HE008

การศึกษาปริมาณทรานส์ฟอร์มมิ่งโกรทแฟคเตอร์-เบต้า1 ในเพลทเลทริชไฟบรินเมมเบรนที่ผ่านการบีบอัดด้วยความร้อน

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

กมลชนก นฤมล[1]
คธาวุธ เตชะสุทธิรัฐ[2]

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 หลังจากนั้นเก็บเลือดซ้ำจากอาสาสมัคร 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

---

[1]นักศึกษาปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาศัลยศาสตร์ช่องปากและแม็กซิลโลเฟเชียล
คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
[2]ภาควิชาศัลยศาสตร์ช่องปากและแม็กซิลโลเฟเชียล 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-beta1level 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

ปัญหาการสูญเสียกระดูกเบ้าฟันเกิดได้จากหลายสาเหตุ การชักนำให้กระดูกคืนสภาพ (guided bone regeneration, GBR) เป็นวิธีการที่ช่วยส่งเสริมให้เกิดการสร้างกระดูกใหม่ โดยใช้เมมเบรนกั้น (barrier membrane) แบ่งกั้นส่วนของเนื้อเยื่ออ่อนจากบริเวณรับกระดูกปลูก ให้เกิดเป็นที่อยู่ของเซลล์สร้างกระดูก และป้องกันการเจริญของเซลล์เนื้อเยื่ออ่อนเข้ามา (Dahlin, Linde et al. 1988) ซึ่งเมมเบรนชนิดสลายตัวได้เองนั้นเป็นที่นิยมและมีการพัฒนาอย่างต่อเนื่อง (Zhang, Zhang et al. 2013) แต่ก็ยังมีข้อด้อยที่สำคัญ คือ มีราคาสูง และระยะเวลาการสลายตัวเร็ว หรือคาดการณ์ได้ยาก

เพลทเลทริชไฟบริน (Platelet-rich fibrin, PRF) เป็นชีววัสดุที่ได้มาจากการนำเลือดของผู้ป่วย

ปั่นเหวี่ยงในหลอดแก้วโดยไม่ต้องใส่สารเพิ่มเติม ประกอบด้วยเกล็ดเลือด เม็ดเลือดขาวอยู่ในร่างแห ไฟบรินที่มีความหนาแน่นสูง มีการปล่อยโกรทแฟคเตอร์ออกมาอย่างช้าๆ ตามการสลายตัวของไฟบริน (Dohan, Choukroun et al. 2006) เมื่อกดรีดของเหลวออกจากเพลทเลทริชไฟบริน จะได้เป็นเมมเบรนที่มีความต้านทานสูงขึ้น ใช้งานได้ง่าย ราคาไม่แพง ทำให้เกิดแนวคิดในการนำมาใช้เป็นเมมเบรนกั้น (Zhang, Zhang et al. 2013)

อย่างไรก็ดี เมื่อเปรียบเทียบกับคอลลาเจนเมมเบรนในท้องตลาด เพลทเลทริชไฟบรินเมม-เบรน ยังขาดคุณสมบัติเชิงกลที่ดี มีความแข็งแรงไม่เพียงพอ และสลายตัวเร็ว (Sam, Vadakkekuttical et al. 2015) จึงได้มีการศึกษาปรับปรุงโครงสร้าง เพื่อลดอัตราการสลายตัว ด้วยการบีบอัดด้วยความร้อน (Kawase, Kamiya et al. 2015) แต่ในปัจจุบันยังไม่มีหลักฐานงานวิจัยมากเพียงพอ ที่จะสนับสนุนการใช้งานในทางคลินิก อีกทั้งยังขาดการศึกษาถึงผลของความร้อนต่อคุณสมบัติอื่นๆ เช่น ความแข็งแรง คุณสมบัติในการกระตุ้นเซลล์ การเร่งการหายของแผล และปริมาณโกรทแฟคเตอร์

ผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาผลของการบีบอัดเพลทเลทริชไฟบรินด้วยความร้อน ต่อปริมาณทรานส์ฟอร์มมิ่งโกรทแฟคเตอร์-เบต้า1 ซึ่งเป็นโกรทแฟคเตอร์ที่พบในปริมาณมาก มีความสำคัญในกระบวนการหายของแผล และมีคุณสมบัติในการกระตุ้นเซลล์สร้างกระดูก (Eppley, Woodell et al. 2004, Khiste and Naik Tari 2013) โดยผลที่ได้จากการศึกษานี้ จะเป็นข้อมูลพื้นฐานในการพิจารณาเลือกใช้เพลทเลทริชไฟบรินที่ผ่านการบีบอัดด้วยความร้อนในงานทางทันตกรรม และนำไปสู่การพัฒนาคุณสมบัติของเพลทเลทริชไฟบรินเมมเบรนต่อไป

2. วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาเปรียบเทียบปริมาณทรานส์ฟอร์มมิ่งโกรทแฟคเตอร์-เบต้า1 ในเพลทเลทริชไฟบรินเมมเบรนที่ผ่านการบีบอัดด้วยความร้อนที่อุณหภูมิต่างๆ และเพลทเลทริชไฟบรินเมมเบรนที่เตรียมด้วยวิธีบีบอัดด้วยผ้าก๊อซ

3. แนวคิดทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เมมเบรนกั้นมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่งในการชักนำให้กระดูกคืนสภาพ เนื่องจากทำหน้าที่ป้องกันบริเวณรับกระดูกปลูกจากการเจริญแทรกของเซลล์เนื้อเยื่ออ่อน จนกระทั่งเกิดการสร้างกระดูกโดยสมบูรณ์ อีกทั้งยังทำให้กระดูกปลูกมีเสถียรภาพที่ดี แต่เนื่องด้วยเมมเบรนกั้นที่ขายในท้องตลาดมีราคาแพง เป็นข้อจำกัดทำให้ผู้ป่วยจำนวนหนึ่งไม่ได้รับการรักษาที่เหมาะสม ดังนั้นหากสามารถลดค่าใช้จ่ายในส่วนนี้ลง โดยใช้วัสดุที่มีราคาถูก ดังเช่นเพลทเลทริชไฟบรินเมมเบรน ที่เตรียมได้จากเลือดของผู้ป่วยเอง ก็อาจช่วยแก้ปัญหา ทำให้ผู้ป่วยมีโอกาสเข้าถึงการรักษาได้มากขึ้น

เพลทเลทริชไฟบรินถูกคิดค้นและนำเสนอโดย 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 ชั้นของพลาสมาไร้เซลล์ และชั้นกลางเป็นก้อนเจล เรียกว่า เพลทเลทริชไฟบริน ซึ่งสามารถนำมากดรีดของเหลวออก ได้แผ่นเมมเบรนที่มีความต้านทานมากขึ้น (Dohan, Choukroun et al. 2006) ประกอบด้วยโครงร่างไฟบริน (fibrin matrix) ที่มีเกล็ดเลือดและเม็ดเลือดขาวอยู่เป็นจำนวนมาก เป็นแหล่งของโกรทแฟคเตอร์ ได้แก่ เพลทเลตดีไรฟ์โกรทแฟคเตอร์ (platelet-derived growth factor, PDGF) ทรานสฟอร์มมิ่งโกรทแฟคเตอร์เบต้า และโกรทแฟคเตอร์อื่น ซึ่งล้วนมีส่วนเกี่ยวข้องกับกระบวนการเพิ่มจำนวนและเปลี่ยนสภาพเซลล์ การสร้างหลอดเลือดใหม่ ทำให้มีคุณสมบัติในการส่งเสริมการหายของแผล (Dohan, Choukroun et al. 2006)

เมมเบรนกั้น แบ่งออกได้เป็น 2 ประเภทใหญ่ คือ เมมเบรนชนิดไม่สลายตัว และเมมเบรนชนิดสลายตัวได้เอง ซึ่งควรมีคุณสมบัติ ได้แก่ ประสานรวมกับเนื้อเยื่อข้างเคียงได้ดี สามารถกั้นแยกเซลล์ ป้องกันการแทรกของเซลล์เนื้อเยื่ออ่อน ใช้งานทางคลินิกได้ง่าย มีความแข็งแรงเพียงพอที่จะสร้างและคงสภาพช่องว่าง ตลอดช่วงการสร้างกระดูกใหม่ และมีความเข้ากันได้ทางชีวภาพ (Rakhmatia, Ayukawa et al. 2013)

ทั้งนี้ เพลทเลทริชไฟบรินเมมเบรน ยังขาดคุณสมบัติที่เหมาะสมที่จะใช้เป็นเมมเบรนกั้น เนื่องจากไม่แข็งแรงพอ สลายตัวได้เร็ว จึงมีความพยายามคิดค้นการดัดแปรการเชื่อมโยงข้าม (crosslink) ระหว่างร่างแหไฟบรินด้วยวิธีต่างๆ เพื่อเพิ่มเสถียรภาพและความหนาแน่นแก่โครงสร้างเส้นใยพอลีเมอร์ ส่งผลลดอัตราการสลายตัวเมมเบรนลงได้ หนึ่งในวิธีนั้นคือการใช้ความร้อน ซึ่งไม่มีสารที่เป็นพิษต่อเซลล์เหมือนวิธีอื่นๆ (Kawase, Kamiya et al. 2015) อย่างไรก็ตาม การศึกษาผลของการเตรียมเพลทเลทริชไฟบรินเมมเบรนด้วยความร้อนยังคงมีไม่มากนัก การศึกษาเพิ่มเติมถึงคุณสมบัติต่างๆ ภายหลังการบีบอัดด้วยความร้อน จึงมีความจำเป็นที่จะใช้เป็นข้อมูลในการพิจารณาก่อนนำไปใช้งานในทางคลินิก

4. วิธีดำเนินการ

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

การเตรียมเพลทเลทริชเมมเบรน

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

ทำการเจาะเก็บเลือดจากอาสาสมัครแต่ละคน 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 ทำการเก็บเฉพาะเพลทเลทริชไฟบริน โดยตัดส่วนของเม็ดเลือดแดงที่ติดมาด้วยกรรไกร จากนั้นบีบอัดเอาของเหลวออกให้มีลักษณะเป็นแผ่นเมมเบรน โดยวางเพลทเลทริชไฟบรินไว้ระหว่างผ้าก๊อซบนและล่างที่ถูกกั้นด้วยเบ้าอะคริลิกหนา 1 มิลลิเมตร กดทับด้วยแผ่นกระจกหนัก 300 กรัม เป็นเวลา 1 นาที จะได้เพลทเลทริชไฟบรินเมมเบรน 6 ชิ้น แบ่งเป็นกลุ่มทดลอง 5 ชิ้น และกลุ่มควบคุม 1 ชิ้น

ชั่งน้ำหนักเพลทเลทริชไฟบรินเมมเบรนแต่ละชิ้น ก่อนห่อด้วยแผ่นพลาสติกโพลีเอทิลีน (Polyethylene) กลุ่มทดลองนำไปผ่านความร้อนโดยบีบอัดด้วยเครื่องรีดผม (Lersacha, Bangkok, Thailand) ที่ปล่อยให้เย็นลงถึงอุณหภูมิที่กำหนด คือ 100, 90, 80, 70 และ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วินาที ทั้งนี้ได้ควบคุมระยะห่างระหว่างแผ่นความร้อนของเครื่องรีดผมไว้ที่ 1 มิลลิเมตร และตรวจวัดอุณหภูมิที่พื้นผิวแผ่นทำความร้อนด้วยเครื่องวัดอุณหภูมิอินฟราเรด (FT3700-20: Hioki, Nagano, Japan) ก่อนการบีบอัดทุกครั้ง ส่วนเพลทเลทริชไฟบรินเมมเบรนในกลุ่มควบคุมนั้น ไม่ต้องผ่านขั้นตอนการบีบอัดด้วยความร้อน

การเก็บตัวอย่างเพื่อหาปริมาณโกรทแฟคเตอร์จากการสกัด

ทำการสกัดโกรทแฟคเตอร์จากเพลทเลทริชไฟบรินเมมเบรนทั้ง 60 ชิ้น ทันทีหลังจากที่เตรียมเมมเบรน (จากอาสาสมัคร 10 คน) โดยนำมาผ่านกระบวนการทำให้เซลล์แตก ทั้งจากวิธีทางกายภาพและทางเคมี เริ่มจากตัดเพลท 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 เพื่อรอการวัดปริมาณทรานส์ฟอร์มมิ่งโกรทแฟคเตอร์-เบต้า1 ต่อไป

การเก็บตัวอย่างเพื่อหาปริมาณการปล่อยโกรทแฟคเตอร์

การศึกษาในส่วนนี้ใช้เพลทเลทริชไฟบรินเมมเบรนทั้งสิ้น 18 ชิ้น (จากการเก็บเลือดครั้งที่ 2 ของอาสาสมัคร 3 คน) โดยนำเพลทเลทริชไฟบรินเมมเบรน 6 ชิ้น ที่ได้จากอาสาสมัครแต่ละคนใส่แยกในหลุมของจานเพาะเลี้ยงเซลล์แบบ 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 แล้วดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เหลือในหลุมออกทั้งหมด และใส่แทนที่ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่หลุมละ 2 มิลลิลิตร จากนั้นนำกลับไปเก็บในตู้บ่มเพาะเชื้อ จนกระทั่งถึงกำหนดเวลาครั้งต่อไป จึงทำซ้ำตามขั้นตอนเดิม ทั้งนี้ได้กำหนดระยะเวลาที่ใช้ศึกษา 5 ช่วงเวลา ได้แก่ 1 ชั่วโมง 1 วัน 3 วัน 7 วัน และ 14 วัน

การตรวจวัดปริมาณทรานส์ฟอร์มมิ่งโกรทแฟคเตอร์-เบต้า1

นำตัวอย่างที่เก็บรวบรวมได้มาทำการตรวจวัดความเข้มข้นทรานส์ฟอร์มมิ่งโกรทแฟคเตอร์-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 ทรานส์ฟอร์มมิ่งโกรทแฟคเตอร์-เบต้า1 ที่สกัดได้จากเพลทเลทริชไฟบรินเมมเบรนแต่ละชิ้น และปริมาณที่ปล่อยออกมาในแต่ละช่วงเวลา

การวิเคราะห์ข้อมูล

การเปรียบเทียบปริมาณโกรทแฟคเตอร์ที่ได้จากการสกัด จะใช้ค่าปริมาณโกรทแฟคเตอร์ต่อน้ำหนักเพลทเลทริชไฟบรินเมมเบรน มาคิดเป็นเปอร์เซ็นต์เทียบกับกลุ่มควบคุม เพื่อตัดปัจจัยความแตกต่างในแต่ละบุคคล แล้วจึงนำค่าเปอร์เซ็นต์ที่ได้ไปวิเคราะห์ทางสถิติหาความแตกต่างจากการบีบอัดด้วยความร้อน โดยใช้ Friedman test จากนั้นทดสอบความแตกต่างแบบจับคู่โดยใช้ Wilcoxon signed ranks test ซึ่งผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติทั้งหมด ได้จากโปรแกรมเอสพีเอสเอส รุ่นที่ 17 (SPSS version 17.0, IBM, Armonk, NY, USA)

ส่วนการศึกษาปริมาณการปล่อยโกรทแฟคเตอร์ในช่วงเวลาต่างๆ จะใช้ปริมาณทรานส์ฟอร์มมิ่งโกรทแฟคเตอร์-เบต้า1 มาหาค่าเฉลี่ย และสร้างกราฟ เพื่อดูแนวโน้มการปล่อยทรานส์ฟอร์มมิ่งโกรทแฟคเตอร์-เบต้า1 ในแต่ละช่วงเวลา เปรียบเทียบให้เห็นความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดลองที่ผ่านความร้อนที่อุณหภูมิต่างๆ และกลุ่มควบคุม

5. ผลการศึกษา

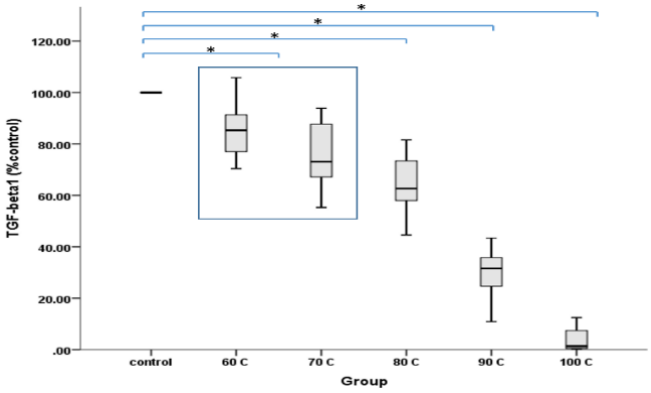
การศึกษาปริมาณโกรทแฟคเตอร์จากการสกัด

จากการตรวจวัดสารสกัดจากเพลทเลทริชไฟบรินเมมเบรน พบทรานส์ฟอร์มมิ่งโกรทแฟคเตอร์-เบต้า1 มีปริมาณสูงสุดในกลุ่มควบคุม และลดปริมาณลงเรื่อยๆ เมื่อใช้อุณหภูมิที่สูงขึ้นในการบีบอัด โดยที่อุณหภูมิ 60 70 และ 80 องศาเซลเซียส มีปริมาณเทียบกับกลุ่มควบคุมลดลงเหลือ 85.5 75.1 และ 64.2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ทั้งยังพบว่าปริมาณทรานส์ฟอร์มมิ่งโกรทแฟคเตอร์-เบต้า 1 ลดลงอย่างมาก เมื่อใช้อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส โดยเหลือเพียง 30.3 เปอร์เซนต์ และสูญเสียไปเกือบทั้งหมดที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส รายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงปริมาณทรานส์ฟอร์มมิ่งโกรทแฟคเตอร์-เบต้า1 จากการสกัดเพลทเลทริชไฟบรินเมมเบรน

TGF-beta1	ปริมาณ (ng)	ปริมาณต่อน้ำหนักเพลทเลทริชไฟบรินเมมเบรน (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

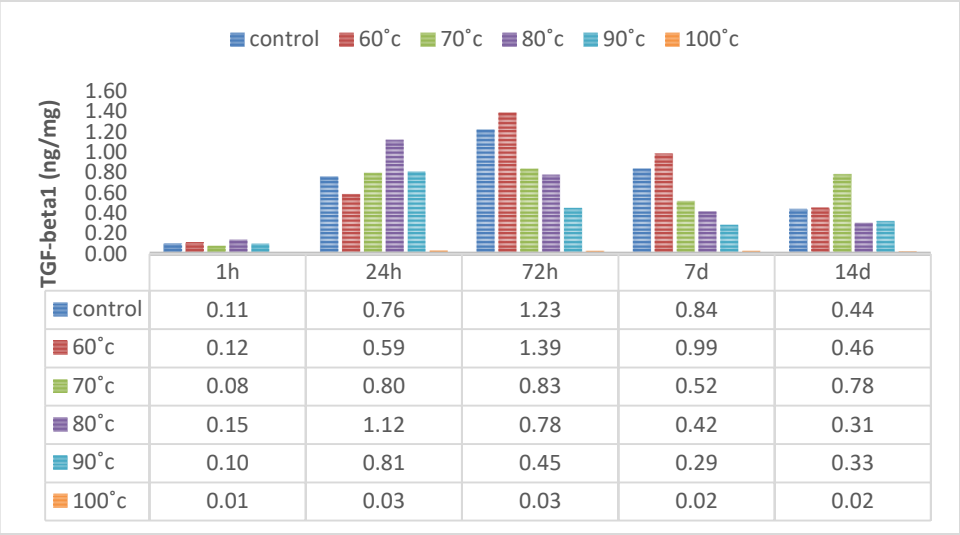
เมื่อนำค่าเปอร์เซ็นต์โกรทแฟคเตอร์เทียบกับกลุ่มควบคุม มาวิเคราะห์ด้วยสถิติ Friedman test พบว่า มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.01$) และจากการวิเคราะห์แบบจับคู่โดยใช้ Wilcoxon signed ranks test พบว่าเมื่อใช้ความร้อนบีบอัด จะทำให้ปริมาณทรานส์ฟอร์มมิ่งโกรทแฟคเตอร์-เบต้า1 ลดลงจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.01$) นอกจากนั้นการบีบอัดด้วยความร้อนอุณหภูมิต่างกัน ปริมาณโกรทแฟคเตอร์ก็แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเช่นกัน ยกเว้นเมื่อเปรียบเทียบ อุณหภูมิ 60 และ 70 องศาเซลเซียส ไม่พบความแตกต่าง ดังรูปที่ 1



รูปที่ 1 แสดงปริมาณทรานส์ฟอร์มมิ่งโกรทแฟคเตอร์-เบต้า1 (คิดเป็นเปอร์เซ็นต์เทียบกับกลุ่มควบคุม)

การศึกษาปริมาณการปล่อยโกรทแฟคเตอร์

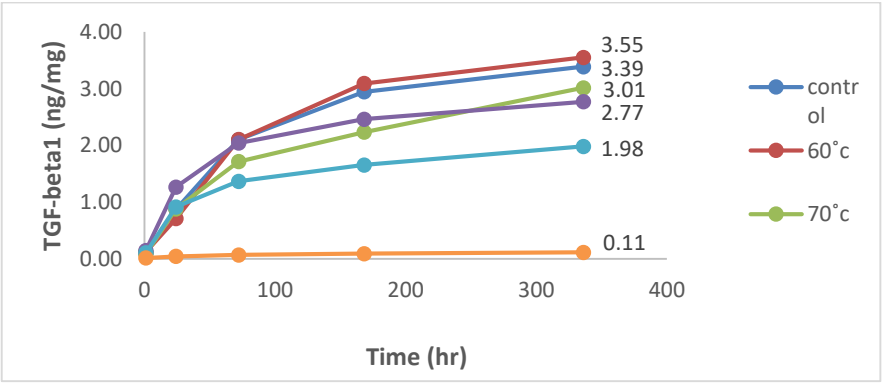
กลุ่มที่บีบอัดด้วยอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ตรวจวัดปริมาณทรานส์ฟอร์มมิ่งโกรทแฟคเตอร์-เบต้า1 ได้ในปริมาณที่น้อยมาก แตกต่างจากในกลุ่มอื่น ซึ่งพบว่ามีการปล่อยทรานส์ฟอร์มมิ่งโกรทแฟคเตอร์-เบต้า1 ออกมาอย่างต่อเนื่องจนสิ้นสุดการทดลองใน 14 วัน โดยมีรูปแบบที่แตกต่างกัน กล่าวคือ ในกลุ่มควบคุม กลุ่มอุณหภูมิ 60 และ 70 องศาเซลเซียส จะค่อยๆ ปล่อยทรานส์ฟอร์มมิ่งโกรทแฟคเตอร์-เบต้า1 เพิ่มขึ้นตามระยะเวลา และตรวจพบปริมาณสูงสุดในช่วงเวลา 3 วัน จากนั้นก็จะเริ่มลดลง ส่วนในกลุ่มอุณหภูมิ 80 และ 90 องศาเซลเซียสนั้น จะพบปริมาณสูงสุดตั้งแต่ 1 วัน และลดปริมาณลงเรื่อยๆ ดังรูปที่ 2



	1h	24h	72h	7d	14d
control	0.11	0.76	1.23	0.84	0.44
60˚c	0.12	0.59	1.39	0.99	0.46
70˚c	0.08	0.80	0.83	0.52	0.78
80˚c	0.15	1.12	0.78	0.42	0.31
90˚c	0.10	0.81	0.45	0.29	0.33
100˚c	0.01	0.03	0.03	0.02	0.02

รูปที่ 2 แสดงค่าเฉลี่ยปริมาณทรานส์ฟอร์มมิ่งโกรทแฟคเตอร์-เบต้า1 ที่ปล่อยออกมาในแต่ละช่วงเวลา

เมื่อพิจารณาปริมาณสะสม จะเห็นได้ว่ามีการปล่อยทรานส์ฟอร์มมิ่งโกรทแฟคเตอร์-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 แสดงค่าเฉลี่ยปริมาณสะสมของทรานส์ฟอร์มมิ่งโกรทแฟคเตอร์-เบต้า1 ในช่วงเวลา 14 วัน

6. การอภิปรายผล

การเปรียบเทียบกับผลการศึกษาก่อนหน้านั้นทำได้ยาก เนื่องจากในงานวิจัยที่ผ่านมา มีการเตรียมเพลทเลทริชไฟบรินเมมเบรนที่แตกต่างกันออกไป ทั้งในส่วนของปริมาณเลือดที่ใช้ เทคนิคการเตรียม และวิธีการคำนวณหาโกรทแฟคเตอร์ อีกทั้งยังไม่มีการศึกษาถึงปริมาณโกรทแฟคเตอร์ในเพลทเลทริชไฟบรินเมมเบรนที่ผ่านการบีบอัดด้วยความร้อนมาก่อน หากพิจารณาในแง่ของแนวโน้มการปล่อยโกรทแฟคเตอร์ จะพบว่าผลการศึกษานี้

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 เพิ่มเป็นมากกว่า 10 วัน(Kawase, Kamiya et al. 2015) สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้า ที่พบว่าการบีบอัดด้วยความร้อน 90 และ 100 องศาเซลเซียส ทำให้การสลายตัวช้าลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ แต่จากผลการวิจัยนี้ การบีบอัดที่อุณหภูมิดังกล่าว จะส่งผลให้ปริมาณทรานส์ฟอร์มมิ่งโกรทแฟคเตอร์-เบต้า1 เหลืออยู่เพียงเล็กน้อยเท่านั้น หรือแม้แต่การบีบอัดด้วยความร้อนอุณหภูมิที่ต่ำลงจนถึง 60 องศาเซลเซียส ปริมาณโกรทแฟคเตอร์ก็ยังลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งอาจเป็นข้อจำกัดที่นำไปสู่การพัฒนาปรับปรุงเพลทเลทริชไฟบรินเมมเบรน หรือเป็นข้อมูลเพื่อให้เลือกใช้งานในทางคลินิกได้อย่างเหมาะสม

อย่างไรก็ตาม ผลการศึกษานี้เพียงแต่แสดงถึงผลต่อปริมาณ ไม่ได้บ่งบอกถึงการทำงานของโกรทแฟคเตอร์ และเป็นการศึกษาในโกรทแฟคเตอร์เพียงชนิดเดียว ซึ่งอาจได้ผลแตกต่างกันในโกรทแฟคเตอร์ชนิดอื่น จึงควรมีงานวิจัยเพิ่มเติมเพื่อยืนยันผล รวมถึงควรมีการศึกษาในแง่ความสามารถในการกระตุ้นเซลล์ หรือผลในทางคลินิกต่อไป

7. สรุปและข้อเสนอแนะ

การบีบอัดด้วยความร้อน ส่งผลต่อปริมาณทรานส์ฟอร์มมิ่งโกรทแฟคเตอร์-เบต้า1 ที่สกัดได้จากเพลทเลทริชไฟบรินเมมเบรนอย่างมีนัยสำคัญ อุณหภูมิในการบีบอัดที่เพิ่มมากขึ้น จะทำให้ ทรานส์ฟอร์มมิ่งโกรทแฟคเตอร์-เบต้า1 ในเมมเบรนมีปริมาณลดน้อยลง โดยลดลงอย่างมากในกลุ่มที่ใช้อุณหภูมิ 90 และ 100 องศาเซลเซียส

ดังนั้น การนำเพลทเลทริชไฟบรินเมมเบรนที่ผ่านการบีบอัดด้วยความร้อนไปใช้ในทางคลินิก จึงต้องคำนึงถึงคุณสมบัติต่างๆ ที่อาจเปลี่ยนแปลงไปหลังจากผ่านความร้อน หากเลือกใช้ความร้อน 90-100 องศาเซลเซียส บีบอัดเพลทเลทเลทริชไฟบรินเมมเบรน เพื่อลดอัตราการสลาย จะทำให้สูญเสียโกรทแฟคเตอร์ที่อยู่ภายใน ซึ่งหมายถึงคุณสมบัติที่ดีในการกระตุ้นกระบวนการหายของแผลทั้งนี้อาจทดแทนด้วยการเติมสารอื่น หรือใช้ร่วมกันทั้งเพลทเลทริชไฟบรินที่ผ่านและไม่ผ่านความร้อน

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. Orlowska, 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.