



HE008

การศึกษาปริมาณทรานส์ฟอร์มมิ่งโกรทแฟคเตอร์-เบต้า1 ในเพลทเลทริชไฟบรินเมมเบรน
ที่ผ่านการบีบอัดด้วยความร้อน

Quantification of transforming growth factor-beta1 in heat-compressed
platelet-rich fibrin membrane

กมลชนก นฤมล¹

ศธาวัช เตชะสุทธิรัฐ²

บทคัดย่อ

เพลทเลทริชไฟบริน ถือเป็นแหล่งรวมโกรทแฟคเตอร์ ซึ่งช่วยกระตุ้นการซ่อมแซมและการสร้างเนื้อเยื่อใหม่ มีการนำมาใช้ทางทันตกรรมอย่างแพร่หลาย เกิดแนวคิดในการปรับปรุงโครงสร้าง ด้วยการบีบอัดเพลทเลทริชไฟบรินเมมเบรนด้วยความร้อน เพื่อลดอัตราการสลายตัว แต่ปัจจุบันยังมีการศึกษาไม่มากนัก การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาผลของการบีบอัดเพลทเลทริชไฟบริน เมมเบรนด้วยความร้อนต่อปริมาณทรานส์ฟอร์มมิ่งโกรทแฟคเตอร์-เบต้า1 ซึ่งพบได้ปริมาณมาก และเป็นส่วนสำคัญในกระบวนการหายของแผล

การเตรียมเพลทเลทริชไฟบริน ใช้เลือดจากอาสาสมัครที่มีสุขภาพแข็งแรง จำนวน 10 คน แล้วนำมาผ่านการบีบอัดด้วยความร้อนที่อุณหภูมิต่างๆ แบ่งเป็น 6 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มควบคุม ที่ไม่ผ่านความร้อน และกลุ่มทดลอง ที่บีบอัดด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 60, 70, 80, 90 และ 100 องศาเซลเซียส ทำการสกัดโกรทแฟคเตอร์จากเมมเบรนในทันที และหาปริมาณทรานส์ฟอร์มมิ่งโกรทแฟคเตอร์-เบต้า1 ด้วยวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนต์แอสเสย์ หลังจากนั้นเก็บเลือดจากอาสาสมัคร 3 คน เพื่อใช้ในการศึกษาปริมาณการปล่อยทรานส์ฟอร์มมิ่งโกรทแฟคเตอร์-เบต้า1 เมื่อแช่เพลทเลทริชไฟบรินเมมเบรนในอาหารเลี้ยงเซลล์ ในช่วงเวลา 14 วัน

การตรวจวัดจากสารสกัดพบว่า กลุ่มทดลองที่ใช้ความร้อนบีบอัด จะมีปริมาณทรานส์ฟอร์มมิ่งโกรทแฟคเตอร์-เบต้า1 ลดลงจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.01$) การใช้อุณหภูมิที่สูงขึ้น จะทำให้ทรานส์ฟอร์มมิ่งโกรทแฟคเตอร์-เบต้า1 ในเมมเบรนมีปริมาณลดน้อยลง ซึ่งพบว่าลดลงอย่างมากในกลุ่ม 90 และ 100 องศาเซลเซียส ทั้งนี้ โกรทแฟคเตอร์ถูกจะปล่อยออกมามากในช่วงแรก และเริ่มมีปริมาณน้อยลงในช่วงหลัง โดยมีรูปแบบที่แตกต่างกันในแต่ละกลุ่ม

คำสำคัญ : เพลทเลทริชไฟบริน, ทรานส์ฟอร์มมิ่งโกรทแฟคเตอร์-เบต้า1

¹นักศึกษานิเทศศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาศิลปศาสตร์ช่องปากและแม็กซ์ซิลโลเฟเชียล

คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

²ภาควิชาศิลปศาสตร์ช่องปากและแม็กซ์ซิลโลเฟเชียล คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Abstract

Platelet-rich fibrin (PRF) serves as a source of growth factors for promoting tissue repair and regeneration. It has been used widely in dentistry. Heat-compression technique was developed for modifying the cross-linking of fibrin structure to reduce rate of degradation, but very few studies have been carried out until now. This study aimed to evaluate the effect of heat-compression on the level of transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1), representative growth factor with high concentration in platelet-rich fibrin and key factor in wound healing process.

PRF membranes were prepared from blood samples of ten healthy volunteers. Then the membrane samples were heat-compressed with different temperature and divided into six groups: Control (no heat), 60, 70, 80, 90 and 100 degrees Celsius. Extraction of growth factors were done immediately. TGF-beta1 concentration was measured with enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Blood samples were collected from the same three volunteers for analysis of TGF-beta1 release. PRF membranes were placed in media (DMEM) for 14 days. TGF-beta1 release amounts were measure from collected media at five time periods.

In immediate extraction part, heat compression significantly decreased the TGF-beta1 level in comparison with that of control group. Moreover, the result showed a decrease TGF-beta1 level by increase temperature using for heat compression. The dramatic decrease of TGF-beta1 level was found in 90 and 100 degrees Celsius group. A high release of TGF-beta1 in the early study time was observed, follow by a marked decrease in the late study time with slight difference of TGF-beta1 release kinetics in each sample group.

Keywords : platelet-rich fibrin, transforming growth factor-beta1

1. บทนำ

ปัญหาการสูญเสียกระดูกเข้าฟันเกิดได้จากหลายสาเหตุ การชักนำให้กระดูกคืนสภาพ (guided bone regeneration, GBR) เป็นวิธีการที่ช่วยส่งเสริมให้เกิดการสร้างกระดูกใหม่ โดยใช้เมมเบรนกั้น (barrier membrane) แบ่งกั้นส่วนของเนื้อเยื่ออ่อนจากบริเวณรับกระดูกปลูก ให้เกิดเป็นที่อยู่ของเซลล์สร้างกระดูก และป้องกันการ

เจริญของเซลล์เนื้อเยื่ออ่อนเข้ามา (Dahlin, Linde et al. 1988) ซึ่งเมมเบรนชนิดสลายตัวได้เองนั้นเป็นที่นิยมและมีการพัฒนาอย่างต่อเนื่อง (Zhang, Zhang et al. 2013) แต่ก็ยังมีข้อด้อยที่สำคัญ คือมีราคาสูง และระยะเวลาการสลายตัวเร็ว หรือขาดการฉีดยาก

พลาทเลทริชไฟบริน (Platelet-rich fibrin, PRF) เป็นชีววัสดุที่ได้มาจากการนำเลือดของผู้ป่วย



ป็นเหรียญในหลอดแก้วโดยไม่ต้องใส่สารเพิ่มเติม ประกอบด้วยเกล็ดเลือด เม็ดเลือดขาวอยู่ในร่างแหไฟบรินที่มีความหนาแน่นสูง มีการปล่อยโกรทแฟคเตอร์ออกมาอย่างช้าๆ ตามการสลายตัวของไฟบริน (Dohan, Choukroun et al. 2006) เมื่อกรดรีดของเหลวออกจากเพลาทเลทริชไฟบริน จะได้เป็นเมมเบรนที่มีความต้านทานสูงขึ้น ใช้งานได้ง่าย ราคาไม่แพง ทำให้เกิดแนวคิดในการนำมาใช้เป็นเมมเบรนกัน (Zhang, Zhang et al. 2013)

อย่างไรก็ดี เมื่อเปรียบเทียบกับคอลลาเจนเมมเบรนในท้องตลาด เพลาทเลทริชไฟบรินเมมเบรนยังขาดคุณสมบัติเชิงกลที่ดี มีความแข็งแรงไม่เพียงพอ และสลายตัวเร็ว (Sam, Vadakkekuttical et al. 2015) จึงได้มีการศึกษาปรับปรุงโครงสร้างเพื่อลดอัตราการสลายตัว ด้วยการบีบอัดด้วยความร้อน (Kawase, Kamiya et al. 2015) แต่ในปัจจุบันยังไม่มีหลักฐานงานวิจัยมากเพียงพอที่จะสนับสนุนการใช้งานในทางคลินิก อีกทั้งยังขาดการศึกษาถึงผลของความร้อนต่อคุณสมบัติอื่นๆ เช่น ความแข็งแรง คุณสมบัติในการกระตุ้นเซลล์ การเร่งการหายของแผล และปริมาณโกรทแฟคเตอร์

ผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาผลของการบีบอัดเพลาทเลทริชไฟบรินด้วยความร้อน ต่อปริมาณทรานส์ฟอร์มมิงโกรทแฟคเตอร์-เบต้า1 ซึ่งเป็นโกรทแฟคเตอร์ที่พบในปริมาณมาก มีความสำคัญในกระบวนการหายของแผล และมีคุณสมบัติในการกระตุ้นเซลล์สร้างกระดูก (Eppley, Woodell et al. 2004, Khiste and Naik Tari 2013) โดยผลที่ได้จากการศึกษานี้ จะเป็นข้อมูลพื้นฐานในการพิจารณาเลือกใช้เพลาทเลทริชไฟบรินที่ผ่านการบีบอัดด้วยความร้อนในงานทางทันตกรรม และนำไปสู่การ

พัฒนาคุณสมบัติของเพลาทเลทริชไฟบรินเมมเบรนต่อไป

2. วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาเปรียบเทียบปริมาณทรานส์ฟอร์มมิงโกรทแฟคเตอร์-เบต้า1 ในเพลาทเลทริชไฟบรินเมมเบรนที่ผ่านการบีบอัดด้วยความร้อนที่อุณหภูมิต่างๆ และเพลาทเลทริชไฟบรินเมมเบรนที่เตรียมด้วยวิธีบีบอัดด้วยผ้าก๊อช

3. แนวคิดทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เมมเบรนกันมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่งในการชักนำให้กระดูกคืนสภาพ เนื่องจากทำหน้าที่ป้องกันบริเวณรับกระดูกปลูกจากการเจริญแทรกของเซลล์เนื้อเยื่ออ่อน จนกระทั่งเกิดการสร้างกระดูกโดยสมบูรณ์ อีกทั้งยังทำให้กระดูกปลูกมีเสถียรภาพที่ดี แต่เนื่องด้วยเมมเบรนกันที่ขายในท้องตลาดมีราคาแพง เป็นข้อจำกัดทำให้ผู้ป่วยจำนวนหนึ่งไม่ได้รับการรักษาที่เหมาะสม ดังนั้นหากสามารถลดค่าใช้จ่ายในส่วนนี้ลง โดยใช้วัสดุที่มีราคาถูก ดังเช่นเพลาทเลทริชไฟบรินเมมเบรน ที่เตรียมได้จากเลือดของผู้ป่วยเอง ก็อาจช่วยแก้ปัญหา ทำให้ผู้ป่วยมีโอกาสเข้าถึงการรักษาได้มากขึ้น

เพลาทเลทริชไฟบรินถูกคิดค้นและนำเสนอโดย Choukroun ในปี ค.ศ.2001 จัดเป็นเกล็ดเลือดเข้มข้นรุ่นที่สอง สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ไม่ต้องมีการเติมสารใดๆ ค่าใช้จ่ายต่ำ ทำได้ง่าย เริ่มจากเจาะเลือดจากผู้ป่วย 10 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่ทำจากแก้ว นำไปปั่นเหวี่ยงทันที ที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที หรือประมาณ 400 G เป็นเวลา 10-12 นาที เกล็ดเลือดจะถูกกระตุ้น เข้าสู่กลไก

การแข็งตัวของเลือด เกิดการแยกตัวเป็น 3 ชั้น ชั้นล่างสุดคือ ชั้นของเม็ดเลือดแดงที่ตกตะกอน ชั้นบนสุดคือ ชั้นของพลาสมาไรโซลล์ และชั้นกลางเป็นก้อนเจล เรียกว่า เพลทเลทริชไฟบริน ซึ่งสามารถนำมากรดรีดของเหลวออก ได้แผ่นเมมเบรนที่มีความต้านทานมากขึ้น (Dohan, Choukroun et al. 2006) ประกอบด้วยโครงร่างไฟบริน (fibrin matrix) ที่มีเกล็ดเลือดและเม็ดเลือดขาวอยู่เป็นจำนวนมาก เป็นแหล่งของโกรทแฟคเตอร์ ได้แก่ เพลทเลทดีไรฟ์โกรทแฟคเตอร์ (platelet-derived growth factor, PDGF) ทรานสฟอร์มมิงโกรทแฟคเตอร์เบต้า และโกรทแฟคเตอร์อื่น ซึ่งล้วนมีส่วนเกี่ยวข้องกับกระบวนการเพิ่มจำนวนและเปลี่ยนสภาพเซลล์ การสร้างหลอดเลือดใหม่ ทำให้มีคุณสมบัติในการส่งเสริมการหายของแผล (Dohan, Choukroun et al. 2006)

เมมเบรนกัน แบ่งออกได้เป็น 2 ประเภทใหญ่ คือ เมมเบรนชนิดไม่สลายตัว และเมมเบรนชนิดสลายตัวได้เอง ซึ่งควรมีคุณสมบัติ ได้แก่ ประสานรวมกับเนื้อเยื่อข้างเคียงได้ดี สามารถกันแยกเซลล์ ป้องกันการแทรกของเซลล์เนื้อเยื่ออ่อนใช้งานทางคลินิกได้ง่าย มีความแข็งแรงเพียงพอที่จะสร้างและคงสภาพช่องว่าง ตลอดช่วงการสร้างกระดูกใหม่ และมีความเข้ากันได้ทางชีวภาพ (Rakhmatia, Ayukawa et al. 2013)

ทั้งนี้ เพลทเลทริชไฟบรินเมมเบรน ยังขาดคุณสมบัติที่เหมาะสมที่จะใช้เป็นเมมเบรนกัน เนื่องจากไม่แข็งแรงพอ สลายตัวได้เร็ว จึงมีความพยายามคิดค้นการดัดแปรการเชื่อมโยงข้าม (crosslink) ระหว่างร่างแหไฟบรินด้วยวิธีต่างๆ เพื่อเพิ่มเสถียรภาพและความหนาแน่นแก่โครงสร้างเส้นใยพอลิเมอร์ ส่งผลลดอัตราการสลายตัวเมมเบรนลง

ได้ หนึ่งในวิธีนั้นคือการใช้ความร้อน ซึ่งไม่มีสารที่เป็นพิษต่อเซลล์เหมือนวิธีอื่นๆ (Kawase, Kamiya et al. 2015) อย่างไรก็ตาม การศึกษาผลของการเตรียมเพลทเลทริชไฟบรินเมมเบรนด้วยความร้อน ยังคงมีไม่มากนัก การศึกษาเพิ่มเติมถึงคุณสมบัติต่างๆ ภายหลังการบีบอัดด้วยความร้อน จึงมีความจำเป็นที่จะใช้เป็นข้อมูลในการพิจารณาก่อนนำไปใช้งานในทางคลินิก

4. วิธีดำเนินการ

ทำการทดลองเปรียบเทียบปริมาณทรานส์ฟอร์มมิงโกรทแฟคเตอร์-เบต้า1 จากเพลทเลทริชไฟบรินเมมเบรนกลุ่มทดลองที่ผ่านการบีบอัดด้วยความร้อนที่อุณหภูมิต่างๆ และกลุ่มควบคุมที่ไม่ผ่านความร้อน แบ่งเป็น 2 ส่วน คือ การศึกษาปริมาณโกรทแฟคเตอร์ที่ได้จากการสกัดโดยตรง และปริมาณโกรทแฟคเตอร์ที่ปล่อยออกมาในช่วงเวลาต่างๆ ทั้งนี้การศึกษาได้ผ่านการรับรองโครงการศึกษาวิจัยในมนุษย์ โดยคณะกรรมการพิทักษ์สิทธิสวัสดิภาพและป้องกันอันตรายของผู้ถูกวิจัย คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เลขที่ 14/2560 ซึ่งอาสาสมัครจะได้รับทราบรายละเอียดงานวิจัย และลงชื่อในเอกสารยินยอมก่อนเข้าร่วมงานวิจัย

การเตรียมเพลทเลทริชเมมเบรน

ใช้เลือดจากอาสาสมัคร อายุ 20-30 ปี ที่มีสุขภาพแข็งแรง ไม่มีโรคประจำตัว ไม่สูบบุหรี่ ไม่มีประวัติเคยได้รับยาต้านการแข็งตัวของเลือด และไม่ได้รับยาใดๆ ในช่วง 1 เดือนที่ผ่านมา จำนวน 10 คน ในการศึกษาปริมาณโกรทแฟคเตอร์จากการสกัด โดยทำการเก็บเลือดจากอาสาสมัคร 3 คน เพื่อใช้ในการศึกษาการปล่อยโกรทแฟคเตอร์



ทำการเจาะเก็บเลือดจากอาสาสมัคร

แต่ละคน ทางหลอดเลือดดำ Median cubital ปริมาณ 30 มิลลิลิตร แบ่งใส่หลอดทดลองที่ทำจากแก้วจำนวน 6 หลอด หลอดละ 5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงพร้อมกันทันทีด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (DM0412: Scilogex, LLC, Suite 122 Berlin, USA) ที่แรงหนีศูนย์กลางสัมพัทธ์ 400 g เป็นเวลา 12 นาที เลือดที่ได้จะแบ่งออกเป็น 3 ชั้น ทำการเก็บเฉพาะพลาสมา เลทริชไฟบริน โดยตัดส่วนของเม็ดเลือดแดงที่ติดมาด้วยกรรไกร จากนั้นบีบอัดเอาของเหลวออกให้มีลักษณะเป็นแผ่นเมมเบรน โดยวางพลาสมา เลทริชไฟบรินไว้ระหว่างผ้าก๊อชบนและล่างที่ถูกกั้นด้วยเบ้าอะคริลิกหนา 1 มิลลิเมตร กดทับด้วยแผ่นกระจกหนัก 300 กรัม เป็นเวลา 1 นาที จะได้พลาสมา เลทริชไฟบรินเมมเบรน 6 ชั้น แบ่งเป็นกลุ่มทดลอง 5 ชั้น และกลุ่มควบคุม 1 ชั้น

ซึ่งนำหนักพลาสมา เลทริชไฟบรินเมมเบรนแต่ละชั้น ก่อนห่อด้วยแผ่นพลาสติกโพลีเอทิลีน (Polyethylene) กลุ่มทดลองนำไปผ่านความร้อนโดยบีบอัดด้วยเครื่องรีดผม (Lersacha, Bangkok, Thailand) ที่ปล่อยให้เย็นลงถึงอุณหภูมิที่กำหนดคือ 100, 90, 80, 70 และ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 วินาที ทั้งนี้ได้ควบคุมระยะห่างระหว่างแผ่นความร้อนของเครื่องรีดผมไว้ที่ 1 มิลลิเมตร และตรวจวัดอุณหภูมิที่พื้นผิวแผ่นทำความร้อนด้วยเครื่องวัดอุณหภูมิอินฟราเรด (FT3700-20: Hioki, Nagano, Japan) ก่อนการบีบอัดทุกครั้ง ส่วนพลาสมา เลทริชไฟบรินเมมเบรนในกลุ่มควบคุมนั้น ไม่ต้องผ่านขั้นตอนการบีบอัดด้วยความร้อน

การเก็บตัวอย่างเพื่อหาปริมาณโกรท

แฟคเตอร์จากการสกัด

ทำการสกัดโกรทแฟคเตอร์จากพลาสมา เลทริชไฟบรินเมมเบรนทั้ง 6 ชั้น ทันทีหลังจากที่เตรียมเมมเบรน (จากอาสาสมัคร 10 คน) โดยนำมาผ่านกระบวนการทำให้เซลล์แตก ทั้งจากวิธีทางกายภาพและทางเคมี เริ่มจากตัดพลาสมา เลทริชไฟบรินเมมเบรนเป็นชิ้นเล็กๆ แล้วนำไปบดรวมกับไลซิสบัฟเฟอร์ 1 มิลลิลิตร (lysis buffer: 50mM Tris-HCl pH7.5, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1% Triton-X) ด้วยเครื่องบดเนื้อเยื่อ (tissue grinder) เป็นเวลา 1 นาที หลังจากนั้นนำมาผ่านขั้นตอนแช่เยือกแข็งแล้วปล่อยให้ละลายอย่างรวดเร็ว ก่อนทำการปั่นตกตะกอน และเลือกเก็บตัวอย่างเฉพาะส่วนของเหลวเหนือตะกอน เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อรอการวัดปริมาณทรานส์ฟอร์มมิงโกรทแฟคเตอร์-เบต้า1 ต่อไป

การเก็บตัวอย่างเพื่อหาปริมาณการปล่อยโกรทแฟคเตอร์

การศึกษาในส่วนนี้ใช้พลาสมา เลทริชไฟบรินเมมเบรนทั้งสิ้น 18 ชั้น (จากการเก็บเลือดครั้งที่ 2 ของอาสาสมัคร 3 คน) โดยนำพลาสมา เลทริชไฟบรินเมมเบรน 6 ชั้น ที่ได้จากอาสาสมัครแต่ละคน ใส่แยกในหลุมของจานเพาะเลี้ยงเซลล์แบบ 6 หลุม (6-well cell culture plate) ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดดีเอ็มอีเอ็ม (DMEM, Dulbecco's modified eagle's medium) 2 มิลลิลิตร แล้วนำไปเก็บในตู้บ่มเพาะเชื้อภายใต้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ที่มีความชื้น และควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส



เมื่อครบกำหนดเวลา จะทำการเก็บตัวอย่างจากอาหารเลี้ยงเซลล์ในหลุมดังกล่าว นำไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส แล้วดูตัวอย่างอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เหลือในหลุมออกทั้งหมด และใส่แทนที่ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่หลุมละ 2 มิลลิลิตร จากนั้นนำกลับไปเก็บในตู้บ่มเพาะเชื้อ จนกระทั่งถึงกำหนดเวลาครั้งต่อไป จึงทำซ้ำตามขั้นตอนเดิม ทั้งนี้ได้กำหนดระยะเวลาที่ใช้ศึกษา 5 ช่วงเวลา ได้แก่ 1 ชั่วโมง 1 วัน 3 วัน 7 วัน และ 14 วัน

การตรวจวัดปริมาณทรานส์ฟอร์มมิ่งโคโรทแพคเตอร์-เบต้า1

นำตัวอย่างที่เก็บรวบรวมได้มาทำการตรวจวัดความเข้มข้นทรานส์ฟอร์มมิ่งโคโรทแพคเตอร์-เบต้า1 ด้วยวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนต์แอสเสย์ (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) ใช้ชุดทดสอบ Human TGF-beta1 DuoSet ELISA (R&D systems, Minneapolis, MN, USA) ทำตามขั้นตอนการใช้งานในคู่มือ วัดค่าความทึบแสง (optical density, OD) ด้วยเครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลท (Microplate reader: Sunrise™, Tecan, Grödig, Austria) แล้วนำค่าความทึบแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ลบด้วยค่าที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร มาคำนวณหาความเข้มข้นในแต่ละตัวอย่าง ก่อนคูณด้วยปริมาตรตัวอย่างทั้งหมด เพื่อให้ได้เป็นปริมาณ ทรานส์ฟอร์มมิ่งโคโรทแพคเตอร์-เบต้า1 ที่สกัดได้จากเพลทเลทริซไฟบรินเมมเบรนแต่ละชั้น และปริมาณที่ปล่อยออกมาในแต่ละช่วงเวลา

การวิเคราะห์ข้อมูล

การเปรียบเทียบปริมาณโคโรทแพคเตอร์ที่ได้จากการสกัด จะใช้ค่าปริมาณโคโรทแพคเตอร์ต่อน้ำหนักเพลทเลทริซไฟบรินเมมเบรน มาคิด

เป็นเปอร์เซ็นต์เทียบกับกลุ่มควบคุม เพื่อตัดปัจจัยความแตกต่างในแต่ละบุคคล แล้วจึงนำค่าเปอร์เซ็นต์ที่ได้ไปวิเคราะห์ทางสถิติหาความแตกต่างจากการบิบบัดด้วยความร้อน โดยใช้ Friedman test จากนั้นทดสอบความแตกต่างแบบจับคู่โดยใช้ Wilcoxon signed ranks test ซึ่งผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติทั้งหมด ได้จากโปรแกรมเอสพีเอสเอส รุ่นที่ 17 (SPSS version 17.0, IBM, Armonk, NY, USA)

ส่วนการศึกษาปริมาณการปล่อยโคโรทแพคเตอร์ในช่วงเวลาต่างๆ จะใช้ปริมาณทรานส์ฟอร์มมิ่งโคโรทแพคเตอร์-เบต้า1 มาหาค่าเฉลี่ย และสร้างกราฟ เพื่อดูแนวโน้มการปล่อยทรานส์ฟอร์มมิ่งโคโรทแพคเตอร์-เบต้า1 ในแต่ละช่วงเวลา เปรียบเทียบให้เห็นความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดลองที่ผ่านความร้อนที่อุณหภูมิต่างๆ และกลุ่มควบคุม

5. ผลการศึกษา

การศึกษาปริมาณโคโรทแพคเตอร์จากการสกัด

จากการตรวจวัดสารสกัดจากเพลทเลทริซไฟบรินเมมเบรน พบทรานส์ฟอร์มมิ่งโคโรทแพคเตอร์-เบต้า1 มีปริมาณสูงสุดในกลุ่มควบคุม และลดปริมาณลงเรื่อยๆ เมื่อใช้อุณหภูมิที่สูงขึ้นในการบิบบัด โดยที่อุณหภูมิ 60 70 และ 80 องศาเซลเซียส มีปริมาณเทียบกับกลุ่มควบคุมลดลงเหลือ 85.5 75.1 และ 64.2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ทั้งยังพบว่าปริมาณทรานส์ฟอร์มมิ่งโคโรทแพคเตอร์-เบต้า1 ลดลงอย่างมาก เมื่อใช้อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส โดยเหลือเพียง 30.3 เปอร์เซ็นต์ และสูญเสียไปเกือบทั้งหมดที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส รายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 1

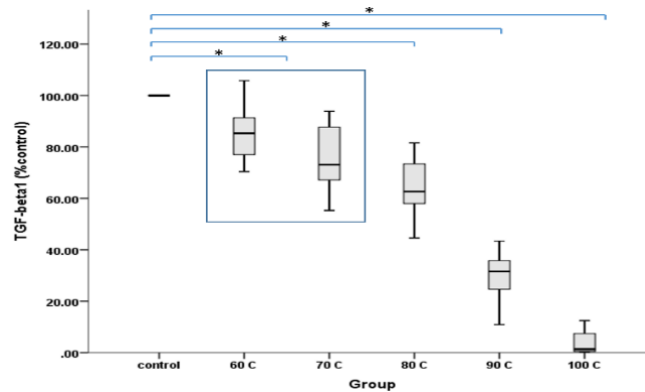


ตารางที่ 1 แสดงปริมาณทรานส์ฟอร์มมิ่งโกรทแฟคเตอร์-เบต้า1 จากการสกัดเพลาทเลทริซไฟบรินเมมเบรน

TGF-beta1	ปริมาณ (ng)	ปริมาณต่อน้ำหนักเพลาทเลทริซไฟบรินเมมเบรน (ng/mg)	เปอร์เซ็นต์เทียบกับกลุ่มควบคุม (%)
control	202.03 ± 77.48	1.89 ± 0.89	100
60°C	167.64 ± 51.68	1.55 ± 0.61	85.5 ± 10.48
70°C	148.46 ± 43.22	1.37 ± 0.50	75.1 ± 12.74
80°C	127.27 ± 44.48	1.21 ± 0.56	64.2 ± 10.86
90°C	63.12 ± 31.60	0.58 ± 0.35	30.3 ± 9.45
100°C	7.60 ± 10.40	0.07 ± 0.10	3.9 ± 4.46

เมื่อนำค่าเปอร์เซ็นต์โกรทแฟคเตอร์เทียบกับกลุ่มควบคุม มาวิเคราะห์ด้วยสถิติ Friedman test พบว่า มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.01$) และจากการวิเคราะห์แบบจับคู่โดยใช้ Wilcoxon signed ranks test พบว่าเมื่อใช้ความร้อนป้อน จะทำให้ปริมาณทรานส์ฟอร์มมิ่งโกรท

แฟคเตอร์-เบต้า1 ลดลงจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.01$) นอกจากนั้นการป้อนด้วยความร้อนอุณหภูมิต่างกัน ปริมาณโกรทแฟคเตอร์ก็แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเช่นกัน ยกเว้นเมื่อเปรียบเทียบ อุณหภูมิ 60 และ 70 องศาเซลเซียส ไม่พบความแตกต่าง ดังรูปที่ 1

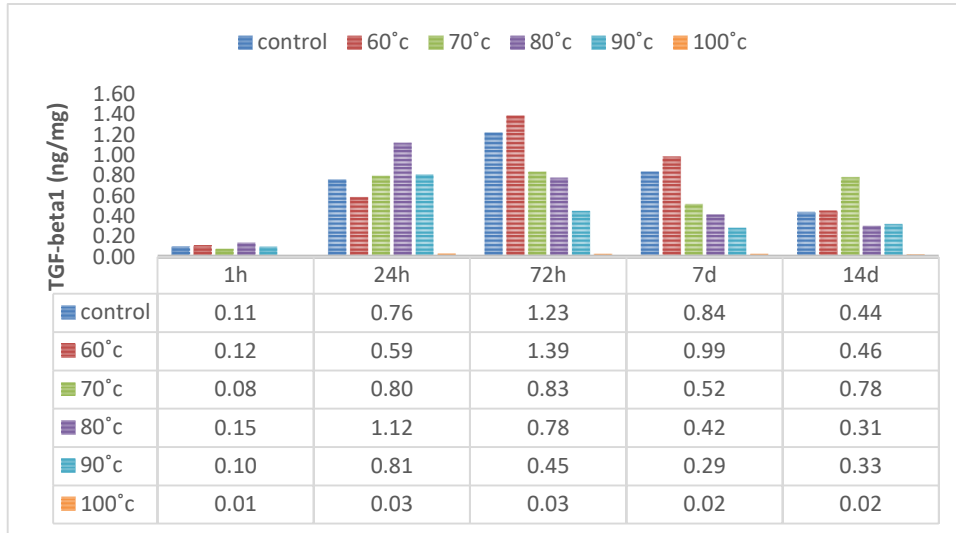


รูปที่ 1 แสดงปริมาณทรานส์ฟอร์มมิ่งโกรทแฟคเตอร์-เบต้า1 (คิดเป็นเปอร์เซ็นต์เทียบกับกลุ่มควบคุม)

การศึกษาปริมาณการปล่อยโกรทแฟคเตอร์

กลุ่มที่ป้อนด้วยอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ตรวจวัดปริมาณทรานส์ฟอร์มมิ่งโกรทแฟคเตอร์-เบต้า1 ได้ในปริมาณที่น้อยมาก แตกต่างจากในกลุ่มอื่น ซึ่งพบว่าการปล่อยทรานส์ฟอร์มมิ่งโกรทแฟคเตอร์-เบต้า1 ออกมาอย่างต่อเนื่องจนสิ้นสุดการทดลองใน 14 วัน โดยมีรูปแบบที่

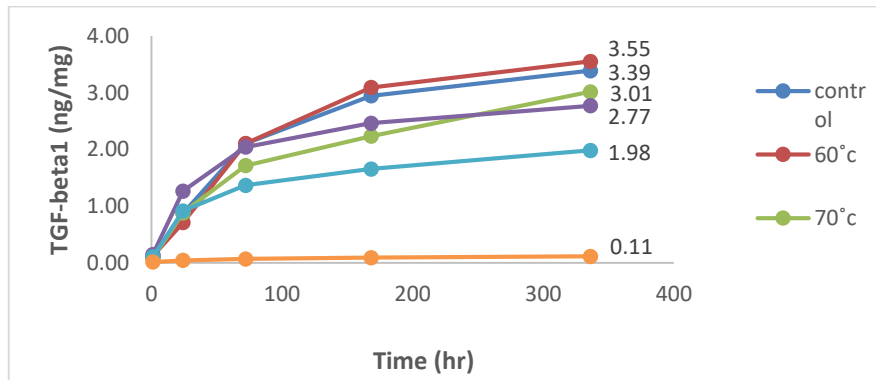
แตกต่างกัน กล่าวคือ ในกลุ่มควบคุม กลุ่มอุณหภูมิ 60 และ 70 องศาเซลเซียส จะค่อยๆ ปล่อยทรานส์ฟอร์มมิ่งโกรทแฟคเตอร์-เบต้า1 เพิ่มขึ้นตามระยะเวลา และตรวจพบปริมาณสูงสุดในช่วงเวลา 3 วัน จากนั้นก็จะเริ่มลดลง ส่วนในกลุ่มอุณหภูมิ 80 และ 90 องศาเซลเซียสนั้น จะพบปริมาณสูงสุดตั้งแต่ 1 วัน และลดปริมาณลงเรื่อยๆ ดังรูปที่ 2



รูปที่ 2 แสดงค่าเฉลี่ยปริมาณทรานส์ฟอร์มมิงโกรทแฟคเตอร์-เบต้า1 ที่ปล่อยออกมาในแต่ละช่วงเวลา

เมื่อพิจารณาปริมาณสะสม จะเห็นได้ว่าการปล่อยทรานส์ฟอร์มมิงโกรทแฟคเตอร์-เบต้า 1 ออกมาจากเพลทเลทริชไฟบริน อย่างรวดเร็วในช่วง 3 วันแรก หลังจากนั้นอัตราการปล่อยโกรทแฟคเตอร์จะลดลงเรื่อยๆ จนเกือบจะมีปริมาณคงที่ในช่วงหลัง ทั้งนี้กลุ่มอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส

และกลุ่มควบคุม มีปริมาณสะสมรวมเมื่อครบ 14 วัน สูงที่สุด ส่วนกลุ่มที่ใช้ความร้อนสูงขึ้น พบว่าปริมาณโกรทแฟคเตอร์สะสมจะลดลง โดยลดลงอย่างชัดเจนในกลุ่ม 90 องศาเซลเซียส และพบปริมาณน้อยมาก ในกลุ่ม 100 องศาเซลเซียส ดังรูปที่ 3



รูปที่ 3 แสดงค่าเฉลี่ยปริมาณสะสมของทรานส์ฟอร์มมิงโกรทแฟคเตอร์-เบต้า1 ในช่วงเวลา 14 วัน

6. การอภิปรายผล

การเปรียบเทียบกับผลการศึกษาก่อนหน้านี้ นั้นทำได้ยาก เนื่องจากในงานวิจัยที่ผ่านมา มีการเตรียมเพลทเลทริชไฟบรินเมมเบรนที่แตกต่างกันออกไป ทั้งในส่วนของปริมาณเลือดที่ใช้ เทคนิคการ

เตรียม และวิธีการคำนวณหาโกรทแฟคเตอร์ อีกทั้งยังไม่มีการศึกษาถึงปริมาณโกรทแฟคเตอร์ในเพลทเลทริชไฟบรินเมมเบรนที่ผ่านการบีบอัดด้วยความร้อนมาก่อน หากพิจารณาในแง่ของแนวโน้มการปล่อยโกรทแฟคเตอร์ จะพบว่าผลการศึกษา



มีความสอดคล้องกับการศึกษาของ El Bagdadi และคณะ ซึ่งพบมีทรานส์ฟอร์มมิ่งโกรทแฟคเตอร์-เบต้า1 ค่อยๆ ปล่อยออกมาออกมาจากเพลทเลทริชไฟบริน ในช่วง 3 วันแรก และเริ่มมีปริมาณคงที่หลังจากนั้น(El Bagdadi, Kubesch et al. 2017)

จากการศึกษาของ Kawase และคณะ พบว่าเพลทเลทริชไฟบรินเมมเบรนที่ผ่านการบีบอัดด้วยความร้อน มีระยะเวลาการสลายตัวมากขึ้น จาก 5-6 วัน เพิ่มขึ้นมากกว่า 10 วัน(Kawase, Kamiya et al. 2015) สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้า ที่พบว่าการบีบอัดด้วยความร้อน 90 และ 100 องศาเซลเซียส ทำให้การสลายตัวช้าลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ แต่จากผลการวิจัยนี้ การบีบอัดที่อุณหภูมิดังกล่าว จะส่งผลให้ปริมาณทรานส์ฟอร์มมิ่งโกรทแฟคเตอร์-เบต้า1 เหลืออยู่เพียงเล็กน้อยเท่านั้น หรือแม้แต่การบีบอัดด้วยความร้อน อุณหภูมิที่ต่ำลงจนถึง 60 องศาเซลเซียส ปริมาณโกรทแฟคเตอร์ก็ยังคงลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งอาจเป็นข้อจำกัดที่นำไปสู่การพัฒนาปรับปรุงเพลทเลทริชไฟบรินเมมเบรน หรือเป็นข้อมูลเพื่อให้เลือกใช้งานในทางคลินิกได้อย่างเหมาะสม

อย่างไรก็ตาม ผลการศึกษานี้เพียงแต่แสดงถึงผลต่อปริมาณ ไม่ได้บ่งบอกถึงการทำงานของโกรทแฟคเตอร์ และเป็นการศึกษาในโกรทแฟคเตอร์เพียงชนิดเดียว ซึ่งอาจได้ผลแตกต่างกันในโกรทแฟคเตอร์ชนิดอื่น จึงควรมีงานวิจัยเพิ่มเติมเพื่อยืนยันผล รวมถึงควรมีการศึกษาในแง่ความสามารถในการกระตุ้นเซลล์ หรือผลในทางคลินิกต่อไป

7. สรุปและข้อเสนอแนะ

การบีบอัดด้วยความร้อน ส่งผลต่อปริมาณทรานส์ฟอร์มมิ่งโกรทแฟคเตอร์-เบต้า1 ที่สกัดได้จาก

เพลทเลทริชไฟบรินเมมเบรนอย่างมีนัยสำคัญ อุณหภูมิในการบีบอัดที่เพิ่มมากขึ้น จะทำให้ ทรานส์ฟอร์มมิ่งโกรทแฟคเตอร์-เบต้า1 ในเมมเบรนมีปริมาณลดน้อยลง โดยลดลงอย่างมากในกลุ่มที่ใช้ อุณหภูมิ 90 และ 100 องศาเซลเซียส

ดังนั้น การนำเพลทเลทริชไฟบรินเมมเบรนที่ผ่านการบีบอัดด้วยความร้อนไปใช้ในทางคลินิก จึงต้องคำนึงถึงคุณสมบัติต่างๆ ที่อาจเปลี่ยนแปลงไปหลังจากผ่านความร้อน หากเลือกใช้ ความร้อน 90-100 องศาเซลเซียส บีบอัดเพลทเลทริชไฟบรินเมมเบรน เพื่อลดอัตราการสลาย จะทำให้สูญเสียโกรทแฟคเตอร์ที่อยู่ภายใน ซึ่งหมายถึงคุณสมบัติที่ดีในการกระตุ้นกระบวนการหายของแผลทั้งนี้อาจทดแทนด้วยการเติมสารอื่น หรือใช้ร่วมกันทั้งเพลทเลทริชไฟบรินที่ผ่านและไม่ผ่าน ความร้อน

8. เอกสารอ้างอิง

1. Dahlin, C., A. Linde, J. Gottlow and S. Nyman (1988). "Healing of bone defects by guided tissue regeneration." *Plast Reconstr Surg* 81(5): 672-676.
2. Dohan, D. M., J. Choukroun, A. Diss, S. L. Dohan, A. J. Dohan, J. Mouhyi and B. Gogly (2006). "Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part I: technological concepts and evolution." *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 101(3): e37-44.



3. Dohan, D. M., J. Choukroun, A. Diss, S. L. Dohan, A. J. Dohan, J. Mouhyi and B. Gogly (2006). **"Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part II: platelet-related biologic features."** Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 101(3): e45-50.
4. El Bagdadi, K., A. Kubesch, X. Yu, S. Al-Maawi, A. Orłowska, A. Dias, P. Booms, E. Dohle, R. Sader, C. J. Kirkpatrick, J. Choukroun and S. Ghanaati. (2017). **"Reduction of relative centrifugal forces increases growth factor release within solid platelet-rich-fibrin (PRF)-based matrices: a proof of concept of LSCC (low speed centrifugation concept)."** Eur J Trauma Emerg Surg.
5. Eppley, B. L., J. E. Woodell and J. Higgins (2004). **"Platelet Quantification and Growth Factor Analysis from Platelet-Rich Plasma: Implications for Wound Healing."** Plastic and Reconstructive Surgery: 1502-1508.
6. Kawase, T., M. Kamiya, M. Kobayashi, T. Tanaka, K. Okuda, L. F. Wolff and H. Yoshie (2015). **"The heat-compression technique for the conversion of platelet-rich fibrin preparation to a barrier membrane with a reduced rate of biodegradation."** J Biomed Mater Res B Appl Biomater 103(4): 825-831.
7. Khiste, S. V. and R. Naik Tari (2013). **"Platelet-Rich Fibrin as a Biofuel for Tissue Regeneration."** ISRN Biomaterials 2013: 1-6.
8. Rakhmatia, Y. D., Y. Ayukawa, A. Furuhashi and K. Koyano (2013). **"Current barrier membranes: titanium mesh and other membranes for guided bone regeneration in dental applications."** J Prosthodont Res 57(1): 3-14.
9. Sam, G., R. J. Vadakkekuttical and N. V. Amol (2015). **"In vitro evaluation of mechanical properties of platelet-rich fibrin membrane and scanning electron microscopic examination of its surface characteristics."** J Indian Soc Periodontol 19(1): 32-36.
10. Zhang, Y., X. Zhang, B. Shi and R. Miron (2013). **"Membranes for guided tissue and bone regeneration."** Annals of Oral & Maxillofacial Surgery 1(1): 1-10.