

ผลกระทบของภาวะน้ำตาลในเลือดสูงต่อโครงสร้างของผิวหนังชั้นหนังแท้
ในหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวาน

Effect of Hyperglycemia on Morphology of Dermal Skin in Diabetes-induced Rats

เสาวลักษณ์ เจริญสุข,¹ ศิรินุช ศรีเจริญเวช,^{1*} กัสรา ลานเหลือ,¹ อภิขญา นียมจันทร์¹ สนิ ไบไม้¹
กนกพร แผลงฤทธิ์¹ และศศิภา เพียรรำลึก¹

Saowaluk Charoensuk,¹ Sirinush Sricharoenvej,^{1*} Passara Lanlua,¹ Apichaya Niyomchan,¹ Sani Baimai¹,
Kanokporn Plaengrit¹ and Sasipa Pianrumluk¹

Received 28 September 2023, Revised 10 November 2023, Accepted 20 November 2023

ABSTRACT

Diabetic skin is a condition of hyperglycemia-caused skin problem, which impairs wound healing, cutaneous infection, tissue necrosis and eventually causes amputation in diabetic patients. One of the important parts of the skin is the dermis, that functions to maintain homeostasis for the skin and provide complete wound healing processes. Therefore, the aim of this study was to clarify diabetic effects on dermal changes by the histomorphological and quantitative analyses in streptozotocin-induced type 1 diabetic rats, compared to aged-matched control rats, received citrate buffer at week 4 (short term) and week 24 (long term). In diabetes mellitus (DM), there was a significant increase in dermal thicknesses of forepaw skin in both terms: short-termed DM and long-termed DM, related to the presence of abundant myofibroblasts. The collagen content significantly increased in short-termed DM and long-termed DM, compared to control rats. Moreover, the capillaries in the dermo-epidermal junction showed the swelling of endothelial cells and pericytes and significantly reduced capillary luminal diameter in both terms of DM, compared to the rat control. During the long-termed DM, some of endothelial cell also underwent shrinkage with dense stained nucleus, indicating cell death.

Keywords: Diabetes mellitus, Dermal skin, Streptozotocin

บทคัดย่อ

โรคผิวหนังในภาวะเบาหวาน มีสาเหตุมาจากระดับน้ำตาลในเลือดสูง ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของผิวหนัง ส่งผลให้แผลหายช้า ติดเชื้อที่ผิวหนัง และเกิดการตายของเนื้อเยื่อ จนนำไปสู่การสูญเสียอวัยวะส่วนปลายโดยเฉพาะบริเวณแขนและขา องค์ประกอบที่สำคัญอย่างหนึ่งของผิวหนังคือชั้นหนังแท้ ซึ่งทำหน้าที่ช่วยรักษาภาวะสมดุลของผิวหนังและจำเป็นสำหรับการรักษาบาดแผลอย่างสมบูรณ์ การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางจุลกายวิภาคและเชิงปริมาณของโครงสร้างชั้นหนังแท้ในหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดเบาหวานชนิดที่ 1 ด้วยสาร streptozotocin เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับสารละลายซิเตรตบัฟเฟอร์ (citrate buffer) ในระยะเวลา 4 สัปดาห์ (ระยะเริ่มต้น) และ 24 สัปดาห์ (ระยะเรื้อรัง) โดยพบว่า

^{1*} ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล แขวงศิริราช เขตบางกอกน้อย กรุงเทพฯ 10700
Department of Anatomy, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University, Siriraj, Bangkok Noi, Bangkok 10700,
Thailand.

* Corresponding author: E-mail address: sirinush.sri@mahidol.ac.th

ความหนาของชั้นหนังแท้จากผิวหนังบริเวณใต้ฝ่าเท้าด้านหน้าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทั้งกลุ่มเบาหวานระยะเริ่มต้นและระยะเรื้อรัง ร่วมกับการพบจำนวนเซลล์ไมโอไฟโบรบลาสต์ (myofibroblasts) และเส้นใยคอลลาเจน (collagen) ในชั้นหนังแท้ของหนูเบาหวานทั้งสองระยะ มีการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม อีกทั้งยังพบว่าภาวะเบาหวานทั้งสองระยะส่งผลให้เกิดการรวมตัวของเซลล์ (cell) บุผนังหลอดเลือดและเพอริไซต์ (pericyte) ส่วนที่อยู่ในหลอดเลือดฝอยตีบแคบลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม นอกจากนี้ภาวะเบาหวานระยะเรื้อรังยังส่งผลให้เซลล์บุผนังหลอดเลือด มีนิวเคลียสติดสีเข้มขึ้น ซึ่งบ่งชี้ถึงการตายของเซลล์

คำสำคัญ: โรคเบาหวาน ชั้นหนังแท้ สารสเตรปโตโซโตซิน

คำนำ

โรคผิวหนังในภาวะเบาหวาน เป็นผลมาจากภาวะน้ำตาลในเลือดสูงที่ส่งผลกระทบต่อผิวหนัง ซึ่งพบได้มากถึงร้อยละ 80 ของผู้ป่วยโรคเบาหวาน (Demirseren *et al.*, 2014) โดยสามารถพบอาการได้ทั้งแบบที่ไม่รุนแรง เช่น ผื่นแห้ง จุดด่างดำ และอาการคัน และแบบรุนแรง เช่น แผลหายล่าช้า การติดเชื้อที่ผิวหนัง การเกิดแผลเปื่อย เนื้อเยื่อตาย เป็นต้น มีผลให้เพิ่มอัตราการเข้ารับการรักษาตัวในโรงพยาบาล และนำไปสู่ความรุนแรงจากการสูญเสียอวัยวะบริเวณแขนและขา (Gkogkolou *et al.*, 2014; de Macedo *et al.*, 2016; Makrantonaki *et al.*, 2016) การเปลี่ยนแปลงของผิวหนังในภาวะเบาหวานเหล่านี้ เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงของผิวหนังโดยเฉพาะชั้นหนังแท้ ซึ่งมีองค์ประกอบหลักเป็นเส้นใยคอลลาเจนที่ผลิตโดยเซลล์ไฟโบรบลาสต์ และยังมีพบหลอดเลือดเส้นประสาท ต่อมชนิดต่างๆ และเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน ผิวหนังชั้นหนังแท้จึงมีหน้าที่สนับสนุนโครงสร้างทางกายภาพ นำออกซิเจนและสารอาหารไปเลี้ยงผิวหนังและส่วนประกอบภายในผิวหนัง เกี่ยวข้องกับการรับส่งสัญญาณประสาทบริเวณผิวหนัง ช่วยรักษาสมดุลงานของผิวหนัง ชั้นหนังกำพร้า และ skin derivative (Tortora *et al.*, 2018; Xue *et al.*, 2022) และจำเป็นสำหรับกระบวนการหายของแผลอย่างสมบูรณ์ (Merecz-Sadowska *et al.*, 2021) จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าระดับน้ำตาลในเลือดที่สูงขึ้นจากภาวะเบาหวาน ส่งผลให้เกิดการอักเสบของผิวหนัง บ่งชี้

ได้จากการพบการสะสมของเซลล์อักเสบในชั้นหนังแท้ พบความหนาและจำนวนเซลล์ของชั้นหนังกำพร้าลดลง (Chen *et al.*, 2010; Techarang *et al.*, 2017) รวมถึงพบการสร้างหลอดเลือดใหม่เพิ่มขึ้นบริเวณผิวหนัง (Tellechea *et al.*, 2013) ทั้งยังพบการลดลงของเส้นประสาทส่วนปลาย ทำให้ผู้ป่วยสูญเสียการรับความรู้สึก เสี่ยงต่อการเกิดแผลขึ้นบริเวณผิวหนัง และยังคงพบว่าภาวะเบาหวานยังเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้การหายของแผลช้าลง (Yagihashi *et al.*, 2010; Lennertz *et al.*, 2011)

จากงานวิจัยที่ผ่านมาชี้ให้เห็นถึงผลกระทบของภาวะเบาหวานต่อการเปลี่ยนแปลงของผิวหนังชั้นหนังกำพร้าและชั้นหนังแท้ แต่ยังไม่ครอบคลุมถึงองค์ประกอบที่สำคัญในชั้นหนังแท้ อันได้แก่ เส้นใยคอลลาเจน เซลล์ไฟโบรบลาสต์ และหลอดเลือด โดยรายละเอียดในส่วนนี้จะทำให้ทราบถึงพยาธิกำเนิดและสามารถนำไปต่อยอดเพื่อหาแนวทางป้องกันความรุนแรงของโรคผิวหนังในภาวะเบาหวานได้ การศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างชั้นหนังแท้โดยการวิเคราะห์ลักษณะทางจุลกายวิภาคและเชิงปริมาณ ได้แก่ การวัดความหนาของชั้นหนังแท้ จำนวนของเซลล์ไมโอไฟโบรบลาสต์ ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของท่อภายในหลอดเลือดฝอย และร้อยละของการสะสมของเส้นใยคอลลาเจน ทำการศึกษาในหนูกลุ่มควบคุมและกลุ่มเบาหวานที่ได้รับการฉีดสาร streptozotocin เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ (ระยะเริ่มต้น) และ 24 สัปดาห์ (ระยะเรื้อรัง)

อุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียมสัตว์ทดลอง

งานวิจัยครั้งนี้ทำการศึกษาในหนู Sprague-Dawley เพศผู้ จำนวน 20 ตัว อายุ 5-8 สัปดาห์ น้ำหนัก 200-270 กรัม ที่ได้รับมาจากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ซึ่งจะดำเนินการตามเกณฑ์ของ International Guiding Principles for Biochemical Research Involving Animals (COA No. 007/2565) หลังจากพักให้หนูปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมเป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์ หนูทุกตัวจะถูกอดอาหารเป็นระยะเวลาอย่างน้อย 6 ชั่วโมง เพื่อนำมาตรวจวัดค่าความเข้มข้นของระดับน้ำตาลในปัสสาวะโดยใช้ urinalysis control strip และในเลือดจากหลอดเลือดดำบริเวณหาง โดยใช้ blood glucose monitoring system โดยหนูแต่ละตัวจะต้องมีค่าความเข้มข้นของระดับน้ำตาลในปัสสาวะที่ 0 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร และมีค่าความเข้มข้นของระดับน้ำตาลในเลือด น้อยกว่า 300 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร จึงจะเป็นที่ยอมรับในการศึกษา จากนั้นหนูทั้งหมดจะถูกสุ่มแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มควบคุม 8 ตัว (ระยะเริ่มต้น 4 ตัว และระยะเรื้อรัง 4 ตัว) และกลุ่มเบาหวาน 12 ตัว (ระยะเริ่มต้น 5 ตัว และระยะเรื้อรัง 7 ตัว)

การเหนี่ยวนำให้หนูเป็นเบาหวาน

หนูในกลุ่มเบาหวานจะถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวาน โดยได้รับการฉีดสาร streptozotocin จำนวน 60 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของน้ำหนักตัว ที่ละลายในสารละลายซิเตรตบัฟเฟอร์ (ค่าความเป็นกรดต่างที่ 4.5) ผ่านทางบริเวณช่องท้อง ส่วนหนูกลุ่มควบคุมจะได้รับการฉีดเพียงสารละลายซิเตรตบัฟเฟอร์ ผ่านทางบริเวณช่องท้อง ต่อมาที่ 48 และ 72 ชั่วโมง หนูแต่ละตัวจะถูกเก็บตัวอย่างเลือดที่หลอดเลือดดำบริเวณหาง เพื่อวัดระดับความเข้มข้นของน้ำตาล โดยในหนูกลุ่มเบาหวานจะต้องมีค่าระดับน้ำตาลในเลือดมากกว่า 300 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร จึงจะได้รับการยืนยันการเป็นเบาหวาน

จากนั้นในช่วงเช้าของทุกวัน หนูแต่ละตัวจะถูกชั่งน้ำหนักและวัดค่าระดับน้ำตาลในปัสสาวะหลังจากอดอาหารในเวลากลางคืนเป็นเวลา 10-12 ชั่วโมง และก่อนทำให้หนูตายอย่างสงบ หนูทุกตัวจะต้องวัดค่าระดับน้ำตาลในเลือดเพื่อยืนยันการเป็นเบาหวานอีกครั้ง หลังจากนั้นหนูทุกตัวจะถูกทำให้ตายอย่างสงบ ที่ 4 สัปดาห์ และ 24 สัปดาห์ โดยการสูดดมยาฮาโลเทน (halothane)

การเตรียมเนื้อเยื่อสำหรับศึกษาลักษณะทาง

จุลกายวิภาค

หลังจากหนูได้รับยาสลบ จึงทำการเปิดช่องอกของหนู แล้วฉีดสารละลายไซเตียมคลอไรด์ ร้อยละความเข้มข้น 0.9 ปริมาตร 500 มิลลิลิตร โดยสอดเข็มฉีดเข้าที่หัวใจห้องล่างซ้ายขึ้นไปที่หลอดเลือดเอออร์ตา เพื่อเป็นการล้างเลือด และตามด้วยสารละลาย Bouin ปริมาตร 300 มิลลิลิตร เพื่อรักษาสภาพเนื้อเยื่อ ทำการตัดผิวหนังบริเวณด้านใต้เท้าของอู้ง่าหน้า นำมาวางตามแนวยาวและผ่านกระบวนการทำสไลด์ด้วยเทคนิคทางเนื้อเยื่อวิทยา เพื่อศึกษาภายใต้กล้อง light microscope (LM) การย้อมด้วย Hematoxylin และ Eosin (H&E) สำหรับศึกษาลักษณะทางจุลกายวิภาคของผิวหนัง ส่วนการย้อมพิเศษด้วย Masson's trichrome เพื่อศึกษาการสะสมของเส้นใยคอลลาเจน

การศึกษาเชิงปริมาณ

การศึกษาเชิงปริมาณ โดยทำการวัดจากสไลด์เนื้อเยื่อจำนวน 50 sections ในแต่ละกลุ่มการทดลองแล้วนำมาหาค่าเฉลี่ยเพื่อเปรียบเทียบระหว่างหนูกลุ่มเบาหวานในระยะเริ่มต้นและระยะเรื้อรัง กับหนูกลุ่มควบคุมในระยะเดียวกัน โดยทำการศึกษาภายใต้กล้อง LM และคำนวณค่าที่ได้ผ่านโปรแกรม Image J (National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA) ดังนี้:

1. การวัดความหนาของชั้นหนังแท้ โดยการถ่ายภาพสไลด์เนื้อเยื่อที่ย้อมด้วย H&E และ Masson's trichrome ภายใต้กล้อง LM ที่

กำลังขยาย 10 เท่า โดยวัดความหนาจากจุดอ้างอิงคือ บริเวณ dermo-epidermal junction ของชั้นหนังกำพร้าที่ยื่นลงไปชั้นหนังแท้ไปยังชั้นกล้ามเนื้อที่ตั้งฉากกัน จำนวน 5 จุดในแต่ละ section ของผิวหนัง แล้วนำค่าที่ได้ทุกจุดมาหาค่าเฉลี่ยเพื่อเป็นตัวแทนความหนาชั้นหนังแท้ของ section นั้น

2. การหาจำนวนของเซลล์ไมโอไฟโบรบลาสต์ จากถ่ายภาพสไลด์เนื้อเยื่อที่ย้อมด้วย H&E ภายใต้กล้อง LM ที่กำลังขยาย 60 เท่า โดยมีหลักเกณฑ์การนับจำนวนดังนี้ เซลล์ไมโอไฟโบรบลาสต์จะต้องมีลักษณะรูปร่างไม่แน่นอน นิวเคลียสขนาดใหญ่ติดสีจาง และมีนิวคลีโอลัสชัดเจน หลังจากนั้นให้นำมาหาค่าเฉลี่ยจำนวนของเซลล์ไมโอไฟโบรบลาสต์ต่อพื้นที่อ้างอิงทั้งหมด (162 x 124 ตารางไมโครเมตร)

3. การวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของท่อภายในหลอดเลือดฝอย โดยการถ่ายภาพสไลด์เนื้อเยื่อที่ย้อมด้วย H&E ภายใต้กล้อง LM ที่กำลังขยาย 60 เท่า ซึ่งเกณฑ์ที่ใช้ในการวัดคือ หลอดเลือดฝอยจะต้องเป็นส่วนที่ตัดตามขวางและมีท่อภายในหลอดเลือดฝอยที่กลม โดยบ่งชี้จากอัตราส่วนของท่อภายในหลอดเลือดฝอยระหว่าง maximum axis ต่อ minimum axis จะต้องน้อยกว่า 1.5 ซึ่งจะนำค่า minimum axis มาในการคำนวณหาค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของท่อภายในหลอดเลือดฝอยจำนวน 50 หลอดเลือดฝอย (de Waard *et al.*, 2020)

4. การหาร้อยละของการสะสมของเส้นใยคอลลาเจน โดยการถ่ายภาพสไลด์เนื้อเยื่อที่ย้อม

ด้วย Masson's trichrome ภายใต้กล้อง LM ที่กำลังขยาย 60 เท่า และนำมาวัดปริมาณสัดส่วนเส้นใยคอลลาเจนต่อพื้นที่อ้างอิงทั้งหมด (162 x 124 ตารางไมโครเมตร)

การวิเคราะห์ทางสถิติ

ผลการศึกษาเชิงปริมาณจะแสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน โดยใช้ Mann-Whitney U test ในการเปรียบเทียบค่าหน้าหน้าระหว่างกลุ่มการทดลอง และ unpaired t-test ในการเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มการทดลองของค่าเฉลี่ยความหนาของชั้นหนังแท้ จำนวนของเซลล์ไมโอไฟโบรบลาสต์ ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของท่อภายในหลอดเลือดฝอย และร้อยละของการสะสมของเส้นใยคอลลาเจน โดยกำหนดค่าความเชื่อมั่นน้อยกว่า 0.05 (p -value < 0.05)

ผลการทดลองและวิจารณ์

ผลการศึกษาลักษณะทางจุลกายวิภาคและเชิงปริมาณของผิวหนังชั้นหนังแท้

จากการศึกษาผลของระดับน้ำตาลในเลือดและในปัสสาวะของหนูกลุ่มเบาหวานทั้งสองระยะมีค่ามากกว่า 300 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร และ 500 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร ตามลำดับ ซึ่งเป็นการบ่งชี้ถึงภาวะเบาหวาน นอกจากนี้หนูกลุ่มเบาหวานมีน้ำหนักลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p -value < 0.05) เมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุมในระยะเดียวกัน (Table 1)

Table 1 Comparisons in the parameters of the short- and long-termed diabetic and age-match control rats

Parameters	Short-termed groups		Long-termed groups	
	Control	Diabetes	Control	Diabetes
Blood glucose concentration (mg/dL)	130.50±20.26	446.00±23.24#	122.00±20.26	451.62±22.72#
Urine glucose concentration (mg/dL)	0	>500#	0	>500#
Body weight (g)	331.50±24.56	206.00±5.56*	405±38.56	239.50±13.86*

Blood glucose concentration, urine glucose concentration, and body weight were showed as mean ± Standard error of the mean.

Diagnostic values for diabetes (fasting blood glucose concentration higher than 300 mg/dL, urine glucose concentration higher than 500 mg/dL)

* p-value < 0.05 diabetes compared to control

จากผลการศึกษาลักษณะทางจุลกายวิภาคของผิวหนังชั้นหนังแท้ภายใต้กล้อง LM ที่กำลังขยายต่ำ ผิวหนังของหนูกลุ่มควบคุมทั้งระยะเริ่มต้นและระยะเรื้อรัง ประกอบด้วยชั้นหนังกำพร้าและชั้นหนังแท้ ซึ่งแยกจากกันด้วย dermo-epidermal junction โดยบริเวณใต้ต่อชั้นหนังแท้พบชั้นกล้ามเนื้อ (Figures 1A, 1B) เมื่อพิจารณาโครงสร้างของชั้นหนังแท้ที่กำลังขยายสูงขึ้น พบองค์ประกอบหลักเป็นเส้นใยคอลลาเจน ที่มีขนาดเล็กละเอียดไปจนถึงขนาดกลาง ลักษณะเป็นคลื่นจัดเรียงตัวกันอย่างเป็นระเบียบระหว่างเส้นใยคอลลาเจนเหล่านี้พบเซลล์ไฟโบรบลาสต์ ซึ่งมีรูปร่างคล้ายกระสวย นิวเคลียสติดสีเข้มรูปทรงรีหรือแบนยาว และเซลล์ไมโอไฟโบรบลาสต์ ซึ่งมีรูปร่างไม่แน่นอน นิวเคลียสขนาดใหญ่ติดสีจาง และมีนิวคลีโอลัสชัดเจน บริเวณใต้ต่อ dermo-epidermal junction พบหลอดเลือดฝอยจำนวนมากทำหน้าที่ส่งเลือดจากชั้นหนังแท้ ไปเลี้ยงบริเวณชั้นหนังกำพร้า โดยโครงสร้างของหลอดเลือดฝอยประกอบด้วยเซลล์บุผนังหลอดเลือดที่มีนิวเคลียสแบน เรียงตัวชั้นเดียวล้อมรอบท่อภายในหลอดเลือดฝอย และสามารถพบเซลล์เพอร์ซิไซด์ ที่มีนิวเคลียสหนาแน่นติดสีจางสัมพันธ์อยู่ด้านนอก (Figures 2A, 2B, 3A, 3B)

ผลการทดลองในหนูกลุ่มเบาหวานระยะเริ่มต้นและระยะเรื้อรังที่กำลังขยายต่ำ พบว่าความ

หนาของผิวหนังชั้นหนังแท้เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในหนูกลุ่มเบาหวานระยะเริ่มต้น (329.82±5.32 ไมโครเมตร) และระยะเรื้อรัง (335.07±5.91 ไมโครเมตร) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมระยะเริ่มต้น (268.92±5.88 ไมโครเมตร) และระยะเรื้อรัง (295.99±4.4 ไมโครเมตร) ตามลำดับ (Figures 1C, 1D and 1E) เมื่อพิจารณาในกำลังขยายที่สูงขึ้นพบจำนวนของเซลล์ไมโอไฟโบรบลาสต์เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในหนูกลุ่มเบาหวานระยะเริ่มต้น (4.01±0.16 เซลล์ต่อพื้นที่อ้างอิง) และระยะเรื้อรัง (7.2±0.23 เซลล์ต่อพื้นที่อ้างอิง) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมระยะเริ่มต้น (2.97±0.09 เซลล์ต่อพื้นที่อ้างอิง) และระยะเรื้อรัง (3.75±0.16 เซลล์ต่อพื้นที่อ้างอิง) (Figure 2E) นอกจากนี้ยังพบเส้นใยคอลลาเจน ที่มีขนาดใหญ่ขึ้นและจัดเรียงตัวอัดกันอย่างหนาแน่น ซึ่งสอดคล้องกับการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของร้อยละของการสะสมของเส้นใยคอลลาเจน ในหนูกลุ่มเบาหวานระยะเริ่มต้น (ร้อยละ 43.6±0.39) และระยะเรื้อรัง (ร้อยละ 44.6±0.42) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมระยะเริ่มต้น (ร้อยละ 33.41±0.42) และระยะเรื้อรัง (ร้อยละ 36.75±0.39) (Figure 3E) ซึ่งการเปลี่ยนแปลงเหล่านี้ปรากฏขึ้นในกลุ่มหนูเบาหวานทั้งสองระยะ โดยพบว่ามี ความรุนแรงมากขึ้นในกลุ่มหนูเบาหวานระยะเรื้อรัง จากงานวิจัยของ Tuleta *et al.* (2021) รายงานว่าระดับ

น้ำตาลกลูโคสในเลือดสูง ทำให้เกิด reactive oxygen species (ROS) เพิ่มขึ้นในเซลล์ต่างๆ ของผิวหนังชั้นหนังแท้ เช่น เซลล์บุผนังหลอดเลือด เซลล์ไฟโบรบลาสต์ และ เซลล์เพอร์ซิไซท์ ส่งผลให้กระตุ้นการสร้างและหลั่ง transforming growth factor beta (TGF- β) ซึ่งสามารถไปจับกับ TGF- β type II receptor บนเยื่อหุ้มเซลล์ไฟโบรบลาสต์และเซลล์เพอร์ซิไซท์ ในชั้นหนังแท้ และกระตุ้น Smad signaling pathway ภายในเซลล์ให้เกิดการสังเคราะห์โปรตีน alpha-smooth muscle actin ทำให้เซลล์ไฟโบรบลาสต์ และ เซลล์เพอร์ซิไซท์ เปลี่ยนแปลงลักษณะไปเป็นเซลล์ไมโอไฟโบรบลาสต์ที่เป็นลักษณะถูกกระตุ้นแล้ว ส่งผลให้มีการสร้างเส้นใยคอลลาเจน เพิ่มขึ้นอย่างผิดปกติสะสมในผิวหนังชั้นหนังแท้ (Figures 2C, 2D, 3C, 3D) และเป็นสาเหตุให้ความหนาของชั้นหนังแท้เพิ่มขึ้นอย่างผิดปกติในภาวะเบาหวาน (Linn *et al.*, 2012)

นอกจากนี้ยังพบว่าภาวะเบาหวานส่งผลให้หลอดเลือดฝอย บริเวณ dermo-epidermal junction เกิดการเปลี่ยนแปลง ได้แก่ การบวมของเซลล์บุผนังหลอดเลือดและเพอร์ซิไซท์ เนื่องจากระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดสูงจากภาวะเบาหวาน ทำให้เซลล์บุผนังหลอดเลือดและเพอร์ซิไซท์ มีการสะสมน้ำตาลกลูโคสภายในเซลล์ปริมาณมากกว่าระดับกระบวนการเผาผลาญอาหารของเซลล์ เซลล์จึงเกิดการปรับตัวเพื่อเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสส่วนเกินไปเป็นซอร์บิทอลและฟรักโทส ตามลำดับ ผ่านกระบวนการ polyol pathway ซึ่งการเปลี่ยนซอร์บิทอลไปเป็นฟรักโทส ด้วยเอนไซม์ sorbitol dehydrogenase นั้นเกิดขึ้นได้ช้าจึงทำให้มีการสะสมซอร์บิทอลภายในไซโทพลาซึมของเซลล์ ทำให้มีการเพิ่มขึ้นของ intracellular oncotic pressure และเกิดการดึงน้ำเข้าสู่เซลล์ทำให้เซลล์เกิดการบวม นอกจากนี้ polyol pathway ยังทำให้เกิดการสร้าง ROS เพิ่มขึ้น (Dagher *et al.*, 2004; Lorenzi 2007) ส่งผลให้ดีเอ็นเอของไมโทคอนเดรีย และ lipid peroxidation ของ mitochondrial membrane ส่งผลยับยั้ง

กระบวนการถ่ายทอดอิเล็กตรอน ทำให้การสร้าง ATP ลดลง ส่งผลกระทบต่อการทำงานของ Na^+/K^+ ATPase pump และ $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger ที่ผิวเซลล์ ทำให้ Na^+ และ Ca^{2+} คั่งภายในเซลล์ เกิดภาวะ cellular hyperosmolarity เกิดการแพร่ของน้ำเข้าสู่เซลล์ (Soriano *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2018) จึงส่งผลให้เซลล์เกิดการบวมน้ำ นอกจากนี้ ยังพบว่าในหนูเบาหวานระยะเรื้อรังเซลล์บุผนังหลอดเลือด มีลักษณะ cell shrinkage ร่วมกับมีนิวเคลียสขนาดเล็กและย้อมติดสีเข้มอย่างผิดปกติ ซึ่งเป็นผลมาจากระดับ Ca^{2+} และ ROS ที่สูงขึ้นใน mitochondria กระตุ้นการเปิดของ mitochondrial permeability transitional pore ทำให้เกิดการหลั่ง cytochrome C ก่อให้เกิดการตายของเซลล์ ผ่าน mitochondria-dependent apoptotic pathway โดยการกระตุ้นเอนไซม์ที่ย่อยทำลายโปรตีนโครงสร้างของเซลล์และเอนไซม์ย่อยทำลายโครมาตินให้เสียหายและทับถมอยู่ในนิวเคลียส (Kumar *et al.*, 2012) อีกทั้งยังพบว่าภาวะเบาหวานส่งผลให้ท่อภายในหลอดเลือดฝอยมีขนาดเล็กลง สอดคล้องกับการลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของท่อภายในหลอดเลือดฝอยในหนูกลุ่มเบาหวานระยะเริ่มต้น (3.07 ± 0.09 ไมโครเมตร) และระยะเรื้อรัง (2.53 ± 0.06 ไมโครเมตร) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมระยะเริ่มต้น ($3.48 \pm 0.11 \pm$ ไมโครเมตร) และระยะเรื้อรัง (4 ± 0.09 ไมโครเมตร) สาเหตุจากภาวะน้ำตาลกลูโคสในเลือดสูง ส่งผลให้ micro RNA-1 ลดลง และ DNA เสียหายจากการเพิ่มขึ้นของ ROS ส่งผลกระตุ้น poly (ADP-ribose) polymerase ทำให้เพิ่ม gene expression ของ nuclear factor kappa B และ activator protein 1 กระตุ้นการสร้างและหลั่ง endothelin-1 ซึ่งเป็น vasoconstrictor เพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้ภาวะน้ำตาลกลูโคสในเลือดสูง ยังไปกระตุ้น protein kinase C β II ส่งผลยับยั้ง endothelial nitric oxide synthase ที่เปลี่ยน L-Arginine ไปเป็น nitric oxide ซึ่งทำหน้าที่เป็น vasodilator ปัจจุบันจึงส่งผลให้หลอดเลือดเสื่อมดุลของ vascular

tone ทำให้ท่อน้ำในหลอดเลือดฝอยเกิดการตีบแคบ
ลงได้ในภาวะเบาหวาน (Minchenko *et al.*, 2003)
(Figures 2C, 2D and 2F) ซึ่งการเปลี่ยนแปลงทาง

โครงสร้างของชั้นหนังแท้เหล่านี้สามารถส่งผลกระทบต่อ
ต่อหน้าที่ของผิวหนังอย่างมาก

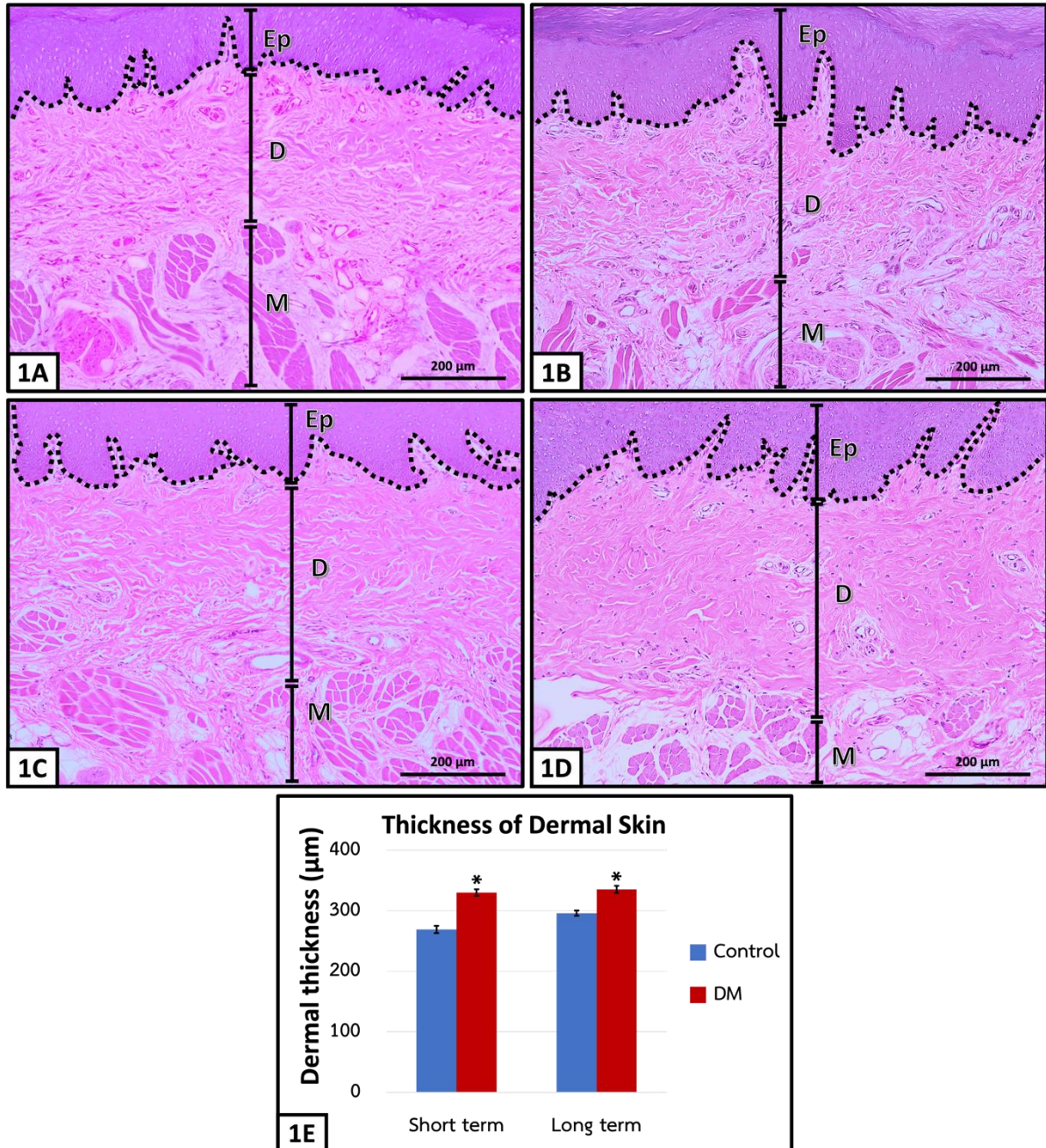


Figure 1 Light micrographs demonstrated the skin at the plantar sides of paw skin in the short- and long-termed control (1A, 1B) and short- and long-termed diabetic (1C, 1D) rats: H&E staining technique. Epidermis (Ep), dermis (D), muscular layer (M), and dermo-epidermal junction (black dotted lines). Comparisons in the dermal thickness of plantar sides of paw skin in the short- and long-termed control and short- and long-termed diabetic rats (1E). (* p -value < 0.05 diabetes compared to control)

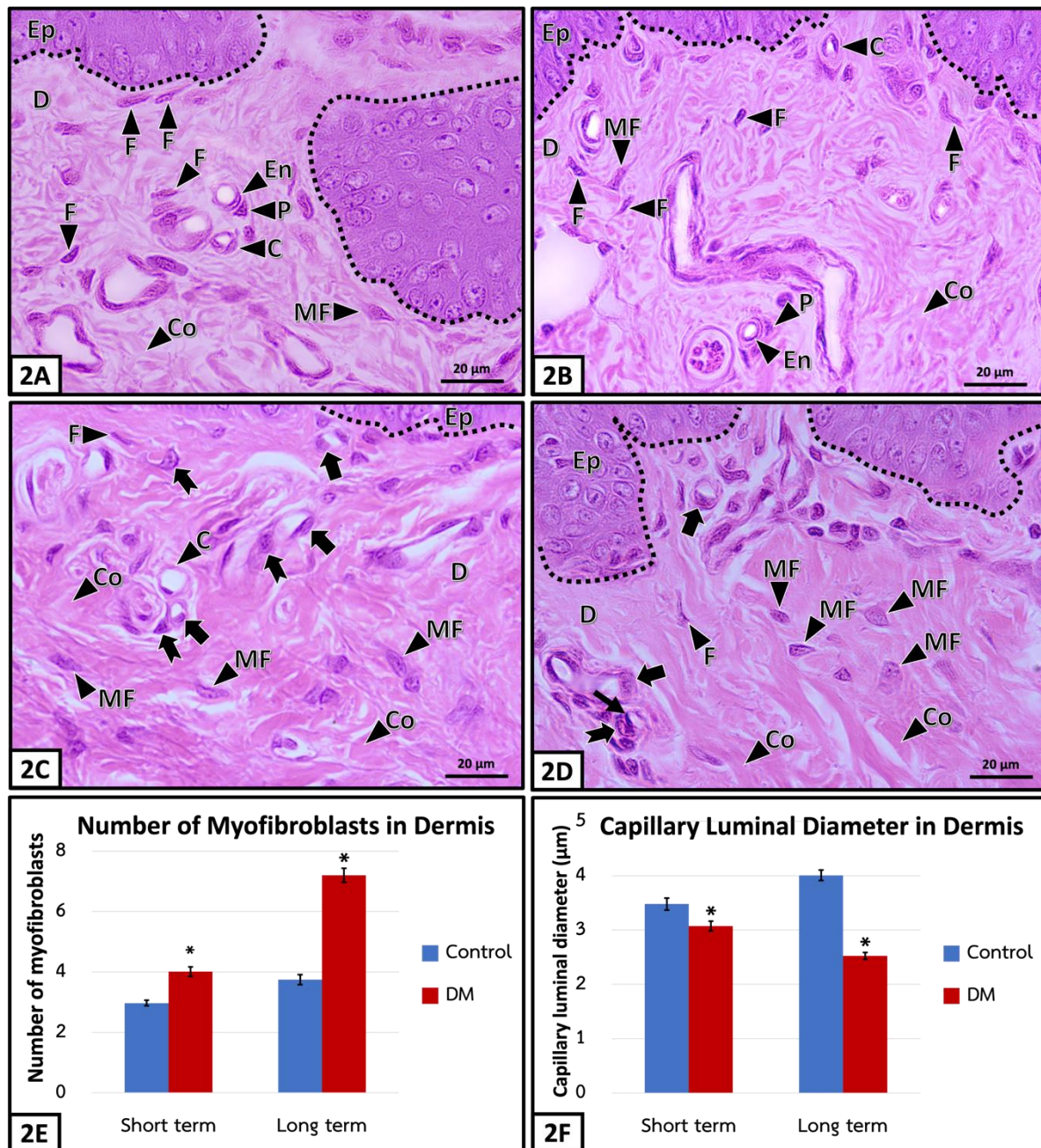


Figure 2 Light micrographs demonstrated the components of dermis at the plantar sides of paw skin in the short- and long-termed control (2A, 2B) and short - and long-termed diabetic (2C, 2D) rats: H&E staining technique. Epidermis (Ep), dermis (D), dermo-epidermal junction (black dotted lines), fibroblasts (F), myofibroblasts (MF), collagen fiber (Co), capillaries (C), endothelial cells (En), pericyte (P), the swelling of endothelial cells (thick black arrows), endothelial cell shrinkage with dark nuclear staining (thin black arrow), and the swelling of pericytes (notched thick black arrows). Comparisons in the number of myofibroblasts in the dermal skin in the short- and long-termed control and short- and long-termed diabetic rats (2E). Comparisons in the number of capillary collapses of the dermo-epidermis junction in the short- and long-termed control and short- and long-termed diabetic rats (2F). (* p -value < 0.05 diabetes compared to control)

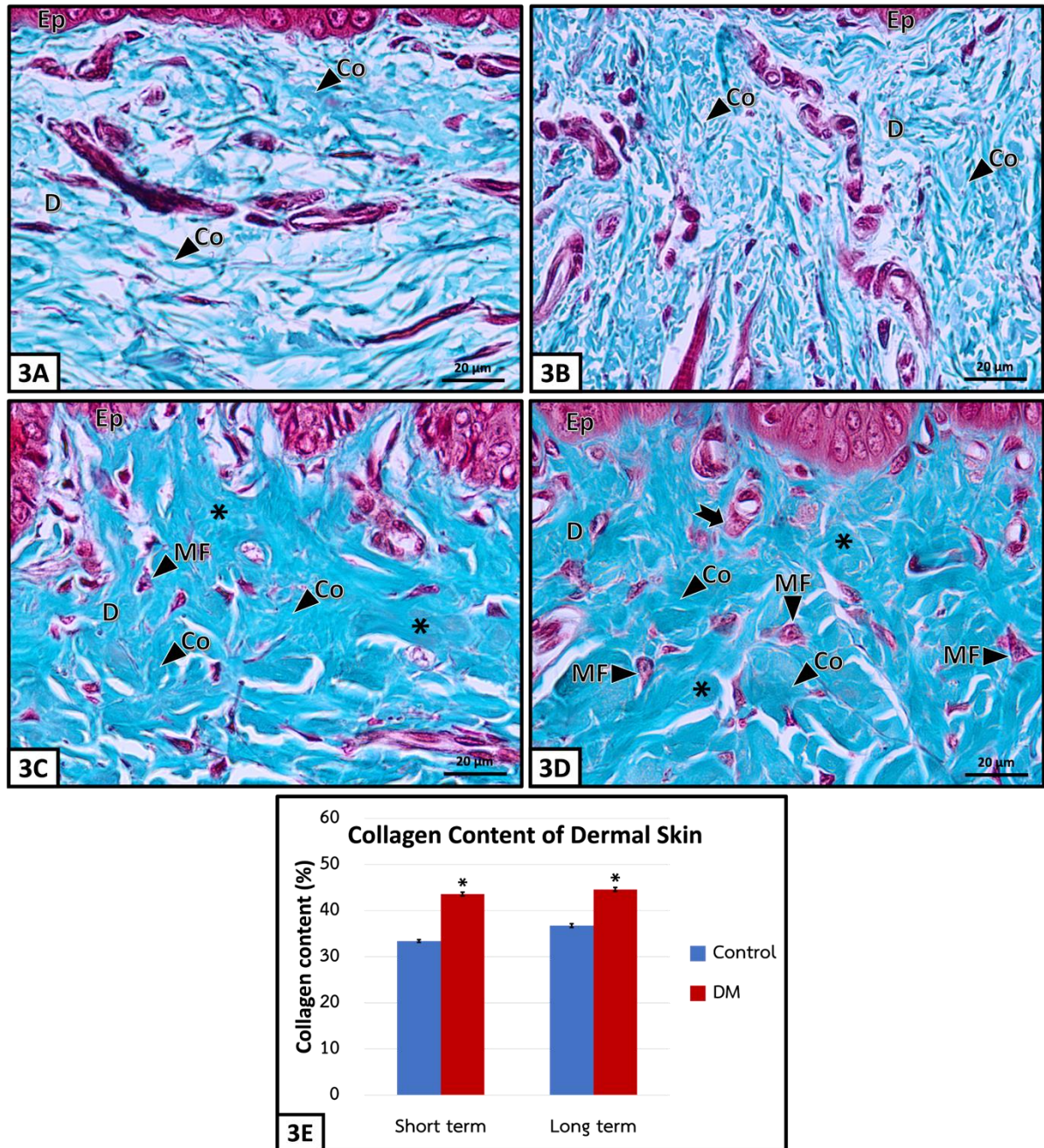


Figure 3 Light micrographs demonstrated collagen fibers at the plantar sides of paw skin in the short- and long-termed control (3A, 3B) and short- and long-termed diabetic (3C, 3D) rats: Masson's trichrome staining technique. Epidermis (Ep), dermis (D), collagen fiber (Co), the broad bundle of collagen (black asterisks), myofibroblasts (MF), and the swelling of pericytes (a notched thick black arrow). Comparisons in % collagen contents in the dermal skin in the short- and long-termed control and short- and long-termed diabetic rats (3E). (* p -value < 0.05 diabetes compared to control)

สรุปผลและเสนอแนะ

ผลจากการศึกษาในงานวิจัยนี้พบว่าระดับน้ำตาลในเลือดที่สูงขึ้นจากภาวะเบาหวานส่งผลกระทบต่อผิวหนัง โดยทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของผิวหนังชั้นหนังแท้ทั้งระยะเริ่มต้นและระยะเรื้อรัง ซึ่งจะมีความรุนแรงของพยาธิสภาพเพิ่มมากขึ้นในระยะเรื้อรัง โดยพบว่าความหนาของผิวหนังชั้นหนังแท้เพิ่มขึ้นจากการเพิ่มขึ้นของเซลล์ไมโอไฟโบรบลาสต์ ส่งผลให้มีการสะสมของเส้นใยคอลลาเจนมากขึ้น อีกทั้งยังพบการรวมและตายของเซลล์หลอดเลือดฝอย ทั้งเซลล์บุผนังหลอดเลือดและเพอร์ริไซต์ ส่วนที่อยู่ในหลอดเลือดฝอยมีการตีบแคบลง สอดคล้องกับการลดลงของค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของท่อภายในหลอดเลือดฝอย การเปลี่ยนแปลงเหล่านี้สามารถส่งผลให้เกิดพังผืดบริเวณชั้นหนังแท้ ซึ่งจะกระตุ้นให้เกิดรอยโรคที่ผิวหนังและอาจส่งผลกระทบต่อการทำงานของ skin derivative ร่วมกับความผิดปกติของหลอดเลือดที่ส่งผลให้สูญเสียการนำออกซิเจน และสารอาหารไปเลี้ยงผิวหนังและส่วนประกอบภายในผิวหนัง ดังนั้นเมื่อเกิดบาดแผลจะทำให้การหายของแผลช้า เสี่ยงต่อการติดเชื้อที่ผิวหนัง และเกิดการตายของเนื้อเยื่อ นำไปสู่ความรุนแรงจากการสูญเสียอวัยวะบริเวณแขนและขาของผู้ป่วยโรคเบาหวาน ซึ่งความรู้ที่ได้จากการศึกษานี้ทำให้ทราบถึงการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบที่สำคัญในผิวหนังชั้นหนังแท้จากภาวะเบาหวานตั้งแต่ระยะเริ่มต้นจนถึงระยะเรื้อรัง อันเป็นประโยชน์ทางคลินิกในการวางแผนการรักษาผู้ป่วยเบาหวานได้ทันทั่วถึง เพื่อให้ผู้ป่วยเบาหวานมีภาวะแทรกซ้อนทางผิวหนังได้น้อยที่สุด และมีคุณภาพชีวิตที่ดีขึ้น

เอกสารอ้างอิง

- Chen, X.F., W.D. Lin, S.L. Lu, T. Xie, K. Ge, Y.Q. Shi, J.J. Zou, Z.M. Liu and W.Q. Liao. (2010). Mechanistic study of endogenous skin lesions in diabetic rats. *Experimental Dermatology*, 19(12), 1088- 1095. doi: 10.1111/j.1600-0625.2010.01137.x.
- Dagher, Z., Y.S. Park, V. Asnaghi, T. Hoehn, C. Gerhardinger and M. Lorenzi. (2004). Studies of rat and human retinas predict a role for the polyol pathway in human diabetic retinopathy. *Diabetes*, 53(9) , 2404- 2411. doi: 10.2337/diabetes.53.9. 2404.
- De Macedo, G.M. C., S. Nunes and T. Barreto. (2016). Skin disorders in diabetes mellitus: an epidemiology and physiopathology review. *Diabetology & Metabolic Syndrome*, 8(1), 1-8. doi: 10.1186/s13098-016-0176-y.
- De Waard, G.A., H. R. Hollander, D. Ruiters, T. ten Bokkel Huinink, R. Meer, N. W. van der Hoeven, E. Meester, J. A. Beliën, H. W. Niessen and N. van Royen. (2020). Downstream influence of coronary stenoses on microcirculatory remodeling: a histopathology study. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 40(1), 230-238. doi: 10.1161/ATVBAHA.119.313462.

- Demirseren, D.D., S. Emre, G. Akoglu, D. Arpacı, A. Arman, A. Metin and B. Cakir. (2014). Relationship between skin diseases and extracutaneous complications of diabetes mellitus: clinical analysis of 750 patients. *American Journal of Clinical Dermatology*, 15(1), 65-70. doi: 10.1007/s40257-013-0048-2.
- Gkogkolou, P. and M. Böhm. (2014). Skin disorders in diabetes mellitus. *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*, 12 (10) , 847-864. doi: 10.1111/ddg.12424.
- Kumar, S., V. Kain and S.L. Sitasawad. (2012). High glucose-induced Ca²⁺ overload and oxidative stress contribute to apoptosis of cardiac cells through mitochondrial-dependent and independent pathways. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1820(7): 907-920. doi: 10.1016/j.bbagen.2012.02.010.
- Lennertz, R.C., K.A. Medler, J.L. Bain, D.E. Wright and C.L. Stucky. (2011). Impaired sensory nerve function and axon morphology in mice with diabetic neuropathy. *Journal of Neurophysiol.* 106(2): 905-914.
- Linn, G.R., H. Ling, K.D. Wu, T.J. Tsai, Y.M. Chen, J. S. Duffield and S. L. Lin. (2012). Transforming growth factor β -1 stimulates profibrotic epithelial signaling to activate pericyte- myofibroblast transition in obstructive kidney fibrosis. *The American Journal of Pathology*, 182(1), 118-131. doi: 10.1152/jn.01123.2010.
- Lorenzi, M. (2007). The polyol pathway as a mechanism for diabetic retinopathy: attractive, elusive, and resilient. *Journal of Diabetes Research*, 2007, 1-10. doi: 10.1155/2007/61038
- Makrantonaki, E. , D. Jiang, A. M. Hossini, G. Nikolakis, M. Wlaschek, K. Scharffetter-Kochanek and C. C. Zouboulis. (2016). Diabetes mellitus and the skin. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 17(3), 269-282. doi: 10.1007/s11154-016-9373-0.
- Merecz-Sadowska, A., P. Sitarek, E. Kucharska, T. Kowalczyk, K. Zajdel, T. Cegliński and R. Zajdel. (2021). Antioxidant properties of plant-derived phenolic compounds and their effect on skin fibroblast cells. *Antioxidants*, 10(5), 726. doi: 10.3390/antiox10050726.
- Minchenko, A. G. , M. J. Stevens, L. White, O. I. Abatan, K. Komjáti, P. Pachter, C. Szabó and I. G. Obrosova. (2003). Diabetes-induced overexpression of endothelin-1 and endothelin receptors in the rat renal cortex is mediated via poly (ADP-ribose) polymerase activation. *The FASEB Journal*, 17(11), 1-8. doi: 10.1096/fj.03-0013fje.
- Soriano, F., L. Virág and C. Szabó. (2001). Diabetic endothelial dysfunction: role of reactive oxygen and nitrogen species production and poly (ADP-ribose) polymerase activation. *Journal of Molecular Medicine*, 79, 437-448. doi: 10.1007/s001090100236.

- Techarang, T., Lanlua, P., Niyomchan, A., Plaengrit, K., Chookliang, A. and Sricharoenvej, S. (2017). Epidermal modification in skin of streptozotocin-induced diabetic rats. *Walailak Journal of Science and Technology*, 14(8), 671-676.
- Tellechea, A., A. Kafanas, E.C. Leal, F. Tecilazich, S. Kuchibhotla, M.E. Auster, I. Kontoes, J. Paolino, E. Carvalho, L.P. Nabzdyk and A. Veves. (2013). Increased skin inflammation and blood vessel density in human and experimental diabetes. *The International Journal of Lower Extremity Wounds*, 12(1), 4-11. doi: 10.1177/1534734612474303.
- Tortora, G. J. and B. H. Derrickson. (2018). Principles of anatomy and physiology (15 Ed). New Jersey: John Wiley and Sons.
- Tuleta, I. and N.G. Frangogiannis. (2021). Diabetic fibrosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1867(4) 1-20. doi: 10.1016/j.bbadis.2020.166044.
- Wang, Y.N., K. Lee and W.R. Ledoux. (2011). Histomorphological evaluation of diabetic and non-diabetic plantar soft tissue. *Foot & Ankle International*, 32(8), 802-810. doi: 10.3113/FAI.2011.0802.
- Wu, M.Y., G.T. Yiang, T.T. Lai and C. J. Li. (2018). The oxidative stress and mitochondrial dysfunction during the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018, 1-12. doi: 10.1155/2018/3420187.
- Xue, M., R. Zhao, L. March and C. Jackson. (2022). Dermal fibroblast heterogeneity and its contribution to the skin repair and regeneration. *Advances in Wound Care*, 11(2), 87-107. doi: 10.1089/wound.2020.0.1287.
- Yagihashi, S., Mizukami, H. and Sugimoto, K.. (2011). Mechanism of diabetic neuropathy: where are we now and where to go?. *Journal of Diabetes Investigation*, 2(1), 18-32. doi: 10.1111/j.2040-1124.2010.00070.x.