34] S.M. Al-Massarani, A.A. El Gamal, N.M. Al-Musayeib, R.A. Mothana, O.A. Basudan, A.J. Al-Rehaily, M. Farag, M.H. Assaf, K.H. El Tahir, L. Maes, Phytochemical, antimicrobial and antiprotozoal evaluation of *Garcinia mangostana* pericarp and alpha-mangostin, its major xanthone derivative, Molecules 18 (2013) 10599–10608.
[35] D.O. Ogbolu, A.A. Oni, O.A. Daini, A.P. Oloko, *In vitro* antimicrobial properties of coconut oil on *Candida* species in Ibadan, Nigeria, J. Med. Food 10 (2007) 384–387.
[36] F.C. Peedikayil, V. Remy, S. John, T.P. Chandru, P. Sreenivasan, G.A. Bijapur, Comparison of antibacterial efficacy of coconut oil and chlorhexidine on *Streptococcus mutans*: an *in vivo* study, J. Int. Soc. Prev. Community Dent. 6 (2016) 447–452.
[37] M. Shilling, L. Matt, E. Rubin, M.P. Visitacion, N.A. Haller, S.F. Grey, C.J. Woolverton, Antimicrobial effects of virgin coconut oil and its medium-chain fatty acids on *Clostridium difficile*, J. Med. Food 16 (2013) 1079–1085.