



การทดสอบความเข้ากันได้ของวัสดุห้ามเลือดจากอนุพันธ์ไคโตซาน
ต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์เนื้อเยื่อเหงือก

BIOCOMPATIBILITY OF A CHITOSAN-DERIVED HEMOSTATIC AGENT
WITH HUMAN GINGIVAL FIBROBLASTS

ธนวัฒน์ มหัตถจริยพงษ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

2563

การทดสอบความเข้ากันได้ของวัสดุห้ามเลือดจากอนุพันธ์โคโตซาน
ต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์เนื้อเยื่อเหงือก



ธนวัฒน์ มหัทธชัยพงษ์

ปริญญานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาการช่องปากและแม็กซิลโลเฟเชียล
คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ปีการศึกษา 2563
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

BIOCOMPATIBILITY OF A CHITOSAN-DERIVED HEMOSTATIC AGENT
WITH HUMAN GINGIVAL FIBROBLASTS



TANAWAT MAHATCHARIYAPONG

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of MASTER OF SCIENCE
(Oral and Maxillofacial Sciences)

Faculty of Dentistry, Srinakharinwirot University

2020

Copyright of Srinakharinwirot University

ปริญญานิพนธ์
เรื่อง
การทดสอบความเข้ากันได้ของวัสดุห้ามเลือดจากอนุพันธ์โคโคซาน
ต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์เนื้อเยื่อเหงือก
ของ
ธณวัฒน์ มหัสจรรย์พงษ์

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาการช่องปากและแม็กซิลโลเฟเชียล
ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ฉัตรชัย เอกปัญญาสกุล)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์

..... ที่ปรึกษาหลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มานิสา ศรีชลเพชร)

..... ประธาน
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ขจรเกียรติ เจนบดินทร์)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรุณวรรณ หล้าอุบล)

ชื่อเรื่อง	การทดสอบความเข้ากันได้ของวัสดุห้ามเลือดจากอนุพันธ์ไคโตซาน ต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์เนื้อเยื่อเหงือก
ผู้วิจัย	ธนวัฒน์ มหัทธชัยพงษ์
ปริญญา	วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต
ปีการศึกษา	2563
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. มานีสา ศรีชลเพ็ชร

ภาวะเลือดออกมากขณะหรือหลังการผ่าตัดในช่องปากมีความอันตรายและอาจส่งผลถึงชีวิตผู้ป่วย การตระหนักถึงปัญหาและให้การรักษาย่างทันทั่วทั้งที่สามารถช่วยให้ผู้ป่วยพ้นจากอันตราย ปัจจุบันมีการพัฒนาวัสดุห้ามเลือดชนิดใหม่ออกมามากมาย เพื่อให้มีคุณสมบัติตามต้องการ คือ มีความปลอดภัยในการใช้งาน เข้ากันได้กับเนื้อเยื่อ ไม่มีความเป็นพิษ ไม่ก่อให้เกิดปฏิกิริยาต่อต้านสิ่งแปลกปลอม สามารถสลายตัวได้ ใช้งานได้ง่าย ราคาไม่แพงและที่สำคัญสามารถห้ามเลือดได้อย่างมีประสิทธิภาพ สารห้ามเลือดจากไคโตซานเป็นสารที่เตรียมจากไคตินที่ดึงหมู่อะเซทิลออก มีประสิทธิภาพการห้ามเลือดที่ดีทั้งในผู้ป่วยที่มีร่างกายแข็งแรงและมีความผิดปกติในการแข็งตัวของเลือด Calcium alginate/*N*-O-carboxymethylchitosan (CA/NOCC) เป็นสารห้ามเลือดจากอนุพันธ์ไคโตซาน ได้ผ่านการทดสอบต่าง ๆ ที่บ่งบอกถึงประสิทธิภาพการห้ามเลือดและความปลอดภัยในการใช้งาน ทั้งในระดับห้องปฏิบัติการ สัตว์ทดลอง และการทดสอบที่ผิวหนังมนุษย์ และเพื่อพัฒนาวัสดุห้ามเลือดดังกล่าวให้สามารถใช้งานได้ในช่องปาก การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ในช่องปากจึงเป็นสิ่งจำเป็น วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้ คือ เพื่อทดสอบความเป็นพิษของวัสดุ CA/NOCC ต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์เนื้อเยื่อเหงือก วิธีการดำเนินงานวิจัย คือ ทำการเลี้ยงเซลล์เพียงอย่างเดียวและร่วมกับวัสดุ CA/NOCC ทั้ง 2 สภาวะ คือ เลี้ยงเซลล์กับวัสดุโดยตรงและร่วมกับสารสกัดจากวัสดุ ศึกษาสัญญาณวิทยาของเซลล์ผ่านกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ศึกษาความมีชีวิตและอัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์ด้วยวิธีการทดสอบเอ็มทีที ศึกษาการตายของเซลล์ผ่านการย้อมสีทริปแลนบลู และศึกษาระดับแคลเซียมไอออนในอาหารเลี้ยงเซลล์ ผลการศึกษา พบว่า เซลล์ที่เลี้ยงร่วมกับวัสดุ CA/NOCC มีความหนาแน่นน้อยลง เซลล์มีลักษณะหดกลม ผิวเซลล์ไม่เรียบและบวมเป็นตุ่มออกมา อัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม พบจำนวนเซลล์ตายโดยเฉลี่ยสูงกว่ากลุ่มควบคุม และระดับแคลเซียมไอออนในอาหารเลี้ยงมีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุม สรุปผลได้ว่า วัสดุ CA/NOCC มีความเป็นพิษต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์เนื้อเยื่อเหงือก โดยส่งผลให้สัญญาณวิทยาของเซลล์เปลี่ยนแปลงจากปกติ ความมีชีวิตและความสามารถในการเพิ่มจำนวนเซลล์ลดลง มีการตายของเซลล์เพิ่มมากขึ้น ทั้งนี้ทางคณะผู้วิจัยได้ตั้งสมมุติฐานว่าระดับแคลเซียมไอออนที่ปลดปล่อยจากวัสดุ อาจส่งผลให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ ดังนั้น การปรับปรุงสัดส่วนของวัสดุ เพื่อลดระดับการปลดปล่อยแคลเซียมไอออน อาจทำให้วัสดุมีความเข้ากันได้กับเนื้อเยื่อในช่องปาก

คำสำคัญ : คาร์บอกซีเมทิลไคโตซาน, แคลเซียมแอลจีเนต, แคลเซียมไอออน, ความมีชีวิตของเซลล์, สัญญาณวิทยาของเซลล์

Title	BIOCOMPATIBILITY OF A CHITOSAN-DERIVED HEMOSTATIC AGENT WITH HUMAN GINGIVAL FIBROBLASTS
Author	TANAWAT MAHATCHARIYAPONG
Degree	MASTER OF SCIENCE
Academic Year	2020
Thesis Advisor	Assistant Professor Dr. Marnisa Sricholpech

Excessive bleeding is a potentially life-threatening complication in oral surgery. The timely and effective control of bleeding is particularly important in reducing the morbidity and mortality of the patients. Nowadays, numerous newly developed hemostatic agents are introduced to control bleeding. The ideal hemostatic agent should be safe, biocompatible, non-immunogenic, biodegradable, affordable, inexpensive and, mostly importantly, effective for bleeding control. Chitosan-based hemostatic agents are derived from deacetylated chitin. They have proven to be effective for bleeding control in both normal and coagulopathic conditions. The calcium alginate/*N*-O-carboxymethylchitosan (CA/NOCC) hemostatic sponge was developed and shown to be biocompatible with good hemostatic efficiency. However, to extend its usage for hemorrhage control in the oral cavity, the safety and biocompatibility of the material for the oral targeted tissue must be investigated. The aim of this study was to evaluate the cytotoxicity of CA/NOCC on primary human gingival fibroblasts (GFs). Primary human GFs, cultured in direct contact with or in the culture-media extract of CA/NOCC were assigned to experimental groups, and compared with the control group (GFs) in all experiments. Cell morphology was assessed by scanning electron microscopy. Cell viability and proliferation were determined by MTT assays at day 1-3-6 of culture. Nonviable cells were tested by Trypan blue dye exclusion test. The level of calcium ion released from the CA/NOCC into the culture medium was measured by a QuantiChrom calcium assay kit. The results of this study revealed that GFs, cultured in direct contact with CA/NOCC, demonstrated lowered cell density and significant ultrastructural changes of the cell membrane with the presence of numerous fibrils and blebs. The proliferation rate of GFs cultured with the CA/NOCC specimens was significantly lower than that of control ($p < 0.01$). In addition, the number of nonviable cells cultured with the CA/NOCC were higher than that of control. Moreover, the level of Ca^{2+} was significantly higher in the medium collected from GFs cultured with the CA/NOCC. In conclusion, it is evident that the CA/NOCC sponge demonstrated cytotoxic effects, by significantly impairing the cell morphology, proliferative ability and viability of human GFs. Additionally, the high level of Ca^{2+} , released into the culture medium, could be the potential cause of the observed cytotoxic effects. Therefore, modifications in the preparation of the CA/NOCC sponge would be warranted for the material to be clinically applicable to various oral tissue.

Keyword : calcium alginate, calcium ion, carboxymethylchitosan, cell morphology, cell proliferation

กิตติกรรมประกาศ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความช่วยเหลือจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ทพญ.มานิสา ศรีชลเพชร อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก ที่กรุณาให้ความอนุเคราะห์ให้คำที่ปรึกษา คำแนะนำ และให้ความช่วยเหลือตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่อง ทำให้ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น ตลอดจนให้กำลังใจ ความเมตตา และความเอาใจใส่ตลอดระยะเวลาที่ทำการวิจัยเป็นอย่างดี ผู้วิจัยจึงขอกราบขอบพระคุณอาจารย์เป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ทพ.ขจรเกียรติ เจนบดินทร์ ประธานกรรมการสอบปริญญานิพนธ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ทพญ.อรุณวรรณ หล้าอุบล กรรมการสอบปริญญานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำแนะนำ แนวทางการแก้ไข ข้อคิดในการทำปริญญานิพนธ์ ตลอดจนคณาจารย์สาขาวิชาวิทยาการช่องปากและแม็กซิลโลเฟเชียล และคณาจารย์ทุกท่านที่ประสาทวิชาความรู้ให้แก่ผู้วิจัยตลอดระยะเวลาที่ศึกษาอยู่ในคณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ จนประสบความสำเร็จไปด้วยดี

ขอขอบพระคุณดร.วนิดา จันทรวีภู และคุณวาสนา โคสอน จากศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ (เอ็มเทค) ที่กรุณาให้ความอนุเคราะห์ด้านข้อมูลความรู้ และสนับสนุนวัสดุห้ามเลือดจากอนุพันธ์ไคโตซาน

ขอขอบพระคุณนายศิริพงศ์ ตั้งประเสริฐกิจ และภาควิชาโศษฐวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่กรุณาให้ความอนุเคราะห์สถานที่และอุปกรณ์ในการทำวิจัย ตลอดจนให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกตลอดระยะเวลาที่ทำการวิจัยเป็นอย่างดี

ขอขอบพระคุณทุนอุดหนุนการวิจัยจากโรงพยาบาลทันตกรรม คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒที่มาให้การวิจัยสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบคุณเพื่อนนิสิตหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาการช่องปากและแม็กซิลโลเฟเชียลทุกคน ที่ให้ความช่วยเหลือ แนะนำ และเป็นกำลังใจให้ตลอดมา

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณทุกคนในครอบครัว อาทิ บิดา มารดา ญาติ พี่ น้อง ที่ให้กำลังใจ ให้การสนับสนุน ให้ความช่วยเหลือ อีกทั้งยังมอบความรัก ความห่วงใยตลอดมา จนผู้วิจัยสามารถสำเร็จการศึกษาไปด้วยดี

ธนวัฒน์ มหัทธชัยพงษ์

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญรูปภาพ	ฎ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ภูมิหลัง	1
ความมุ่งหมายของงานวิจัย.....	4
ความสำคัญของงานวิจัย	4
ขอบเขตของงานวิจัย	4
ประชากรที่ใช้ในงานวิจัย.....	4
กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในงานวิจัย.....	4
ตัวแปรที่ศึกษา	4
กรอบแนวคิดการวิจัย	5
สมมติฐานงานวิจัย.....	5
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	6
กระบวนการห้ามเลือด (Hemostasis)	6
สารห้ามเลือดเฉพาะที่ (Local hemostatic agents).....	9
สารไคตินและไคโตซาน (Chitin and Chitosan)	12
แอลจีเนต (Alginate)	15

วัสดุห้ามเลือดจากอนุพันธ์ไคโตซาน (Calcium alginate/ <i>N</i> -O-carboxymethylchitosan; CA/NOCC)	19
หน้าที่ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เนื้อเยื่อเหงือก (Functions of gingival fibroblast)	23
สัณฐานวิทยาของเซลล์ตาย	26
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	34
การกำหนดประชากรและการเลือกกลุ่มตัวอย่าง	34
ประชากร	34
การเลือกกลุ่มตัวอย่าง	34
ขั้นตอนการทดลอง.....	34
1. การเตรียมวัสดุห้ามเลือดจากอนุพันธ์ไคโตซาน (CA/NOCC)	34
2. การเพาะเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์เนื้อเยื่อเหงือก	35
3. การศึกษาสัณฐานวิทยาของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เนื้อเยื่อเหงือกด้วยกล้องจุลทรรศน์ อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope: SEM)	36
4. การทดสอบความมีชีวิตของเซลล์และอัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์ไฟโบร บลาสต์เนื้อเยื่อ เหงือก	37
5. การทดสอบการตายของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เนื้อเยื่อเหงือกด้วยวิธีการย้อมติดสีทริปแพ นบลู (Trypan blue exclusion dye)	38
6. การศึกษาระดับความเข้มข้นของแคลเซียมไอออนในอาหารเลี้ยงเซลล์ไฟโบร บลาสต์ เนื้อเยื่อเหงือก (Calcium Ion concentration measurement)	39
การเก็บรวบรวมข้อมูล	40
สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล	41
บทที่ 4 ผลการดำเนินงานวิจัย.....	42
สัณฐานวิทยาของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เนื้อเยื่อเหงือก (Cell morphology).....	42

ความมีชีวิตและอัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เนื้อเยื่อเหงือก (Cell Viability and Cell Proliferation)	46
การตายของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เนื้อเยื่อเหงือกโดยวิธีการย้อมติดสีทริปแฟนบลู (Trypan blue dye exclusion test)	48
ระดับความเข้มข้นของแคลเซียมไอออน(Calcium Ion concentration measurement)	50
บทที่ 5 อภิปรายผล สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ	52
อภิปรายผลการวิจัย	52
สรุปผลการวิจัย	58
ข้อเสนอแนะ	58
บรรณานุกรม	59
ภาคผนวก.....	68
ประวัติผู้เขียน.....	75

สารบัญตาราง

หน้า

ตาราง 1 แสดงสารห้ามเลือดเฉพาะที่แบบพาสซีฟ (Passive hemostatic agents).....	10
ตาราง 2 แสดงสารห้ามเลือดเฉพาะที่แบบแอคทีฟ (Active hemostatic agents)	11
ตาราง 3 แสดงตัวอย่างวัสดุปิดแผล (wound dressing) จากแอลจินัตที่มีวางจำหน่ายใน ท้องตลาด.....	18
ตาราง 4 แสดงลักษณะต่าง ๆ ของเซลล์ในกระบวนการตายของเซลล์	30



สารบัญรูปภาพ

หน้า

ภาพประกอบ 1 กรอบแนวคิดงานวิจัย	5
ภาพประกอบ 2 แสดงปัจจัยการแข็งตัวของเลือด	8
ภาพประกอบ 3 แสดงโครงสร้างโมเลกุลของโคตินและโคโตซาน	12
ภาพประกอบ 4 แสดงกลไกการห้ามเลือดของวัสดุห้ามเลือดโคโตซาน	14
ภาพประกอบ 5 แสดงตัวอย่างวัสดุห้ามเลือดจากโคโตซานที่มีวางจำหน่ายในท้องตลาด	15
ภาพประกอบ 6 ภาพแสดงโมเลกุลของโมโนเมอร์ L-gulonate (G) และ D-mannuronate (M) ในสารแอลจีเนต	16
ภาพประกอบ 7 ภาพ SEM แสดงสัณฐานวิทยาของเซลล์สร้างกระดูกจากชากรรไกรมนุษย์บนกระจกกันใส (Cover slip) ในกลุ่มควบคุม (hAOBs) และกลุ่มทดสอบที่เลี้ยงร่วมกับวัสดุห้ามเลือด CA/NOCC (hAOBs+CA/NOCC) (ลูกศรสีแดง แสดงโครงร่างของเซลล์ (Lamellipodia) ที่ยื่นมาเกาะกระจกกันใส)	21
ภาพประกอบ 8 ภาพ SEM แสดงสัณฐานวิทยาของเซลล์สร้างกระดูกจากชากรรไกรมนุษย์บนผิววัสดุห้ามเลือด CA/NOCC (ลูกศรสีฟ้า แสดงโครงร่างขนาดเล็กที่ยื่นออกจากเซลล์ (Filopodia) ลูกศรสีแดง แสดงไฟบริลขนาดเล็ก (Fibrils) บนเยื่อหุ้มเซลล์)	22
ภาพประกอบ 9 หน้าที่ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เนื้อเยื่อเหงือก (Functions of gingival fibroblast)	23
ภาพประกอบ 10 แสดงสัณฐานวิทยาของเซลล์ไลน์ HL-60 (Human leukemia cell) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (light microscope) เมื่อได้รับสารเคมีและพบการตายเซลล์ทั้งแบบ apoptosis และ necrosis (A: apoptosis, N: necrosis)	27
ภาพประกอบ 11 ก แสดงสัณฐานวิทยาของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบจากหลอดเลือดเอออร์ตามนุษย์ (Human aortic smooth muscle cell) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope: SEM) พบลักษณะการบวมออกของเยื่อหุ้มเซลล์ (Blebbing) ข	

แสดงสัณฐานวิทยาของเซลล์ไลน์ไฟโบรบลาสต์หนู rat-1/myc-ER ภายใต้กล้อง SEM พบลักษณะการบวมของเยื่อหุ้มเซลล์ (Blebbing)	28
ภาพประกอบ 12 แสดงลักษณะของ Blebings และ Apoptotic bodies	29
ภาพประกอบ 13 แสดงปัจจัยเรื่องความรุนแรงของสารพิษที่มีผลต่อการตายของเซลล์	31
ภาพประกอบ 14 ภาพ SEM ก แสดงสัณฐานวิทยาของเซลล์ไลน์ไฟโบรบลาสต์ (HF 19: human fetal lung fibroblast) ข แสดงสัณฐานวิทยาของเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากเอ็นยี่ดบริตันต์มนุษย์ (Human PDL fibroblast) ที่ถูกเลี้ยงภายใต้สภาวะปกติ.....	32
ภาพประกอบ 15 ก ภาพ SEM แสดงสัณฐานวิทยาของเซลล์ไลน์ไฟโบรบลาสต์ L-929 เมื่อได้รับสารพิษ เซลล์ยังคงรูปร่างกระสวย แต่พบการบวมออกของเยื่อหุ้มเซลล์(Blebbing) ข ภาพ SEM แสดงสัณฐานวิทยาของเซลล์ไลน์ไฟโบรบลาสต์ L-929 เมื่อได้รับสารพิษ เซลล์มีลักษณะหดกลม และมีการบวมออกของเยื่อหุ้มเซลล์(Blebbing).....	33
ภาพประกอบ 16 แสดงวัสดุห้ามเลือดจากอนุพันธ์โคโคซาน (CA/NOCC) ขนาด 6 และ 10 มิลลิเมตร.....	35
ภาพประกอบ 17 ภาพ SEM แสดงลักษณะของวัสดุห้ามเลือด CA/NOCC ในการทดสอบวันที่ 3 (รูป ก-ค) และวันที่ 7 (รูป ง-ฉ) ที่กำลังขยาย X100, X250, X500 ตามลำดับ	43
ภาพประกอบ 18 ภาพ SEM แสดงสัณฐานวิทยาของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เนื้อเยื่อเหงือกในกลุ่มควบคุมบนกระจกกันใส (Cover slip) ในการทดสอบวันที่ 3 (รูป ก-ค) และวันที่ 7 (รูป ง-ฉ) ที่กำลังขยาย X500, X1000, X5000 ตามลำดับ.....	44
ภาพประกอบ 19 ภาพ SEM แสดงสัณฐานวิทยาของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เนื้อเยื่อเหงือกในกลุ่มทดสอบที่เลี้ยงร่วมกับวัสดุห้ามเลือด CA/NOCC บริเวณกระจกกันใส (cover slip) รอบวัสดุ ในการทดสอบวันที่ 3 (รูป ก-ค) และวันที่ 7 (รูป ง-ฉ) ที่กำลังขยาย X500, X1000, X5000 ตามลำดับ	45
ภาพประกอบ 20 ภาพ SEM แสดงสัณฐานวิทยาของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เนื้อเยื่อเหงือกในกลุ่มทดสอบที่เลี้ยงร่วมกับวัสดุห้ามเลือดจากอนุพันธ์โคโคซาน บริเวณผิววัสดุ ในการทดสอบวันที่ 3 (รูป ก-ค) และวันที่ 7 (รูป ง-ฉ) ที่กำลังขยาย X500, X1000, X5000 ตามลำดับ	46
ภาพประกอบ 21 กราฟเส้นแสดงตัวแทนจากการทดสอบความมีชีวิต (Cell viability) ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เนื้อเยื่อเหงือก 1 ชุดการทดสอบ พบว่าเซลล์ไฟโบรบลาสต์เนื้อเยื่อเหงือกมี	

ความสามารถในการเพิ่มจำนวนเซลล์เมื่อเวลาผ่านไป ระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบ ใน วันที่ 1, 3 และ 6 (GF: gingival fibroblast, CN: CA/NOCC, CNE: CA/NOCC Extract)	47
ภาพประกอบ 22 กราฟแท่งแสดงอัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์ไฟโบรบลาสต์เนื้อเยื่อเหงือก (Proliferation rate) ระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบ จากการทดสอบทั้งหมด 5 ชุด (***) : P -value = 0.0006, **** : P -value < 0.0001, GF: gingival fibroblast, CN: CA/NOCC, CNE: CA/NOCC Extract)	48
ภาพประกอบ 23 กราฟแท่งแสดงจำนวนเซลล์ตาย ในการทดสอบวันที่ 14 ทำการคำนวณ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมและคำนวณเป็นร้อยละ (%Control) ระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่ม ทดสอบ จากการทดสอบทั้งหมด 5 ชุด (GF: gingival fibroblast, CN: CA/NOCC, CNE: CA/NOCC Extract)	49
ภาพประกอบ 24 กราฟแท่งแสดงระดับความเข้มข้นของแคลเซียมไอออน (Ca^{2+} concentration) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ ในวันทดสอบที่ 1 3 และ 6 (GF: gingival fibroblast, CN: CA/NOCC, CNE: CA/NOCC Extract)	51
ภาพประกอบ 25 กราฟเส้นแสดงการทดสอบความมีชีวิต (Cell viability) ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ เนื้อเยื่อเหงือก 6 ชุดการทดสอบ ระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบ ในวันที่ 1, 3 และ 6 (GF: gingival fibroblast, CN: CA/NOCC, CNE: CA/NOCC Extract)	69
ภาพประกอบ 26 ภาพ SEM แสดงสัณฐานวิทยาของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เนื้อเยื่อเหงือกในกลุ่ม ควบคุมบนกระจกกันใส (Cover slip) ในการทดสอบวันที่ 3 และวันที่ 7 ที่กำลังขยาย X500 X1,000 และ X5,000 ตามลำดับ	70
ภาพประกอบ 27 ภาพ SEM แสดงสัณฐานวิทยาของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เนื้อเยื่อเหงือกในกลุ่ม ทดสอบที่เลี้ยงร่วมกับวัสดุห้ามเลือด CA/NOCC บริเวณกระจกรอบวัสดุ ในการทดสอบวันที่ 3 และวันที่ 7 ที่กำลังขยาย X500 X1,000 และ X5,000 ตามลำดับ	71
ภาพประกอบ 28 ภาพ SEM แสดงสัณฐานวิทยาของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เนื้อเยื่อเหงือกในกลุ่ม ทดสอบที่เลี้ยงร่วมกับวัสดุห้ามเลือดCA/NOCC บริเวณผิววัสดุ ในการทดสอบวันที่ 3 และวันที่ 7 ที่กำลังขยาย X500 X1,000 และ X5,000 ตามลำดับ	72

บทที่ 1

บทนำ

ภูมิหลัง

กลไกการห้ามเลือดถือเป็นกระบวนการที่สำคัญในการร่างกายมนุษย์ เนื่องจากช่วยป้องกันไม่ให้ร่างกายสูญเสียเลือดจากการบาดเจ็บต่าง ๆ ทันตแพทย์ผู้ทำงานหัตถการทางศัลยกรรมควรมีความรู้และเข้าใจในกลไกดังกล่าว ซึ่งประกอบด้วย 3 ขั้นตอนหลัก คือ การหดตัวของหลอดเลือด (Vasoconstriction) การเกาะกลุ่มของเกร็ดเลือด (Platelet plug) และการสร้างลิ่มเลือด (Blood clot formation) โดยทั้ง 3 ขั้นตอนจะทำงานอย่างต่อเนื่องเป็นระบบตั้งแต่หลอดเลือดได้รับบาดเจ็บจนกระทั่งเกิดการหยุดของเลือด และเกิดลิ่มเลือดที่มีความแข็งแรงสามารถคงสภาพบาดแผลไม่ให้เกิดเลือดออกได้อีก แต่อย่างไรก็ตามการเกิดภาวะเลือดออกมากขณะทำหัตถการสามารถเกิดได้ทั้งในผู้ป่วยที่มีสภาพร่างกายสมบูรณ์แข็งแรงและผู้ป่วยที่มีความผิดปกติในการแข็งตัวของเลือด ซึ่งปัญหาดังกล่าวหากไม่ได้รับการแก้ไขอย่างทันท่วงที จะก่อให้เกิดอันตรายถึงชีวิตได้ ดังนั้นทันตแพทย์ควรตระหนักและให้ความสำคัญกับเรื่องดังกล่าวเสมอเมื่อให้การรักษาผู้ป่วยทางด้านศัลยกรรม⁽¹⁾

ในปัจจุบันความรู้ทางการแพทย์ได้ถูกพัฒนาไปอย่างรวดเร็ว มีการค้นคิดสารห้ามเลือดเฉพาะที่ขึ้นมามากมายและมีคุณสมบัติต่าง ๆ ที่ดี เช่น มีความปลอดภัยในการใช้งาน เข้ากันได้กับเนื้อเยื่อ (Biocompatibility) ไม่มีความเป็นพิษต่อเนื้อเยื่อ (Non-toxicity) ไม่ก่อให้เกิดปฏิกิริยาต่อต้านสิ่งแปลกปลอมจากร่างกาย (Foreign body reaction) สามารถสลายตัวได้ (Biodegradability) สามารถใช้งานได้ง่าย ราคาไม่แพงและที่สำคัญสามารถห้ามเลือดได้อย่างมีประสิทธิภาพ⁽²⁻⁴⁾

สารห้ามเลือดเฉพาะที่มีความสำคัญในงานศัลยกรรมช่องปาก เนื่องจากในบางกรณีการห้ามเลือดจากบาดแผลไม่สามารถหยุดเลือดได้ด้วยวิธีการกด (Direct pressure) ซึ่งเป็นวิธีการห้ามเลือดที่มีประสิทธิภาพ สารห้ามเลือดเฉพาะที่จะทำหน้าที่ควบคุมการไหลของเลือดโดยการกระตุ้นและเร่งให้เกิดการสร้างลิ่มเลือดตามธรรมชาติ ผ่านปฏิกิริยาระหว่างสารห้ามเลือดและองค์ประกอบภายในเลือด Gelatin sponge (เช่น Gelfoam®, Spongostan®) และ Oxidized regenerated cellulose (เช่น Surgicel®) เป็นสารห้ามเลือดเฉพาะที่ที่ถูกนำมาใช้บ่อยในการห้ามเลือดทางศัลยกรรมช่องปาก สารห้ามเลือดดังกล่าวสามารถห้ามเลือดได้ดี เมื่อผู้ป่วยมีสภาพร่างกายแข็งแรง ไม่มีความผิดปกติของระบบการแข็งตัวของเลือด (Intact coagulation cascade) หรือไม่ได้รับยาต้านเกล็ดเลือดและยาต้านการแข็งตัวของเลือด (Antiplatelet and Anticoagulant

drugs) นอกจากนี้สารทั้งสองชนิดยังมีประสิทธิภาพการห้ามเลือดในบริเวณที่มีเลือดออกมาก แต่เนื่องจากสารห้ามเลือดทั้งสองชนิดมีความสามารถในการดูดซึมเลือดในปริมาณมาก ทำให้วัสดุอาจไปกดโครงสร้างสำคัญ เช่น เส้นประสาท หลอดเลือด รวมถึงเนื้อเยื่อรอบบาดแผล และส่งผลต่อการหายของแผลได้^(2, 3, 5) นอกจากนี้ประสิทธิภาพที่ดีในการห้ามเลือดแล้ว สารห้ามเลือดและผลิตภัณฑ์จากการย่อยสลายสารห้ามเลือด (Metabolic breakdown products) ควรมีความปลอดภัยในการใช้งานและไม่ส่งผลขัดขวางต่อการหายของแผล มีการศึกษาพบว่าสารห้ามเลือดเฉพาะที่จาก Gelatin sponge และ Oxidized regenerated cellulose ทำให้การหายของแผลช้าลง⁽⁶⁾ (Delayed wound healing) เกิดปฏิกิริยาต่อต้านสิ่งแปลกปลอม⁽⁷⁾ (Foreign body reaction) เกิดอาการปวดแผลมากกว่ากลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ใส่วัสดุห้ามเลือด⁽⁸⁾ และเกิดการหายของแผลที่เป็นกระดูกช้ากว่าปกติ^(9, 10) จึงทำให้มีการคิดค้นสารห้ามเลือดชนิดใหม่ออกมา เพื่อปรับปรุงคุณสมบัติต่าง ๆ ให้ดีขึ้น และไม่ส่งผลขัดขวางต่อการหายของแผลทั้งเนื้อเยื่ออ่อนและในกระดูก

สารห้ามเลือดจากไคโตซาน (Chitosan) เป็นสารที่เตรียมจากไคติน (Chitin) ที่ดึงหมู่อะเซทิลออก (Deacetylation) ถูกผลิตและวางจำหน่ายในท้องตลาดหลากหลายชื่อ เช่น Hemcon dental dressing (HDD[®]), Celox[®] และ ChitoFlex[®] เป็นต้น⁽¹¹⁾ สารดังกล่าวมีกลไกการห้ามเลือดคือ ก่อให้เกิดการหดตัวของหลอดเลือด (Vasoconstriction) และการที่วัสดุมีคุณสมบัติเป็นประจุบวก ทำให้สามารถดึงดูดประจุลบที่ผิวเซลล์ของเซลล์เม็ดเลือดแดง (Erythrocyte) ทำให้เกิดลิ่มเลือดที่ชั้นหนืดและยึดติดแน่นบริเวณบาดแผล นอกจากนี้ยังทำหน้าที่เป็นโครงร่างเพื่อให้เกิดการยึดเกาะของเซลล์เม็ดเลือดแดงด้วย^(3, 12) จากกลไกการห้ามเลือดดังกล่าว ทำให้วัสดุห้ามเลือดจากไคโตซานไม่มีการทำงานร่วมกับกลไกการห้ามเลือดทุติยภูมิ (Secondary hemostasis) ที่ประกอบด้วยปัจจัยการแข็งตัวของเลือดต่าง ๆ ใน Intrinsic และ Extrinsic pathway⁽¹³⁾ ทำให้สารห้ามเลือดจากไคโตซานสามารถห้ามเลือดได้อย่างมีประสิทธิภาพในผู้ป่วยที่มีความผิดปกติในการแข็งตัวของเลือด เช่น ผู้ป่วยที่ทานยาต้านการแข็งตัวของเลือด (Anticoagulant drugs)^(14, 15) หรือทานยาต้านเกล็ดเลือด (Antiplatelet drugs)⁽¹⁶⁾ นอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติการส่งเสริมการสร้างกระดูกใหม่ของสารห้ามเลือดจากไคโตซาน (Osteoconduction) โดยการกระตุ้นเซลล์ (Osteoprogenitor cell) ให้เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์สร้างกระดูกได้^(17, 18) แต่เนื่องจากสารห้ามเลือดดังกล่าวต้องนำเข้าจากต่างประเทศ จึงทำให้มีราคาที่สูงและต้องใช้เวลาในการจัดหาวัสดุที่นาน อีกทั้งสารไคโตซานยังไม่สามารถละลายในน้ำ และสารละลายที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเป็นกลาง (Neutral pH)^(19, 20) จึงเป็นข้อจำกัดในพัฒนาและต่อยอดวัสดุเพื่อนำไปใช้งาน ดังนั้นศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ (National Metal and Materials Technology

Center :MTEC) จึงได้คิดค้นและพัฒนาสารห้ามเลือดเฉพาะที่จากอนุพันธ์ไคโตซานชนิดใหม่ขึ้น เพื่อนำเอาคุณสมบัติของสารไคโตซานมาใช้ประโยชน์ ลดข้อจำกัดของสารไคโตซาน ช่วยลดค่าใช้จ่าย และทำให้ผู้ป่วยสามารถเข้าถึงการรักษาที่มีคุณภาพดีขึ้น

Calcium alginate/*N*-O-carboxymethylchitosan (CA/NOCC) เป็นสารห้ามเลือดจากอนุพันธ์ไคโตซาน ที่ถูกคิดค้นและพัฒนาขึ้นโดยศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ (MTEC) สารดังกล่าวมีคุณสมบัติที่สามารถละลายน้ำได้ดีและมีประจุลบจากหมู่คาร์บอกซิล (Carboxyl functional group) ซึ่งคล้ายกับประจุลบบนพื้นผิวของซับเอนโดทีเลียมคอลลาเจน (Subendothelial collagen) ที่ผนังของหลอดเลือด คุณสมบัติดังกล่าวช่วยส่งเสริมให้เกิดการห้ามเลือด คือ กระตุ้นการทำงานของปัจจัยการแข็งตัวของเลือด (Clotting factor) และการกระตุ้นการทำงานของเกล็ดเลือดให้สามารถยึดเกาะบริเวณพื้นผิวของซับเอนโดทีเลียมคอลลาเจนได้อย่างรวดเร็ว⁽²¹⁾ จากคุณสมบัติดังกล่าวทำให้วัสดุ CA/NOCC ก่อให้เกิดการห้ามเลือดจากทั้งขั้น Primary hemostasis และ Secondary hemostasis ส่งผลให้วัสดุสามารถห้ามเลือดได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทั้งในผู้ป่วยที่มีความแข็งแรงและมีความผิดปกติด้านการแข็งตัวของเลือด นอกจากนี้วัสดุ CA/NOCC ยังได้ผ่านการทดสอบต่าง ๆ ที่บ่งบอกถึงประสิทธิภาพการห้ามเลือดและความปลอดภัยในการใช้งาน ทั้งในระดับห้องปฏิบัติการ สัตว์ทดลอง และการทดสอบในมนุษย์ พบว่า วัสดุ CA/NOCC สามารถก่อให้เกิดการแข็งตัวของเลือดได้เร็วและมีประสิทธิภาพกว่ากลุ่มควบคุม สามารถกระตุ้นการยึดเกาะและการทำงานของเกล็ดเลือดได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทั้งในการทดสอบทางห้องปฏิบัติการและสัตว์ทดลอง⁽²²⁻²⁴⁾ มีความเข้ากันได้ดีและไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ไฟโบรบลาสต์ L 929 และเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากผิวหนังมนุษย์ (Normal human dermal fibroblasts)⁽²⁵⁾ สามารถห้ามเลือดได้อย่างมีประสิทธิภาพในการผ่าตัดที่ผิวหนังมนุษย์⁽²⁶⁾ ไม่ก่อให้เกิดการระคายเคือง (Irritation) และภาวะภูมิไวเกินต่อผิวหนังมนุษย์ (Hypersensitivity)^(27, 28) สามารถสลายตัวได้ในร่างกายมนุษย์ภายในระยะเวลา 3 เดือน และไม่ก่อให้เกิดปฏิกิริยาการอักเสบหรือการต่อต้านสิ่งแปลกปลอม⁽²⁷⁾ และจากการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์สร้างกระดูก (Primary human alveolar osteoblasts) ที่คัดแยกมาจากชั้นกระดูกขากรรไกรในมนุษย์ พบว่า วัสดุ CA/NOCC ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์สร้างกระดูก โดยเซลล์สร้างกระดูกที่ทดสอบร่วมกับวัสดุ CA/NOCC มีพื้นฐานวิทยาใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุม นอกจากนี้เซลล์ยังมีชีวิตและมีความสามารถในการเพิ่มจำนวนเซลล์ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม⁽²⁹⁾ แต่อย่างไรก็ตามการพัฒนาวัสดุห้ามเลือดดังกล่าวให้สามารถนำมาใช้งานห้ามเลือดในช่องปาก การทดสอบความเข้ากันได้ (Biocompatibility) และความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cytotoxicity) ในช่องปากเป็นสิ่งที่

ต้องได้รับการประเมิน ซึ่งเซลล์ไฟโบรบลาสต์เนื้อเยื่อเหงือก (Primary human gingival fibroblasts) คือเซลล์ชนิดหนึ่งในช่องปาก หากวัสดุห้ามเลือดดังกล่าวมีความเข้ากันได้และไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์เนื้อเยื่อเหงือก จะทำให้สามารถนำวัสดุห้ามเลือดดังกล่าวมาใช้ห้ามเลือดในช่องปากได้ต่อไปในอนาคต

ความมุ่งหมายของงานวิจัย

เพื่อประเมินความเป็นพิษและความเข้ากันได้ต่อเซลล์ของวัสดุห้ามเลือดจากอนุพันธ์โคโคซานในเซลล์ไฟโบรบลาสต์เนื้อเยื่อเหงือก (Primary human gingival fibroblasts)

ความสำคัญของงานวิจัย

เพื่อพัฒนาวัสดุห้ามเลือดจากอนุพันธ์โคโคซาน (CA/NOCC) ให้สามารถใช้งานด้านการห้ามเลือดในช่องปาก การประเมินและทดสอบความเป็นพิษและความเข้ากันได้ต่อเซลล์ที่เป็นองค์ประกอบภายในช่องปากจึงมีความสำคัญ เซลล์ไฟโบรบลาสต์เนื้อเยื่อเหงือก ถือเป็นหนึ่งในองค์ประกอบเซลล์ในช่องปาก หากวัสดุห้ามเลือดดังกล่าวสามารถเข้ากับเซลล์ไฟโบรบลาสต์เนื้อเยื่อเหงือกได้ดีและไม่มีความเป็นพิษ ทั้งในด้านของสัญญาณวิทยาของเซลล์ ความมีชีวิตและความสามารถในการเพิ่มจำนวนเซลล์ และการตายของเซลล์ จะทำให้สามารถพัฒนาวัสดุห้ามเลือดจากอนุพันธ์โคโคซานมาใช้ประโยชน์ในงานศัลยกรรมช่องปากได้ต่อไป

ขอบเขตของงานวิจัย

ประชากรที่ใช้ในงานวิจัย

เซลล์ไฟโบรบลาสต์เนื้อเยื่อเหงือก (Primary human gingival fibroblasts)

กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในงานวิจัย

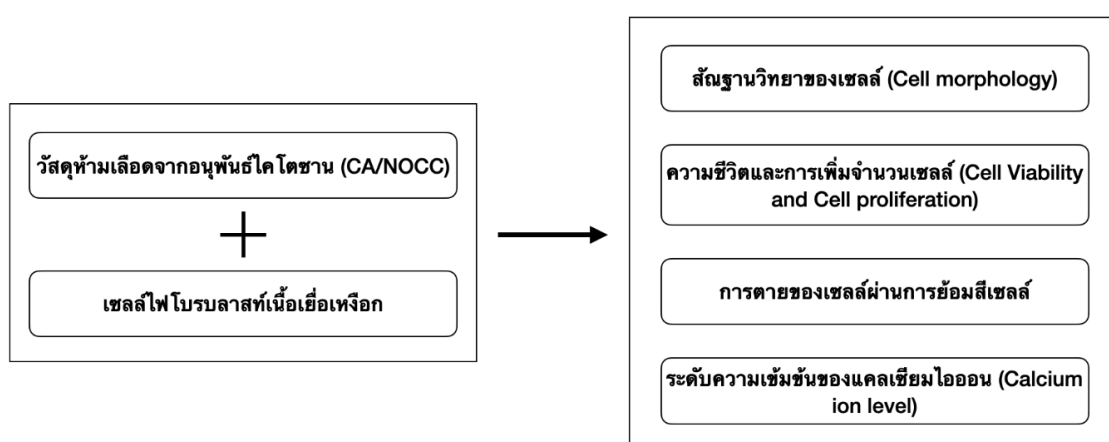
เซลล์ไฟโบรบลาสต์เนื้อเยื่อเหงือก (Primary human gingival fibroblasts) ที่เพาะเลี้ยงในจานเลี้ยงเซลล์

ตัวแปรที่ศึกษา

1. ตัวแปรอิสระ มีดังนี้
 - 1.1 วัสดุห้ามเลือดจากอนุพันธ์โคโคซาน (CA/NOCC)
2. ตัวแปรตาม ได้แก่

- 2.1 สัณฐานวิทยาของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เนื้อเยื่อเหงือก
- 2.2 ความมีชีวิตและอัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์ไฟโบรบลาสต์เนื้อเยื่อเหงือก
- 2.3 การตายของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เนื้อเยื่อเหงือก
- 2.4 ระดับความเข้มข้นของแคลเซียมไอออนในอาหารเลี้ยงเซลล์

กรอบแนวคิดการวิจัย



ภาพประกอบ 1 กรอบแนวคิดงานวิจัย

สมมติฐานงานวิจัย

วัสดุหุ้มเลือดจากอนุพันธ์โคโคซาน (CA/NOCC) ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์เนื้อเยื่อเหงือก (Primary human gingival fibroblast) โดยเซลล์ไฟโบรบลาสต์เนื้อเยื่อเหงือกสามารถมีสัณฐานวิทยา ความชีวิตและความสามารถในการเพิ่มจำนวนเซลล์ และการตายของเซลล์อยู่ในระดับปกติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในการวิจัยนี้ ผู้วิจัยได้ศึกษาเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง และได้นำเสนอตามหัวข้อต่อไปนี้

1. กระบวนการห้ามเลือด (Hemostasis)
2. สารห้ามเลือดเฉพาะที่ (Local hemostatic agents)
3. สารไคตินและไคโตซาน (Chitin and Chitosan)
4. สารแอลจีเนต (Alginate)
5. วัสดุห้ามเลือดจากอนุพันธ์ไคโตซาน (Calcium alginate/N-O-carboxymethylchitosan; CA/NOCC)
6. หน้าที่ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เนื้อเยื่อเหงือก (Functions of gingival fibroblast)
7. สันฐานวิทยาของเซลล์ตาย

กระบวนการห้ามเลือด (Hemostasis)

กระบวนการห้ามเลือดเป็นการทำงานร่วมกันของหลอดเลือด เกล็ดเลือด (Platelet) และปัจจัยการแข็งตัวของเลือด (Coagulation factors) เพื่อป้องกันการสูญเสียเลือดออกจากร่างกาย จนเป็นอันตรายต่อชีวิต โดยขั้นตอนการแข็งตัวของเลือดจะเกิดเป็นลำดับดังนี้^(30, 31)

1. กลไกการห้ามเลือดปฐมภูมิ (Primary hemostasis)

เกิดขึ้นทันทีหลังจากหลอดเลือดได้รับบาดเจ็บในช่วงเวลาเป็นวินาทีหรือนาที โดยหลอดเลือดจะหดตัวโดยอัตโนมัติ (Vasoconstriction) ผ่านการทำงานของกล้ามเนื้อเรียบรอบหลอดเลือด ทำให้เลือดที่ไหลผ่านบริเวณนั้นน้อยลง และเนื่องจากการบาดเจ็บของหลอดเลือดทำให้โครงสร้างของหลอดเลือดซึ่งประกอบด้วยเซลล์เอนโดทีเลียม (Endothelial cell) และชั้นใต้เซลล์เอนโดทีเลียม (Subendothelial layer) เปิดออก ทำให้เกล็ดเลือดเริ่มเข้ามายึดเกาะบริเวณดังกล่าว นำไปสู่การกระตุ้นการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดเป็น Platelet plug ทำหน้าที่อุดกั้นบริเวณที่ฉีกขาด เป็นการห้ามเลือดระยะแรก ซึ่งกลไกการเกิด Platelet plug ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน⁽³⁰⁾ คือ

1. Platelet adhesion เป็นขั้นตอนที่เกล็ดเลือดจะเข้ามายึดเกาะกับชั้นใต้เซลล์เอนโดทีเลียมที่เปิดออกจากการได้รับบาดเจ็บ โดยมี von Willebrand factor (vWF) เป็นตัวเชื่อมระหว่างชั้นใต้เซลล์เอนโดทีเลียมกับตัวรับ (Glycoprotein receptor) บนผิวของเกล็ดเลือด

2. Platelet activation เป็นขั้นตอนที่เกล็ดเลือดจะถูกกระตุ้นจากเกล็ดเลือดปกติให้อยู่ในรูปที่ถูกกระตุ้นให้ทำหน้าที่ห้ามเลือด โดนขั้นตอนนี้จะเกิดหลังจากเกล็ดเลือดมีการยึดเกาะกับชั้นใต้เซลล์เอนโดทีเลียมและเกิดการส่งผ่านสัญญาณภายในเกล็ดเลือดและระหว่างเกล็ดเลือด ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเกล็ดเลือดจากรูปจานกลมเป็นเซลล์ที่มีขายื่นออกมา เรียกว่า Pseudopod เกิดเป็นเซลล์ที่มีพื้นที่ผิวมากขึ้น ส่งผลให้เกิดการเกาะกลุ่มกันดีขึ้น และเกิดการหลั่งสาร เช่น fibrinogen, fibronectin และ vWF เกิดการสังเคราะห์สาร Thromboxane A₂ (TXA₂) ซึ่งสารกลุ่มนี้จะทำให้เกิดการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด (Platelet aggregation)

3. Platelet aggregation เป็นขั้นตอนที่ fibrinogen และ vWF ทำหน้าที่เชื่อมโยงเกล็ดเลือดเข้ามั่วด้วยกัน ทำให้เกิดการเกาะกลุ่มกันของเกล็ดเลือดเป็น Platelet plug มาอุดบริเวณที่ได้รับบาดเจ็บ

2. กลไกการห้ามเลือดทุติยภูมิ (Secondary hemostasis)

เกิดในช่วงเวลาเป็นนาทีถึงชั่วโมงหลังได้รับการบาดเจ็บ การสร้างลิ่มเลือดหรือ Fibrin เกิดจากการทำงานของปัจจัยการแข็งตัวของเลือด (Coagulation factor) ทำให้ได้ Fibrin ที่จะตกตะกอนลงมารวมกับเซลล์เม็ดเลือดแดงเป็นลิ่มเลือด (Blood clot หรือ Fibrin clot) ที่มีความแข็งแรงและสามารถห้ามเลือดได้อย่างมีประสิทธิภาพ ปัจจัยการแข็งตัวของเลือดสามารถแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม⁽³⁰⁾ คือ

1. กลุ่มที่ทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ ได้แก่ factor II, VII, IX, X, XI, XII, prekallikrein และ XIII
2. กลุ่มที่ทำหน้าที่เป็น Cofactor ได้แก่ factor III, Ca²⁺, V, VIII และ high molecular weight kininogen (HMWK)
3. กลุ่มที่ทำหน้าที่เป็นสารตั้งต้น ได้แก่ factor I

Factor	ชื่อปัจจัยอื่น ๆ และ/หรือ ชื่อเดิม
I	Fibrinogen
II	Prothrombin
III	Thromboplastin, tissue extract, tissue factor
IV	Calcium
V	Proaccelerin, labile factor, accelerator globulin (AcG)
VI	Accelerin แต่ปัจจุบันทราบว่า เป็น activated form ของ factor V (V _a) จึงไม่มีการใช้อีกต่อไป
VII	Proconvertin, serum prothrombin conversion accelerator (SPCA), stable factor, autoprothrombin I
VIII	Antihemophilic factor (AHF), antihemophilic globulin (AHG), platelet cofactor I, antihemophilic factor A
IX	Plasma thromboplastin component (PTC), Christmas factor, antihemophilic factor B, platelet cofactor II, autoprothrombin II
X	Stuart-Prower factor
XI	Plasma thromboplastin antecedent (PTA)
XII	Hageman factor
XIII	Fibrin stabilizing factor (FSF), Laki-Lorand factor (LLF), fibrinase

ภาพประกอบ 2 แสดงปัจจัยการแข็งตัวของเลือด

ที่มา: ศุภวาลย์ ศรีสวัสดิ์ (2555). การห้ามเลือด (HEMOSTASIS): ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล.

ปัจจัยการแข็งตัวของเลือดจะถูกสร้างในรูป inactive ซึ่งไม่สามารถทำงานได้ทันที ต้องได้รับการกระตุ้นการสร้างลิ่มเลือดก่อน ปัจจัยการแข็งตัวของเลือดเหล่านี้จะเกิด Proteolytic cleavage ภายในโมเลกุล ทำให้อยู่ในรูปของ active ที่มีฤทธิ์เป็น protease ซึ่งจะไปกระตุ้นปัจจัยการแข็งตัวของเลือดตัวอื่นๆต่อไป นอกจากนี้ปัจจัยการแข็งตัวของเลือดบางชนิด เช่น factor III, V, และ VIII จะทำหน้าที่เป็น cofactor สำหรับ factor VII, X และ IX ตามลำดับ ทำให้ protease activity ของปัจจัยการแข็งตัวของเลือด factor VII, X และ IX เพิ่มขึ้น ทำหน้าที่สุดท้ายของการกระตุ้นปัจจัยการแข็งตัวของเลือดจะทำให้เกิด proteolytic cleavage ของ factor I หรือ fibrinogen เกิดเป็น fibrin และลิ่มเลือดตามลำดับ

3. กลไกการห้ามเลือดตติยภูมิ (Tertiary hemostasis)

เกิดในช่วงเวลาเป็นชั่วโมงถึงเป็นวัน จะมีการหดตัวของลิ่มเลือด (Clot retraction) และดึงขอบแผลเข้าหากัน การหดตัวของลิ่มเลือดนี้เกิดจาก contractile protein ในเกล็ดเลือดและ fibrin ที่เชื่อมเกล็ดเลือดติดต่อกัน โดยมีปัจจัยการแข็งตัวของเลือดมาเกี่ยวข้อง คือ thrombin จะกระตุ้น factor XIII ให้ active และ factor XIII จะเชื่อมโยง fibrin ในลิ่มเลือด ทำให้ลิ่มเลือดมีความแข็งแรงยิ่งขึ้น และ factor XIII ยังเชื่อมกับ antiplasmin เข้ากับลิ่มเลือด ทำให้ลิ่มเลือดทนทานต่อการบวกรสลายลิ่มเลือด (Fibrinolysis)

สารห้ามเลือดเฉพาะที่ (Local hemostatic agents)

สารห้ามเลือดเฉพาะที่ (Local hemostatic agents)^(12, 30)

สารห้ามเลือดเฉพาะที่ คือ สารที่ช่วยส่งเสริมให้เกิดการหยุดของเลือด ในการทำงานทางสรีรกรรมช่องปาก ส่วนใหญ่จะเกิดการทำลายหลอดเลือดและไม่สามารถเกิดการหยุดของเลือดเองได้ตามธรรมชาติ การใช้สารห้ามเลือดเฉพาะที่จึงเป็นสิ่งที่สำคัญและควรทราบถึงคุณสมบัติวิธีการใช้ เพื่อป้องกันการเกิดอันตรายต่อผู้ป่วยจากภาวะเลือดออกมาก โดยสารห้ามเลือดเฉพาะที่สามารถแบ่งกลุ่มได้ 2 ประเภท คือ สารห้ามเลือดเฉพาะที่แบบแพสซีฟ (Passive hemostatic agents) และสารห้ามเลือดเฉพาะที่แบบแอคทีฟ (Active hemostatic agents)⁽³²⁾

1. สารห้ามเลือดเฉพาะที่แบบแพสซีฟ (Passive hemostatic agents)

สารห้ามเลือดแบบแพสซีฟจะทำหน้าที่เป็นโครงร่างเพื่อให้เกล็ดเลือดเข้ามายึดเกาะและสนับสนุนให้เกิดกลไกการแข็งตัวของเลือดอย่างแข็งแรงต่อไป โดยกลไกการทำงานของสารห้ามเลือดชนิดนี้จะมีลักษณะเป็นโครงร่างทางกายภาพแบบ Lattice-like matrix ให้เลือดและเกล็ดเลือดมายึดเกาะ และจะช่วยส่งเสริมการทำงานของ extrinsic clotting pathway เพื่อให้เกิดลิ่มเลือด แต่เนื่องจากประสิทธิภาพการห้ามเลือดของสารห้ามเลือดชนิดดังกล่าวจะดี ต้องอาศัยการทำงานของ fibrin ทำให้สารห้ามเลือดชนิดนี้เหมาะสมกับผู้ป่วยที่ไม่มีความผิดปกติในกลไกการแข็งตัวของเลือด (Intact coagulation cascade) นอกจากนี้สารห้ามเลือดชนิดนี้ยังยึดติดกับเนื้อเยื่อที่เปื่อยได้ไม่ดี อาจส่งผลต่อการห้ามเลือดในบริเวณที่ยังมีเลือดออกอยู่ (Active bleeding) และมีความสามารถในการดูดซับเลือดได้มาก อาจก่อให้เกิดการกดเบียดอวัยวะสำคัญได้ เช่น กดเส้นประสาท หลอดเลือด เป็นต้น ดังนั้นจึงควรใช้สารห้ามเลือดดังกล่าวให้น้อยที่สุด และควรนำสารดังกล่าวออกหากสามารถหยุดเลือดได้ดีแล้ว แต่อย่างไรก็ตามสารห้ามเลือดชนิดดังกล่าวมีประสิทธิภาพการห้ามเลือดในปริมาณมากได้ดี สามารถจัดหาได้ง่าย ใช้งานง่าย และมีราคาถูก

ทำให้สารห้ามเลือดชนิดนี้ถูกเลือกใช้เป็นลำดับแรกๆ ตัวอย่างสารห้ามเลือดชนิดนี้ที่นิยมใช้ในทางทันตกรรม เช่น Surgicel[®], Gelfoam[®] เป็นต้น

ตาราง 1 แสดงสารห้ามเลือดเฉพาะที่แบบพาสซีฟ (Passive hemostatic agents)

ชนิดสารห้ามเลือด	องค์ประกอบ	กลไกการออกฤทธิ์
1. Microfibrillar collagen; Avitene [®]	Collagen-base products: ผลิตภัณฑ์จากผิวหนังวัว	- โครงสร้างให้เกล็ดเลือดมายึดเกาะและกระตุ้นการทำงานของเกล็ดเลือด ก่อให้เกิด Platelet plug
2. Absorbable collagen; Helistat [®]	Collagen-base products: ผลิตภัณฑ์จากเอ็นวัว	- อุดกั้นเชิงกลในบริเวณที่ได้รับบาดเจ็บ, ส่งเสริมการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด (Platelet aggregation) และทำหน้าที่เป็นโครงร่างเพื่อให้ลิ่มเลือดแข็งแรง
3. Oxidized regenerated cellulose (Surgicel [®])	Cellulose-base product	- โครงสร้างทางกายภาพกระตุ้นให้เกิดการสร้างลิ่มเลือดและการกดทางกลของสารห้ามเลือด (mechanical pressure) - ฤทธิ์เป็นกรด อาจทำให้เกิดปฏิกิริยาอักเสบและการตายของเนื้อเยื่อโดยรอบ
4. ActCel [®] และ Gelitacel [®]	Cellulose-base product	- กระตุ้นการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดและโครงร่างของวัสดุช่วยส่งเสริมให้ลิ่มเลือดมีความแข็งแรง
5. Gelfoam [®] และ Surgifoam [®]	Gelatin-based products; ผลิตภัณฑ์จากผิวหนังหมู	- โครงสร้างให้เกล็ดเลือดเข้ายึดเกาะและก่อให้เกิดการสร้างเส้นใยไฟบริน - สามารถดูดซึมของเหลวได้มากถึง 40 ของน้ำหนัก ทำให้วัสดุกดเนื้อเยื่อโดยรอบและส่งผลต่อการห้ามเลือดได้
6. Polysaccharide hemospheres	Potato starch	- วัสดุพูนในก้อนทรงกลมที่มีคุณสมบัติชอบน้ำ (Hydrophilic) จะดึงดูดของเหลวบริเวณแผลให้แห้ง ก่อให้เกิดการรวมกลุ่มกันของเซลล์เม็ดเลือดแดงและเกล็ดเลือด ส่งผลให้เกิดการห้ามเลือด - สามารถสลายโดย Tissue amylases ภายในเวลา 48 ชั่วโมง - ควรใช้อย่างระมัดระวังในผู้ป่วยโรคเบาหวาน
7. Bone hemostats (Bone wax)	ขี้ผึ้ง (Beewax), พาราฟิน (paraffin) และสารที่ทำให้นุ่ม (softening agents)	- อุดกั้นบริเวณที่เกิดเลือดออก จากคุณสมบัติที่ยืดหยุ่นสามารถเปลี่ยนแปลงรูปร่างได้ - ไม่สามารถสลายตัวได้ ส่งผลขัดขวางต่อการหายของแผลในกระดูก เกิดการสร้างเนื้อเยื่อ granulation และอาจทำให้เกิดการติดเชื้อได้

คุณสมบัติของสารห้ามเลือดแบบแพสซีฟขึ้นอยู่กับความสามารถในการกระตุ้นการทำงานของเกล็ดเลือดโดยมีโครงร่างทางกายภาพที่ช่วยส่งเสริมให้ลิ้มเลือดมีความแข็งแรงมากยิ่งขึ้น แต่จะไม่มีกลไกการทำงานที่เกี่ยวข้องกับ intrinsic coagulation factor ทำให้ผู้ป่วยที่มีความผิดปกติในการแข็งตัวของเลือด (Coagulation cascade) ไม่สามารถใช้สารห้ามเลือดชนิดนี้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

2. สารห้ามเลือดเฉพาะที่แบบเอกทีฟ (Active hemostatic agents)

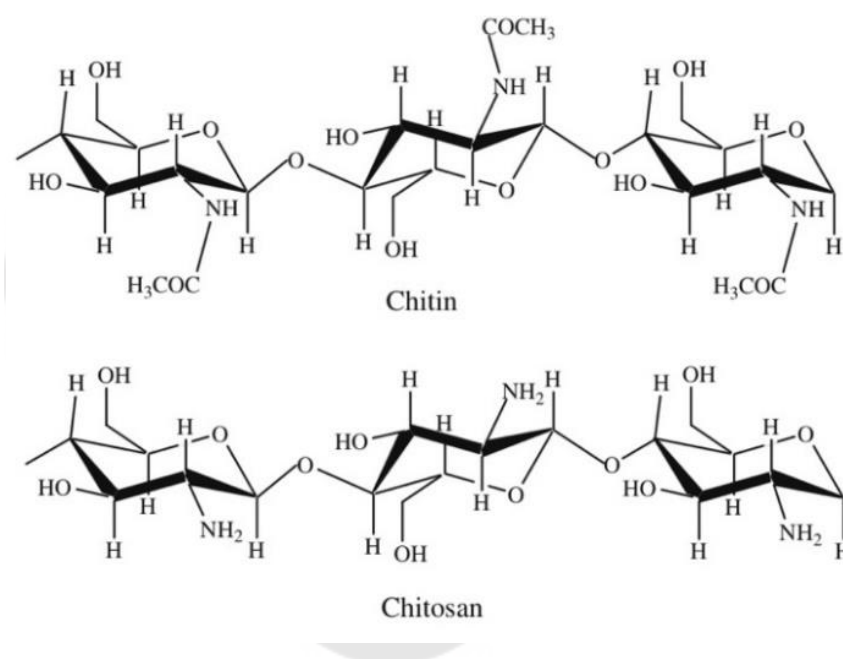
สารห้ามเลือดเฉพาะที่แบบเอกทีฟจะเข้าไปทำงานที่กลไกการแข็งตัวของเลือด (coagulation cascade) โดยตรง เพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดลิ้มเลือดมาอุดบริเวณที่ได้รับบาดเจ็บ สารห้ามเลือดชนิดนี้สามารถใช้ร่วมกับสารห้ามเลือดแบบแพสซีฟ (passive hemostatic agents) เพื่อให้เกิดการห้ามเลือดอย่างมีประสิทธิภาพ ตัวอย่างสารห้ามเลือดชนิดนี้ได้แก่ Thrombin ซึ่งเป็นทางเลือกที่เป็นประโยชน์ต่อผู้ป่วยที่ได้รับบาดเจ็บด้านการแข็งตัวของเลือดหรือบาดเจ็บด้านเกล็ดเลือด เนื่องจากสารห้ามเลือดดังกล่าวมีประสิทธิภาพการห้ามเลือด⁽³²⁾

ตาราง 2 แสดงสารห้ามเลือดเฉพาะที่แบบเอกทีฟ (Active hemostatic agents)

ชนิดสารห้ามเลือด	องค์ประกอบ	กลไกการออกฤทธิ์
1. Thrombin	ผลิตภัณฑ์พลาสมาจากวัวหรือมนุษย์ (Bovine, Human plasma)	-เป็นเอนไซม์ในการตัด fibrinogen ให้เป็น fibrin และก่อให้เกิดการสร้างลิ้มเลือดขึ้น (fibrin clot)
2.Flowable hemostatic agent; FloSeal®	ผลิตภัณฑ์จาก Bovine-derived gelatin granules และ Human-derived thrombin รวมกัน	- gelatin granules จะบวมขึ้นและก่อให้เกิดการแนบสนิทของบาดแผล และส่วนของ thrombin จะไปกระตุ้นการทำงานของ Coagulation cascade เกิดการเปลี่ยน fibrinogen เป็น fibrin ทำให้ลิ้มเลือดมีความแข็งแรง
3.Fibrin sealant (Tisseel®)	Thrombin และ Fibrinogen รวมกัน	- Thrombin จะกระตุ้นให้เกิดการสร้างลิ้มเลือดขึ้น (fibrin clot) จาก fibrinogen
4.สารห้ามเลือดจากไคโตซาน (Chitosan)	ไคติน (Chitin) ที่ดึงหมู่เอซเทิลออก	-ก่อให้เกิดการหดตัวของหลอดเลือด (Vasoconstriction) -ดึงดูดเซลล์ของเซลล์เม็ดเลือดแดง (Erythrocyte) ทำให้เกิดลิ้มเลือดที่ขึ้นเหนียวและยึดติดแน่นบริเวณบาดแผล -เป็นโครงร่างยึดเกาะของเซลล์เม็ดเลือดแดง

สารไคตินและไคโตซาน (Chitin and Chitosan)

ไคติน (Chitin) เป็นสารโพลิแซ็กคาไรด์ (Polysaccharide) จากธรรมชาติที่มีอยู่จำนวนมาก สารชนิดดังกล่าวสามารถพบได้ในโครงร่างของสัตว์จำพวกอาร์โทรพอด (Arthropods) เช่น กุ้ง ปู ปลาหมึก เปลือกของแมลง และผนังเซลล์ของเชื้อรา (Fungi) และยีส (Yeast) ไคตินไม่สามารถละลายในน้ำและตัวทำละลายที่ใช้ทั่วไป จึงเป็นข้อจำกัดในการนำสารดังกล่าวมาใช้งาน ไคโตซาน (Chitosan) สามารถละลายในสารที่เป็นกรดได้ ถูกพัฒนาจากไคตินโดยการดึงหมู่อะซิทิลออก (Deacetylation) จากสายโพลิเมอร์ภายใต้สภาวะที่เป็นด่างแก่หรือการใช้เอนไซม์ในการย่อยสลาย โดยสารทั้ง 2 มีโครงสร้างโมเลกุลดังแสดงในภาพประกอบ 3



ภาพประกอบ 3 แสดงโครงสร้างโมเลกุลของไคตินและไคโตซาน

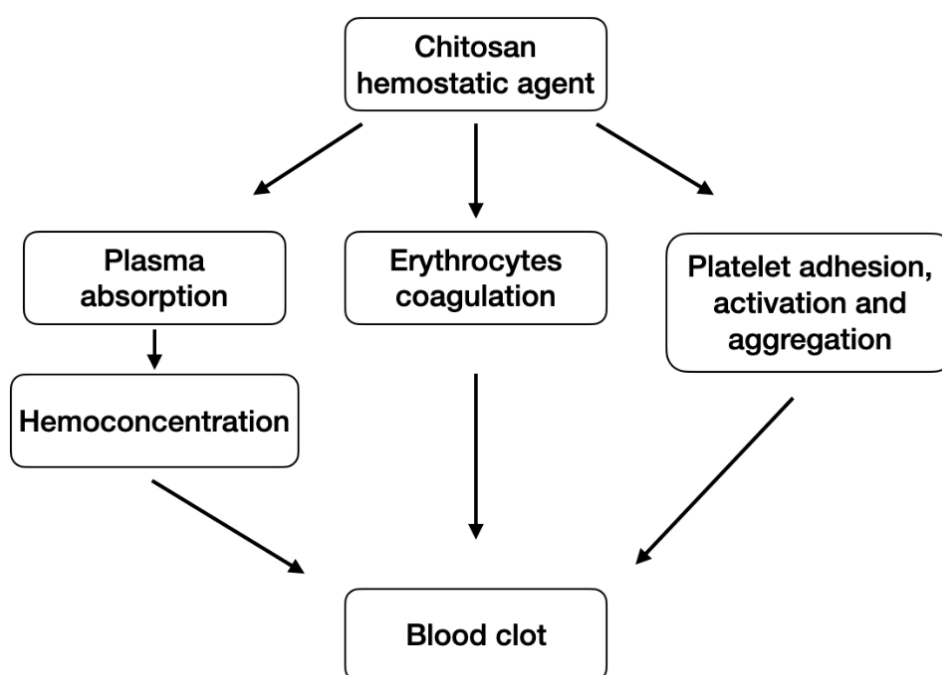
ที่มา: Jayakumar R, Menon D, Manzoor K, Nair SV, Tamura H. Biomedical applications of chitin and chitosan based nanomaterials—A short review. Carbohydrate Polymers. 2010;82(2):227-32.

ไคโตซาน มีคุณสมบัติที่ดีหลายประการ คือ ไม่มีความเป็นพิษ สามารถเข้ากันได้ทางชีวภาพ สามารถสลายได้ตามธรรมชาติ มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย ส่งเสริมการหายของแผล และสามารถห้ามเลือดได้ดี จึงได้ถูกพัฒนาและคิดค้นเพื่อนำมาใช้ประโยชน์ทางการแพทย์หลากหลาย

ด้าน เช่น ด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ (Tissue engineering) มีการพัฒนาโคโตซานเพื่อเป็นโครงเลี้ยงเซลล์ (Scaffolds) แผ่นเนื้อเยื่อ (Membrane) และไฮโดรเจล (Hydrogel) ให้เซลล์สร้างกระดูกสามารถอาศัยอยู่ได้และสร้างเนื้อเยื่อกระดูกขึ้นมาใหม่ในบริเวณที่ต้องการปลูกกระดูก ด้านการนำยาเข้าสู่ร่างกาย (Drug delivery) เนื่องจากโคโตซานสามารถเชื่อมต่อกับ (Conjugating agent) กับสารโมเลกุลเล็กได้ดีและสามารถควบคุมการปล่อยยาได้ จึงมีการศึกษานำยาหลายชนิดมาพัฒนา ร่วมกับโคโตซาน เพื่อนำเข้าสู่ร่างกายให้เฉพาะและเจาะจงตำแหน่งมากขึ้น ด้านวัสดุปิดแผล (Wound dressing) ด้วยคุณสมบัติการส่งเสริมการหายของแผล ให้ความชุ่มชื้น และการต้านเชื้อแบคทีเรียของโคโตซาน⁽³³⁾ จึงได้มีการพัฒนาโคโตซานเป็นวัสดุปิดแผล นอกจากนี้โคโตซานยังถูกนำมาใช้ประโยชน์เป็นสารห้ามเลือดเฉพาะที่ (Local hemostatic agent) ด้วยกลไกการห้ามเลือดของโคโตซานที่มีความจำเพาะ คือ ก่อให้เกิดลิ่มเลือดที่ชั้นหนังของเม็ดเลือดแดงและเกิดการกระตุ้นการทำงานของเกล็ดเลือด ซึ่งกลไกดังกล่าวไม่เกี่ยวข้องกับการทำงานของระบบการแข็งตัวของเลือด (Coagulation cascade) จึงทำให้สารห้ามเลือดจากโคโตซานสามารถห้ามเลือดได้ดีถึงแม้ผู้ป่วยจะมีสภาวะการแข็งตัวของเลือดผิดปกติ⁽³⁴⁾

วัสดุห้ามเลือดจากโคโตซานถูกนำมาใช้งานอย่างยาวนาน ปัจจุบันมีวัสดุห้ามเลือดจากโคโตซานที่ถูกผลิตและจำหน่ายในท้องตลาดจากหลากหลายบริษัท จากการศึกษาในปัจจุบันเชื่อว่าการห้ามเลือดของโคโตซานประกอบด้วย 3 กลไก คือ การดูดซับพลาสมาโปรตีน (Plasma proteins) การเกาะกลุ่มของเซลล์เม็ดเลือดแดง (Erythrocytes coagulation) และการกระตุ้นการทำงานของเกล็ดเลือด โดยเมื่อวัสดุห้ามเลือดโคโตซานสัมผัสที่บาดแผล วัสดุจะดูดซับเลือดทำให้เกิดการรวมตัวกันของพลาสมาโปรตีน (Plasma protein) เช่น ไฟโบรเนกติน (Fibronectin) เซลล์เม็ดเลือดแดง และเกล็ดเลือด เพื่อช่วยห้ามเลือดบริเวณดังกล่าว ทั้งนี้คุณสมบัติการดูดซับเลือดของโคโตซานขึ้นอยู่กับปัจจัยเรื่องน้ำหนักโมเลกุล (Molecular weight) และปริมาณการดัดหมู่อะซิไทลออก (Degree of deacetylation) จากสายโพลิเมอร์โคโตซาน โดยโคโตซานที่มีปริมาณการดัดหมู่อะซิไทลออก (Degree of deacetylation) มากจะทำให้มีคุณสมบัติการดูดซับเลือดที่สูงขึ้น กลไกต่อมาคือ โคโตซานก่อให้เกิดการเกาะกลุ่มกันของเซลล์เม็ดเลือดแดง เนื่องจากโคโตซานมีหมู่อะมีน (Amine group) ที่ให้ประจุบวก เมื่อสัมผัสกับเยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดแดงที่มีประจุลบ จึงทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มกัน (Hemagglutination) ทำให้เลือดบริเวณนั้นชั้นหนืดขึ้น อีกทั้งเส้นใยโพลิเมอร์ของโคโตซานยังส่งผลให้เกิดการยึดติดกันของเม็ดเลือดแดง ทำให้เกิดลักษณะคล้ายลิ่มเลือด (Artificial clot) มาอุดบริเวณบาดแผล⁽³⁵⁾ มีการศึกษาพบว่าโคโตซานที่มีมวลโมเลกุลต่ำ จะส่งผลให้เซลล์เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มกันได้ดีมากขึ้น เนื่องจากปริมาณประจุ

บวกที่เหมาะสมของไคโตซาน⁽³⁶⁾ และกลไกสุดท้าย คือการกระตุ้นเกล็ดเลือดให้มายึดเกาะ (Platelet adhesion) บริเวณที่เป็นบาดแผล และทำหน้าที่กระตุ้นเกล็ดเลือดอื่น (Platelet activation) ให้มารวมตัวกัน (Platelet aggregation) ซึ่งการกระตุ้นเกล็ดเลือดให้มารวมตัวกัน จะเกิดได้จากทั้ง 2 กลไก คือ การดูดซึมพลาสมาโปรตีน (Plasma proteins) ของไคโตซาน และการกระตุ้นเกล็ดเลือดให้แสดงไกลโคโปรตีน (Glycoprotein IIb/IIIa) ที่เยื่อหุ้มเซลล์ของเกล็ดเลือดมากขึ้น^(34, 37) โดยกลไกการห้ามเลือดทั้ง 3 กลไกของวัสดุห้ามเลือดไคโตซานได้แสดงในภาพประกอบ 4



ภาพประกอบ 4 แสดงกลไกการห้ามเลือดของวัสดุห้ามเลือดไคโตซาน

ที่มา: ดัดแปลงจาก Pogorielov MV, Sikora VZ. Chitosan as a hemostatic agent: current state. European Journal of Medicine. 2015;2(1):24-33.

จากคุณสมบัติต่าง ๆ ของไคโตซานที่กล่าวข้างต้น เช่น ความเข้ากันได้ทางชีวภาพ ประสิทธิภาพในการห้ามเลือด และเป็นสารจากธรรมชาติที่มีอยู่เป็นจำนวนมาก ทำให้ปัจจุบันได้มีหลายบริษัทได้ทำการผลิตวัสดุห้ามเลือดไคโตซานออกมาจำหน่ายในท้องตลาด ซึ่งมีองค์ประกอบ

และคุณสมบัติแตกต่างกันออกไป ทั้งนี้ทางคณะผู้วิจัยจึงขอยกตัวอย่างวัสดุห้ามเลือดจากไคโตซาน ดังภาพประกอบ 5

Celox®	Hemcon®	Chitipack S®
Celox-A®	Chitoflex®	Chitipack S&C®
Celox Trauma Gauze®	Chitoseal®	Tegasorb®
Syvek-Patch®	Clo-Sur®	Tegaderm film dressing
BST-CarGel®	QuickClot®	Remedium's Hemogrip™
TraumaStat®	Chitodine®	

ภาพประกอบ 5 แสดงตัวอย่างวัสดุห้ามเลือดจากไคโตซานที่มีวางจำหน่ายในท้องตลาด

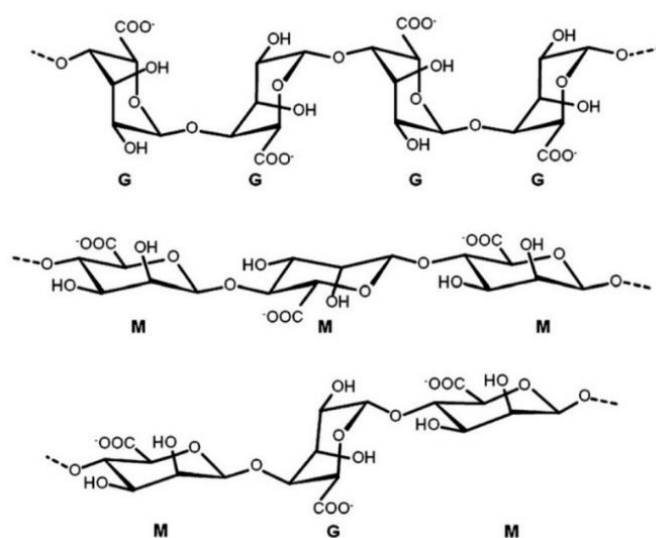
ที่มา: ดัดแปลงจาก Mercy H, Halim A, Hussein A. Chitosan-derivatives as hemostatic agents: Their role in tissue regeneration. Regenerative Research. 2012;1(1):38-46.

แอลจิเนต (Alginate)

แอลจิเนตเป็นสารชีวภาพ (Biomaterial) มีคุณสมบัติเข้ากันได้กับเซลล์ (Biocompatibility) มีความเป็นพิษต่ำ สามารถสลายได้เองตามธรรมชาติมีราคาต่ำ และเมื่อสัมผัสน้ำจะมีลักษณะเป็นเจล (Gelation) ที่มีโครงสร้างคล้ายแมทริกซ์นอกเซลล์ (Extracellular matrix) จึงเป็นวัสดุที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ประโยชน์ในงานวิทยาศาสตร์ชีวการแพทย์ (Biomedical science) และวิศวกรรมเนื้อเยื่อ (Tissue engineering) ในหลากหลายด้าน เช่น

วัสดุปิดแผล (Wound dressing) การนำยาเข้าสู่ร่างกาย (Drug delivery) และการสร้างเนื้อเยื่อใหม่ (Tissue regeneration)

แอลจินตเป็นสารโพลิแซ็กคาไรด์สายยาวที่เกิดจากธรรมชาติ ซึ่งสกัดโดยใช้สารละลายที่มีฤทธิ์เป็นด่าง จากสาหร่ายทะเลสีน้ำตาลหลากหลายสายพันธุ์ ซึ่งสารเคมีส่วนใหญ่ที่ใช้คือ โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) สารสกัดที่ได้จะถูกผสมกับโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) หรือ แคลเซียมคลอไรด์ (CaCl_2) เพื่อให้แอลจินตตกตะกอน เกิดเป็นเส้นใยแอลจินต แอลจินตที่ได้จะถูกนำไปผ่านกรรมวิธีเพื่อให้สารเกิดความบริสุทธิ์ก่อนนำไปใช้งานในรูปโซเดียมแอลจินต (Sodium alginate) หรือแคลเซียมแอลจินต (Calcium alginate) สายโพลิเมอร์ของแอลจินตจะมีประจุลบ ประกอบด้วยโมโนเมอร์ 2 ส่วน คือ L-guluronate (G) และ D-mannuronate (M) และเมื่อพิจารณาจากโคโพลิเมอร์ (Copolymer) ของแอลจินต จะมีการจัดเรียงตัว (Block) 3 แบบ คือ GG block ซึ่งประกอบด้วย L-guluronate (G) MM block ประกอบด้วย D-mannuronate (M) และ MG block ซึ่งประกอบด้วย D-mannuronate (M) และ L-guluronate (G) ดังภาพประกอบ 6



ภาพประกอบ 6 ภาพแสดงโมเลกุลของโมโนเมอร์ L-guluronate (G) และ D-mannuronate (M) ในสารแอลจินต

ที่มา: Qin Y. Alginate fibres: an overview of the production processes and applications in wound management. Polymer international. 2008;57(2):171-80.

จากการที่แอลจินเตสามารถสกัดได้จากสาหร่ายทะเลสีน้ำตาลหลากหลายสายพันธุ์และเป็นสารโพลิเมอร์ที่ประกอบด้วยโมโนเมอร์ 2 ส่วน ทำให้คุณสมบัติทางชีวภาพและทางกายภาพของแอลจินเตขึ้นอยู่กับปัจจัยต่าง ๆ เช่น ฤดูในการเก็บเกี่ยวสาหร่าย⁽³⁸⁾ สัดส่วนระหว่างโมโนเมอร์ทั้ง 2 ชนิดในสายโพลิเมอร์ (M/G ratio) โดยสาหร่ายทะเลต่างสายพันธุ์ จะมีสัดส่วนระหว่างโมโนเมอร์ทั้ง 2 ชนิดที่แตกต่างกัน ลำดับการจัดเรียงโมโนเมอร์ การกระจายตัวของโมโนเมอร์ และน้ำหนักโมเลกุลของแอลจินเต หากแอลจินเตมีน้ำหนักโมเลกุลที่มากขึ้น จะช่วยส่งเสริมให้แอลจินเตมีคุณสมบัติเชิงกลที่ดีขึ้น เช่น เส้นใยของแอลจินเตมีความแข็งแรงขึ้น เป็นต้น⁽³⁹⁾

จากคุณสมบัติการเป็นโพลิเมอร์ที่มีความชอบน้ำของแอลจินเต ทำให้แอลจินเตถูกนำมาใช้ประโยชน์เป็นวัสดุปิดแผล ด้วยหลักการที่แอลจินเตสามารถกักเก็บความชื้นได้ดี จึงทำให้แผลที่ถูกปิดด้วยแอลจินเตมีความชุ่มชื้น และจากคุณสมบัติดังกล่าวยังช่วยดูดซับสารคัดหลั่ง (Exudate) จากบาดแผลไม่ให้มีปริมาณมากจนเกินไป ซึ่งลักษณะดังกล่าวจะช่วยส่งเสริมให้เซลล์เยื่อบุ (Epithelial cell) สามารถเจริญเข้ามาที่แผลและช่วยให้แผลสมานได้เร็วขึ้น นอกจากนี้วัสดุปิดแผลจากแคลเซียมแอลจินเตยังมีคุณสมบัติในการห้ามเลือด โดยการทำงานของแคลเซียมไอออน (Calcium ion) ในวัสดุปิดแผลที่ถูกแลกเปลี่ยนกับโซเดียมไอออน (Sodium ion) จากสารคัดหลั่งหรือเลือดที่บริเวณบาดแผล โดยแคลเซียมไอออนจะส่งเสริมการทำงานของระบบการแข็งตัวของเลือด (Coagulation cascade) เนื่องจากแคลเซียมไอออนเป็นส่วนประกอบหนึ่งของปัจจัยการแข็งตัวของเลือดที่ 4 (Factor IV) และยังทำหน้าที่ช่วยกระตุ้นปัจจัยการแข็งตัวของเลือดที่ 7 9 และ 10 (Factor VII, IX, X) อีกทั้งยังช่วยกระตุ้นเกล็ดเลือดให้หลั่งสารสื่อกลาง เพื่อกระตุ้นการแข็งตัวของเลือดด้วย⁽⁴⁰⁻⁴²⁾ ดังนั้นแคลเซียมแอลจินเตจึงเป็นสารที่มีคุณสมบัติทั้งในด้านการห้ามเลือดและการสมานแผลไปพร้อมกัน

ปัจจุบันมีการนำแคลเซียมแอลจินเตมาใช้ประโยชน์ในการห้ามเลือดและการสมานแผลมากขึ้น และได้มีการผลิตและนำมาจำหน่ายในท้องตลาดในหลากหลายผลิตภัณฑ์⁽⁴³⁾ ทั้งนี้แต่ละผลิตภัณฑ์ต่างมีองค์ประกอบทางเคมีของแอลจินเตที่ต่างกัน ทำให้คุณสมบัติของวัสดุปิดแผลอาจต่างกันออกไป ทั้งนี้การนำวัสดุดังกล่าวมาใช้งาน จึงจำเป็นต้องทราบถึงคุณสมบัติและส่วนประกอบภายในสาร เพื่อที่ได้ใช้ประโยชน์จากวัสดุและสามารถจัดการกับผลข้างเคียงจากการใช้งานวัสดุได้ จากตาราง 4 แสดงตัวอย่างของผลิตภัณฑ์ปิดแผลที่มีส่วนประกอบจากแอลจินเต

ตาราง 3 แสดงตัวอย่างวัสดุปิดแผล (wound dressing) จากแอลจินेटที่มีวางจำหน่ายในท้องตลาด

ผลิตภัณฑ์	ผู้ผลิต
Algisite M	Smith and Nephew medical
Algosterile	Johnson and Johnson
AlgiDERM	Bard
CarraSorb H	Carrington
Curasorb	Kendall
Kaltostat	Convatac
Kalginate	DeRoyal
Kaltogel	Convatac
Comfeel Seasorb	Coloplast
Sorbsan	Maersk medical
Sorbalgon	Hartmann
Tegagen	3M Healthcare

เนื่องจากไคโตซานและแคลเซียมแอลจินेटมีความสมบัติและกลไกการห้ามเลือดที่ดี ทำให้มีการศึกษาเพื่อผสมสารทั้ง 2 ชนิดเข้าด้วยกัน เพื่อพัฒนาวัสดุห้ามเลือดชนิดใหม่ที่มีประสิทธิภาพในการห้ามเลือดมากขึ้น เช่น มีการพัฒนาวัสดุห้ามเลือดในรูปแบบของฟองน้ำที่มีส่วนผสมของไคโตซาน แคลเซียมแอลจินेटและสารสกัดจากพืช *Bletilla striata* พบว่า วัสดุห้ามเลือดชนิดใหม่นี้สามารถส่งเสริมการหยุดของเลือดได้ดีในห้องปฏิบัติการ และมีความสมบัติเข้ากับเซลล์ได้ดี⁽⁴⁴⁾ (Biocompatibility) นอกจากนี้ได้มีการพัฒนาวัสดุห้ามเลือดในรูปแบบไฮโดรเจล (Hydrogel) ที่มีส่วนผสมของไคโตซานที่ผ่านปฏิกิริยา Photocrosslink กับแคลเซียมแอลจินेट พบว่า วัสดุห้ามเลือดดังกล่าวสามารถลดอัตราการตายของสัตว์ทดลองที่มีการสูญเสียเลือดมากได้ และสามารถสลายตัวได้เองตามธรรมชาติ⁽⁴⁵⁾

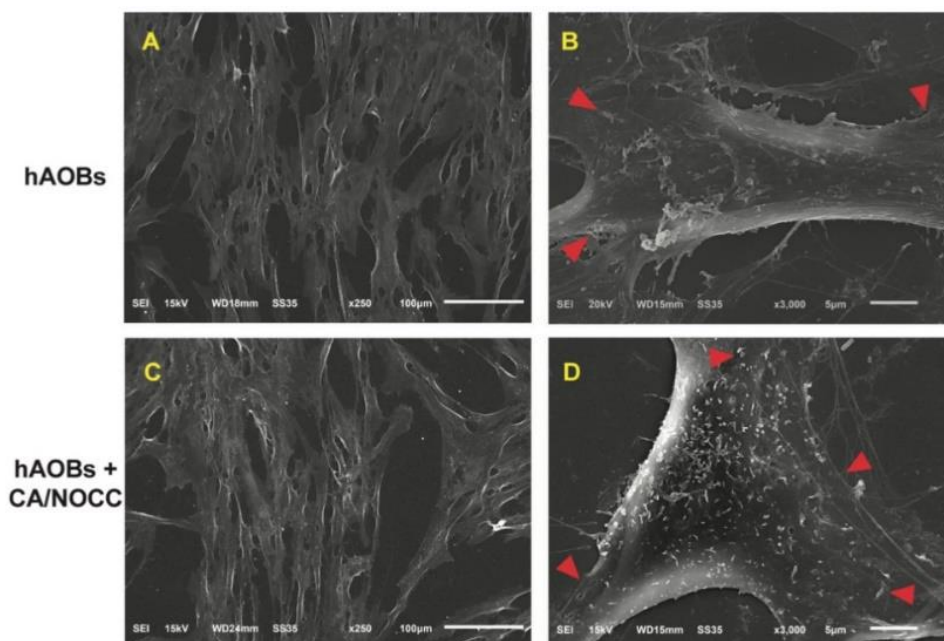
วัสดุห้ามเลือดจากอนุพันธ์ไคโตซาน (Calcium alginate/*N*-O-carboxymethylchitosan; CA/NOCC)

Calcium alginate/*N*-O-carboxymethylchitosan (CA/NOCC) เป็นวัสดุห้ามเลือดจากอนุพันธ์ไคโตซาน ที่ถูกคิดค้นและพัฒนาโดยศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ (MTEC) สารดังกล่าวมีคุณสมบัติที่สามารถละลายน้ำได้ดีและมีประจุลบจากหมู่คาร์บอกซิล (Carboxyl functional group) ซึ่งคล้ายกับประจุลบบนพื้นผิวของซับเอนโดทีเลียมคอลลาเจน (subendothelial collagen) ที่ผนังของหลอดเลือด คุณสมบัติดังกล่าวช่วยส่งเสริมให้เกิดการห้ามเลือด คือ กระตุ้นการทำงานของ clotting factor เช่น clotting factor XII ผ่านกระบวนการ contact activation ทำให้เริ่มการทำงานของระบบ coagulation cascade ส่งผลให้เกิดการสร้างไฟบริน (Fibrin) ได้รวดเร็วขึ้น นอกจากนี้ยังเกิดการกระตุ้นการทำงานของเกล็ดเลือด โดยประจุลบบนสารห้ามเลือด CA/NOCC ทำให้พลาสมาโปรตีน (Plasma protein) เช่น ไฟบริโนเจน (Fibrinogen) และไฟโบรเนคติน (Fibronectin) ยึดเกาะกับพื้นผิวของซับเอนโดทีเลียมคอลลาเจนได้เร็วขึ้น ส่งผลให้เกิดการกระตุ้นเกล็ดเลือดให้สามารถยึดเกาะบริเวณพื้นผิวของซับเอนโดทีเลียมคอลลาเจนได้อย่างรวดเร็วและส่งเสริมให้เกิดการสร้าง Thrombus ในขั้นตอนต่อไป⁽²¹⁾

จากคุณสมบัติการห้ามเลือดที่ดีของวัสดุ CA/NOCC ที่ก่อให้เกิดการห้ามเลือดจากการกระตุ้นการทำงานของเกล็ดเลือดและการทำงานของกลไกการห้ามเลือด (Coagulation cascade) ถือได้ว่าสารห้ามเลือดชนิดดังกล่าวมีคุณสมบัติในการห้ามเลือดทั้งในขั้น primary hemostasis และ secondary hemostasis จึงส่งผลให้เกิดการห้ามเลือดที่มีประสิทธิภาพ ช่วยลดปัญหาการสูญเสียเลือดทั้งระหว่างและหลังการผ่าตัด การเกิดผลการรักษาที่มีคุณภาพยิ่งขึ้น นอกจากนี้วัสดุ CA/NOCC ยังได้ผ่านการทดสอบอื่นๆ ที่บ่งบอกถึงประสิทธิภาพในการห้ามเลือดและความปลอดภัยในการใช้งาน เช่น การทดสอบประสิทธิภาพการห้ามเลือดในห้องปฏิบัติการ พบว่า วัสดุ CA/NOCC สามารถก่อให้เกิดการแข็งตัวของเลือดได้เร็วกว่ากลุ่มควบคุม และสามารถกระตุ้นการยึดเกาะและทำงานของเกล็ดเลือดได้อย่างมีประสิทธิภาพ^(22, 23) และในระดับสัตว์ทดลอง พบว่า วัสดุ CA/NOCC สามารถหยุดเลือดจากการผ่าตัดทางหนู Wistar ได้รวดเร็วเร็วกว่ากลุ่มทดสอบอื่น ส่งผลให้ปริมาณการสูญเสียเลือดน้อยกว่ากลุ่มทดสอบอื่น⁽²²⁾ การทดสอบความเข้ากันได้กับเซลล์ไลน์ไฟโบรบลาสต์ L-929 และเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากผิวหนังมนุษย์ (Normal human dermal fibroblasts) ในวัสดุ CA/NOCC หลายสัดส่วน และการทดสอบการสลายตัวของวัสดุในห้องปฏิบัติการ พบว่า วัสดุ CA/NOCC ในสัดส่วนต่าง ๆ มีความเข้ากันได้กับเซลล์ไลน์ไฟโบรบลาสต์ L-929^(24, 25) และเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากผิวหนังมนุษย์⁽²⁵⁾ โดยเซลล์ทั้ง 2 ชนิด มีพื้นฐานวิทยา ความมีชีวิตและความสามารถในการเพิ่มจำนวนเซลล์ได้ตามปกติ และ

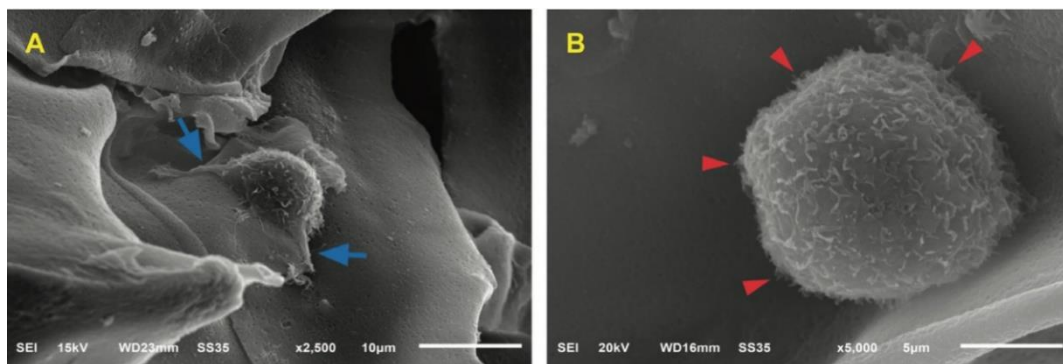
การสลายตัวของวัสดุ CA/NOCC ในห้องปฏิบัติการ พบว่า วัสดุ CA/NOCC สามารถสลายตัวได้ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ชาโลน (Phosphate buffered saline; PBS) และสารละลาย PBS ที่มีส่วนผสมของ 1 mg/ml Lysozyme และยังพบว่าหากวัสดุ CA/NOCC มีสัดส่วนของ NOCC มากจะทำให้วัสดุสลายตัวได้เร็วขึ้น⁽²⁵⁾ นอกจากนี้วัสดุ CA/NOCC ยังผ่านการทดสอบประสิทธิภาพในการห้ามเลือดในมนุษย์ พบว่า วัสดุ CA/NOCC สามารถห้ามเลือดในบริเวณที่ได้รับการผ่าตัดเพื่อรักษาผิวหนังชนิด Split-thickness skin graft ได้อย่างมีประสิทธิภาพ⁽²⁶⁾ การทดสอบความระคายเคือง (Irritation) และภาวะภูมิไวเกิน (Hypersensitivity) ต่อผิวหนังมนุษย์ของวัสดุ CA/NOCC ทั้ง 2 ชนิด คือ ชนิดที่ใช้ภายในร่างกายและชนิดใช้ภายนอกในร่างกาย พบว่า วัสดุ CA/NOCC ทั้ง 2 ชนิด ไม่ก่อให้เกิดการระคายเคืองและภาวะภูมิไวเกินต่อผิวหนังมนุษย์ จากการทดสอบทั้งหมด 72 ชั่วโมง^(27, 28) และการทดสอบความสามารถในการสลายตัวอย่างสมบูรณ์ พบว่า วัสดุ CA/NOCC ชนิดที่ใช้ภายในร่างกาย สามารถสลายตัวได้ในร่างกายมนุษย์ภายในระยะเวลา 3 เดือน และจากการศึกษาชิ้นเนื้อทางจุลพยาธิวิทยา พบว่า เนื้อเยื่อบริเวณที่ฝังวัสดุ CA/NOCC ไม่พบการตกค้างของวัสดุ และไม่เกิดปฏิกิริยาการอักเสบหรือการต่อต้านสิ่งแปลกปลอม^(27, 46) จากการศึกษาที่กล่าวมาข้างต้นจะเห็นว่าวัสดุ CA/NOCC มีประสิทธิภาพในการห้ามเลือดและมีความปลอดภัยในการใช้งาน สามารถนำมาใช้ห้ามเลือดในมนุษย์ได้

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาความเป็นพิษของวัสดุ CA/NOCC ต่อเซลล์ในช่องปากมนุษย์ในปี 2020 Pheawphala และคณะ⁽²⁹⁾ ได้ทำการศึกษาความเป็นพิษของวัสดุ CA/NOCC ต่อเซลล์สร้างกระดูกจากขากรรไกรมนุษย์ (Primary human alveolar osteoblasts: hAOBs) พบว่า วัสดุ CA/NOCC ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์สร้างกระดูกจากมนุษย์ โดยสัญญาณวิทยาของเซลล์ที่ทดสอบร่วมกับวัสดุห้ามเลือด มีลักษณะไม่เปลี่ยนแปลงไปจากกลุ่มควบคุม ดังแสดงในภาพประกอบ 7 และ 8 อีกทั้งเซลล์สร้างกระดูกยังสามารถมีชีวิตและเพิ่มจำนวนเซลล์ได้ไม่ต่างจากกลุ่มควบคุม ซึ่งแสดงให้เห็นว่าวัสดุห้ามเลือดดังกล่าวมีความเข้ากันได้กับเซลล์สร้างกระดูกจากมนุษย์



ภาพประกอบ 7 ภาพ SEM แสดงสัณฐานวิทยาของเซลล์สร้างกระดูกจากชากรวไกรมมนุษย์บนกระจกกันใส (Cover slip) ในกลุ่มควบคุม (hAOBs) และกลุ่มทดสอบที่เลี้ยงร่วมกับวัสดุห้ามเลือด CA/NOCC (hAOBs+CA/NOCC) (ลูกศรสีแดง แสดงโครงร่างของเซลล์ (Lamellipodia) ที่ยื่นมาเกาะกระจกกันใส)

ที่มา: Phaewphala K, Kosorn W, Janvikul W, Kittrueangphatchara K, Sricholpech M. Biocompatibility of a Chitosan-derived Hemostatic Agent with Human Alveolar Osteoblasts. M Dent J. 2020;40(3):277-88.



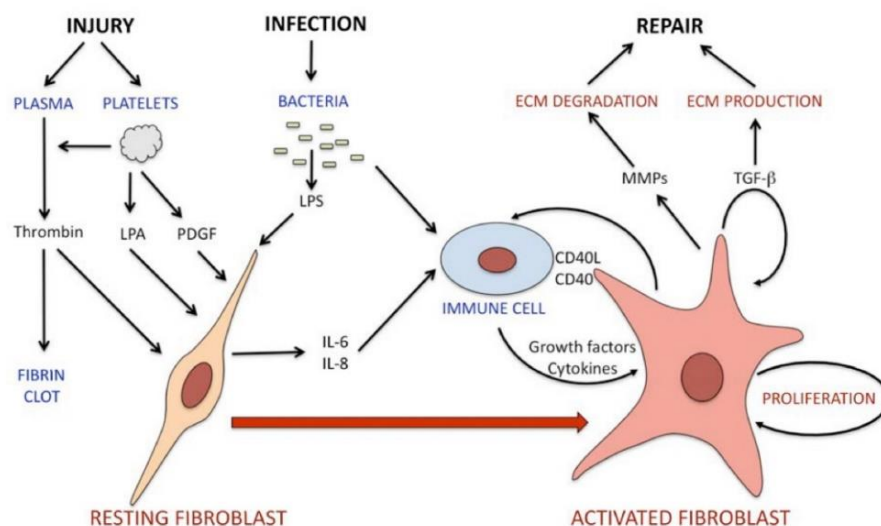
ภาพประกอบ 8 ภาพ SEM แสดงสัณฐานวิทยาของเซลล์สร้างกระดูกจากขากรรไกรมนุษย์บนผิววัสดุห้ามเลือด CA/NOCC (ลูกศรสีฟ้า แสดงโครงสร้างขนาดเล็กที่ยื่นออกจากเซลล์ (Filopodia) ลูกศรสีแดง แสดงไฟบริลขนาดเล็ก (Fibrils) บนเยื่อหุ้มเซลล์)

ที่มา: Phaewphala K, Kosorn W, Janvikul W, Kittrueangphatchara K, Sricholpech

M. Biocompatibility of a Chitosan-derived Hemostatic Agent with Human Alveolar

Osteoblasts. M Dent J. 2020;40(3):277-88.

หน้าที่ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เนื้อเยื่อเหงือก (Functions of gingival fibroblast)



ภาพประกอบ 9 หน้าที่ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เนื้อเยื่อเหงือก
(Functions of gingival fibroblast)

ที่มา: Chiquet M.(2015) Multiple functions of gingival and mucoperiosteal fibroblasts in oral wound healing and repair. Periodontology 2000. P. 21.

หน้าที่ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เนื้อเยื่อเหงือก (Functions of gingival fibroblast)⁽⁴⁷⁾

เซลล์ไฟโบรบลาสต์ (fibroblasts) เป็นเซลล์ที่มีต้นกำเนิดมาจากเนื้อเยื่อชั้นมีเซนไคม์ (Mesenchyme) และทำหน้าที่สร้างสารองค์ประกอบภายนอกเซลล์ (Extracellular matrix) ในเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (Connective tissue) ซึ่งเป็นส่วนสำคัญในกระบวนการหายและซ่อมแซมของแผล ปัจจุบันพบว่าเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่มาจากเนื้อเยื่อแตกต่างกัน จะมีคุณสมบัติของเซลล์ที่แตกต่างกันอย่างชัดเจน ซึ่งในที่นี้จะกล่าวเฉพาะหน้าที่ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เนื้อเยื่อเหงือกในช่องปากของมนุษย์ (Human gingival fibroblast: HGF) เท่านั้น

เซลล์ไฟโบรบลาสต์เนื้อเยื่อเหงือกในช่องปากของมนุษย์ (Human gingival fibroblast: HGF) มีความพิเศษต่างจากเซลล์ไฟโบรบลาสต์อื่น ๆ ในร่างกาย คือ เป็นเซลล์ที่มีต้นกำเนิดมาจากเนื้อเยื่อชั้นเอกโตมีเซนไคม์ (Ectomesenchyme) ที่พัฒนามาจากนิวรัล เครสต์ (Neural crest) ต่างจากเซลล์ไฟโบรบลาสต์อื่น ๆ ในร่างกายที่มีต้นกำเนิดมาจากเนื้อเยื่อชั้นมีโซเดิร์ม

หน้าที่หลักและมีความสำคัญของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในกระบวนการหายของแผล คือ การผลิตสารองค์ประกอบภายนอกเซลล์ (Extracellular matrix) เพื่อการซ่อมแซมเนื้อเยื่อที่ได้รับความเสียหาย อย่างไรก็ตามในภาวะปกติของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน เซลล์ไฟโบรบลาสต์จะทำหน้าที่เหมือนเซลล์ที่นอนหลับ (Sleeper cells) มีการแบ่งตัวและสังเคราะห์สารที่ช้า (low mitotic and biosynthetic activity) ซึ่งเซลล์ไฟโบรบลาสต์จะผลิตสารองค์ประกอบภายนอกเซลล์ (Extracellular matrix) ใหม่มันจะต้องได้รับการกระตุ้นจากสิ่งกระตุ้นภายนอก นั่นคือ การกระตุ้นจากเกล็ดเลือดซึ่งถูกกระตุ้นให้ออกมาจากการเกิดบาดแผล ผ่านการทำงานของโกรทแฟคเตอร์ (Growth factors) ชนิดต่าง ๆ เช่น platelet-derived growth factor-BB (PDGF-BB), transforming growth factor- β (TGF- β), insulin-like growth factor-I (IGF-I), epidermal growth factor (EGF), basic fibroblast growth factors (bFGF) ผ่านสารตัวกลาง (Mediators) ชนิดต่างๆ เช่น lysophosphatidic acid, protease like urokinase-type plasminogen activator และผ่านไซโตไคน์ (Cytokine) เช่น platelet factor-4 เป็นต้น โดยสารองค์ประกอบภายนอกเซลล์ (Extracellular matrix) ส่วนใหญ่ที่ถูกสร้างขึ้นในกระบวนการหายของบาดแผลช่วงแรก คือ เส้นใยคอลลาเจน ชนิดที่ 3 (Collagen type III) และเส้นใยคอลลาเจนชนิดอื่นๆ รวมทั้งสารจำพวก fibronectin, tenascin-C ซึ่งมีส่วนช่วยในการยึดติดของเซลล์ต่างๆ และการเคลื่อนที่ของเซลล์ (Cell adhesion and cell migration) และสารจำพวก hyaluronic acid และ proteoglycans ที่มีส่วนช่วยเรื่องการกักเก็บน้ำในเนื้อเยื่อ และเมื่อกระบวนการหายของแผลดำเนินไป เซลล์ไฟโบรบลาสต์จะทำหน้าที่ปรับเปลี่ยนรูปร่าง (Remodeling) ของสารองค์ประกอบภายนอกเซลล์ (Extracellular matrix) ให้มีความแน่นและคงทนมากยิ่งขึ้น มีการสร้างหลอดเลือดที่น้อยลง และส่วนประกอบของสารองค์ประกอบภายนอกเซลล์ (Extracellular matrix) จะถูกปรับเปลี่ยนให้มีเส้นใยคอลลาเจน ชนิดที่ 1 (Collagen type I) เป็นส่วนใหญ่ และตามด้วยเส้นใยคอลลาเจน ชนิดที่ 5 (Collagen type V) และจะพบเส้นใยคอลลาเจน ชนิดที่ 3 (Collagen type III) น้อยลง

เซลล์ไฟโบรบลาสต์ยังทำหน้าที่เสมือนยาม (Sentinel cells) คอยดูแลความเรียบร้อยและสมดุลของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน อีกทั้งยังเป็นเซลล์กลุ่มแรกๆ ที่ตอบสนองต่อการบาดเจ็บและการติดเชื้อของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน โดยหลังจากที่เนื้อเยื่อเกี่ยวพันได้รับบาดเจ็บและมีการทำลายของหลอดเลือด

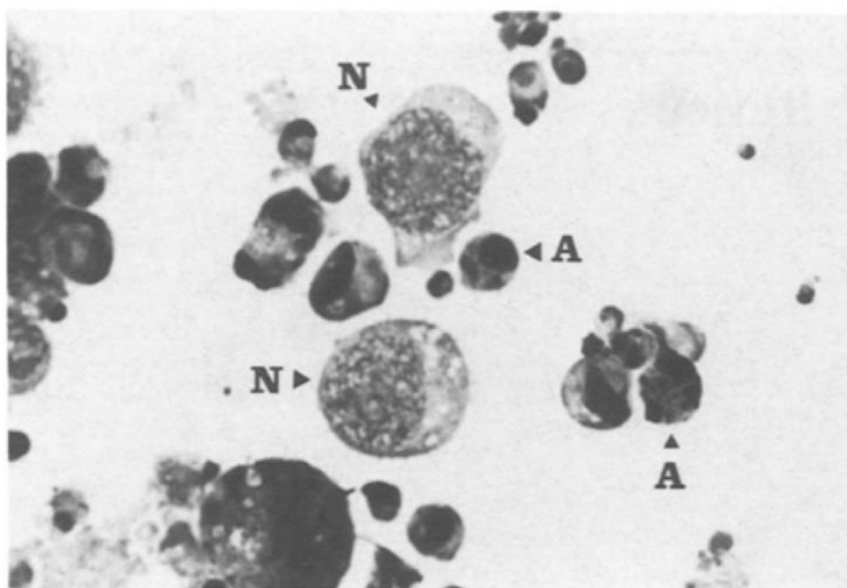
เลือด เกล็ดเลือดจะเข้ามาทำหน้าที่ห้ามเลือดและปล่อยสารต่างๆ คือ โกรทแฟคเตอร์ (Growth factors) และไซโตไคน์ (Cytokines) สารดังกล่าวจะทำหน้าที่กระตุ้นเซลล์ภูมิคุ้มกัน (Immune cells) และเซลล์ไฟโบรบลาสต์ให้ทำงานโดยตรง โดยเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ถูกกระตุ้นจะหลั่งสารไซโตไคน์ (Cytokines) เพิ่มเติมคือ Interleukin-6 (IL-6) และ Interleukin-8 (IL-8) เพื่อเรียกเซลล์ Neutrophils เข้ามาบริเวณแผล และในกรณีที่มีการติดเชื้อ ผลิตภัณฑ์จากแบคทีเรียและสารจำพวก Lipopolysaccharide (LPS) ที่ได้จากผนังของเซลล์ของแบคทีเรีย (Cell wall) จะเป็นตัวกระตุ้นให้เซลล์ไฟโบรบลาสต์หลั่งสารไซโตไคน์ (Cytokines) คือ IL-6 และ IL-8 เช่นเดียวกัน การสื่อสารที่ซับซ้อนระหว่างเซลล์ไฟโบรบลาสต์และเซลล์ภูมิคุ้มกัน (Immune cells) จะทำให้สามารถควบคุมกระบวนการอักเสบและส่งเสริมให้เกิดกระบวนการหายของแผลในเนื้อเยื่อได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยเฉพาะการสื่อสารระหว่างเซลล์ที่ผ่านกระบวนการสัมผัสกันโดยตรง (Direct cell to cell contacts) โดยผ่าน CD40 ที่ผิวของเซลล์ไฟโบรบลาสต์กับ CD40-L บนผิวของเซลล์ภูมิคุ้มกัน

นอกจากนี้เซลล์ไฟโบรบลาสต์ยังทำหน้าที่ในกระบวนการการหายของแผล ในขั้นตอนการหดตัวของบาดแผล ทำให้ขอบแผลมีขนาดเล็กลง โดยเซลล์ไฟโบรบลาสต์จะเปลี่ยนรูปร่างและหน้าที่เป็นเซลล์ไมโอไฟโบรบลาสต์ (Myofibroblasts) ซึ่งจะมีแขนรอบเซลล์สำหรับหดตัว ยื่นออกจากตัวเซลล์ และมีการเพิ่มของสาร α -smooth muscle actin ภายในเซลล์ โดยกระบวนการนี้จะถูกกระตุ้นโดยสาร mediators เช่น lysophosphatidic acid และ thrombin ซึ่ง lysophosphatidic acid จะทำหน้าที่ไปกระตุ้น actin ให้มารวมตัวกันภายในเซลล์และเกิดการหดตัว ส่งผลให้ขอบแผลเริ่มกระบวนการหดตัว และ thrombin จะส่งเสริมการเจริญเติบโตของเซลล์ไฟโบรบลาสต์และกระตุ้นให้เกิดการหดตัวของเส้นใยคอลลาเจน (Collagen lattices) นอกจากนี้ยังมีโกรทแฟคเตอร์ (Growth factors) อีกหลายชนิดที่หลั่งโดยเซลล์ไฟโบรบลาสต์และทำหน้าที่ควบคุมกระบวนการดังกล่าว เช่น platelet-derived growth factor, transforming growth factor- β , insulin-like growth factor-I และ insulin-like growth factor-II

สัณฐานวิทยาของเซลล์ตาย

การตายของเซลล์ (Cell death) คือ การเสื่อมสภาพของเซลล์ที่ไม่สามารถกลับคืนสู่สภาพปกติได้ ประกอบด้วย 2 รูปแบบ⁽⁴⁸⁾ คือ การตายของเซลล์อย่างเป็นระบบ (Apoptosis) คือ กระบวนการตายของเซลล์ที่ถูกควบคุมโดยพันธุกรรมของเซลล์ (Programmed cell death) เป็นการตายตามสภาวะการทำงานปกติของร่างกาย (Physiologic functions) เพื่อรักษาสมดุลภายในร่างกาย (Homeostatic functions) และการตายของเซลล์โดยทั่วไป (Necrosis) ซึ่งเกิดจากพยาธิวิทยาของเซลล์ (Pathologic form) เช่น เกิดจากกระบวนการต่อต้านสิ่งแปลกปลอม หรือการที่เซลล์ได้รับอันตรายจากสารพิษ สิ่งกระตุ้นและสภาวะต่าง ๆ จำนวนมากสามารถก่อให้เกิดการตายของเซลล์ได้ แต่ชนิดของเซลล์ที่ต่างกันจะตอบสนองต่อการตายของสิ่งกระตุ้นหรือสภาวะที่ต่างกัน เช่น สาร Corticosteroids จะส่งผลให้เกิดการตายของเซลล์ Thymocytes แต่เซลล์อื่น ๆ จะไม่ได้รับผลกระทบจากสารนี้⁽⁴⁹⁾ ณ ที่นี้จะเป็นการศึกษาสัณฐานวิทยาของเซลล์ตายภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Light microscope) และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope: SEM) เพื่อให้ทราบถึงลักษณะเซลล์ตายที่มีการเปลี่ยนแปลงทั้ง 2 รูปแบบ^(48, 50)

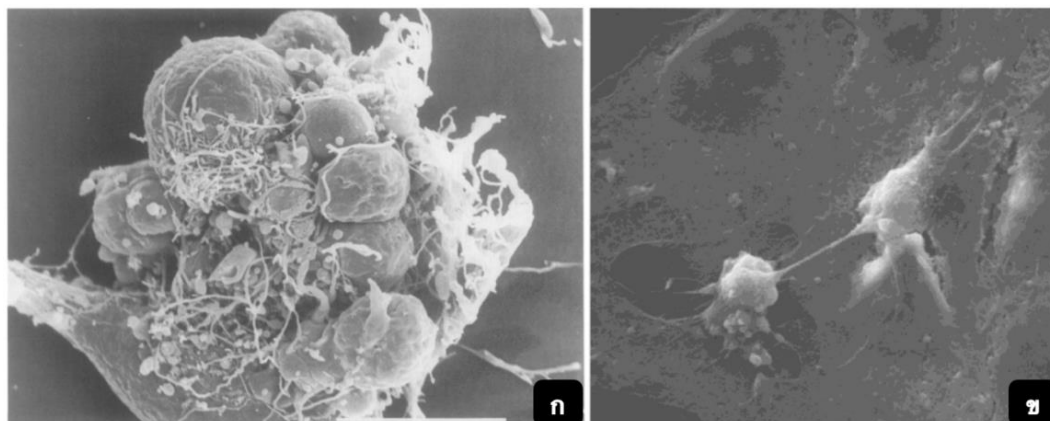
การตายของเซลล์อย่างเป็นระบบ (Apoptosis) เกิดจากการควบคุมของสารพันธุกรรม (Genetically controlled process) ฮอรโมน (Hormones) หรือโกรทแฟคเตอร์ (Growth factors) ที่ส่งสัญญาณไปสู่เซลล์ เมื่อเซลล์เริ่มเข้าสู่กระบวนการตาย (Apoptosis) ลักษณะแรกที่พบการเปลี่ยนแปลง คือ การรวมตัวของโครมาติน (Condensation of chromatin) ซึ่งมีรูปร่างพระจันทร์ครึ่งเสี้ยว (Crescent) มีสีเข้ม และอยู่ที่ขอบของเยื่อหุ้มนิวเคลียส ดังแสดงในภาพประกอบ 10



ภาพประกอบ 10 แสดงสัณฐานวิทยาของเซลล์ไลน์ HL-60 (Human leukemia cell) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (light microscope) เมื่อได้รับสารเคมีและพบการตายเซลล์ทั้งแบบ apoptosis และ necrosis (A: apoptosis, N: necrosis)

ที่มา: Samali A, Gorman AM, Cotter TG. Apoptosis-the story so far. *Experientia*. 1996;52(10):933-41.

เซลล์มีการหดตัว (Shrinkage) ซึ่งเกิดขึ้นแทบทันทีหลังจากที่นิวเคลียสของเซลล์มีการเปลี่ยนแปลง เนื่องจากความผิดปกติของระบบขนส่งไอออนที่เยื่อหุ้มเซลล์ ($\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-Cl}^-$ cotransporter system) ทำให้ของเหลวภายในเซลล์ออกนอกเซลล์จากการหดตัวของเซลล์ทำให้เซลล์ที่อยู่ใกล้กันไม่สัมผัสกัน เซลล์มีขนาดเล็กลง แต่มีลักษณะอัดแน่นมากขึ้น การเปลี่ยนแปลงที่เยื่อหุ้มเซลล์ไม่พบไมโครวิลไล (Microvilli) และพบการบวมออกของเยื่อหุ้มเซลล์ (Blebbing) เซลล์ที่หดตัวจะเริ่มมีการบิดตัวและมีการกระตุกตัวของเยื่อหุ้มเซลล์ (Pinch) เพื่อปิดรูเยื่อหุ้มเซลล์ที่แตกออก ดังภาพประกอบ 11



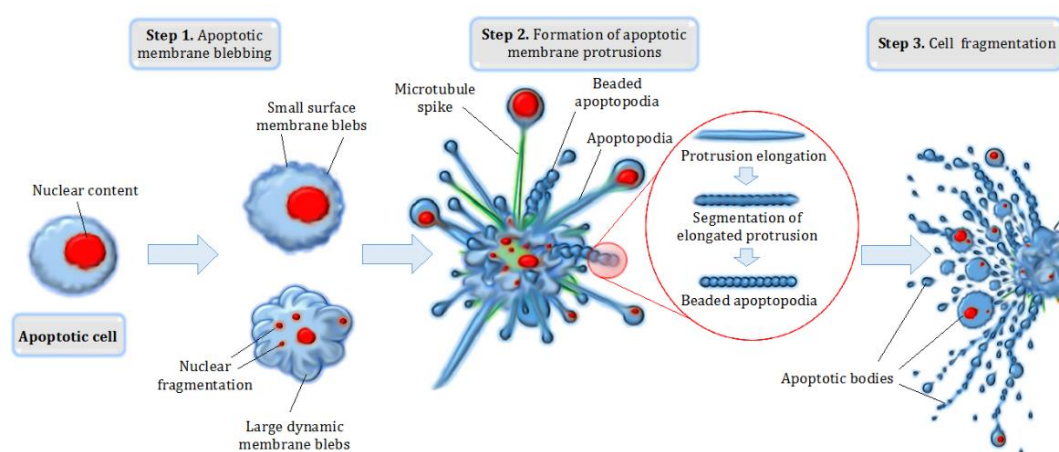
ภาพประกอบ 11 ก แสดงสัณฐานวิทยาของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบจากหลอดเลือดเอออร์ตามนุษย์ (Human arotic smooth muscle cell) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope: SEM) พบลักษณะการบวมออกของเยื่อหุ้มเซลล์ (Blebbing) ข แสดงสัณฐานวิทยาของเซลล์ไลน์ไฟโบรบลาสต์หนู rat-1/myc-ER ภายใต้กล้อง SEM พบลักษณะการบวมของของเยื่อหุ้มเซลล์ (Blebbing)

ที่มา ก: Allen RT, Hunter WJ, Agrawal DK. Morphological and biochemical characterization and analysis of apoptosis. Journal of Pharmacological and Toxicological Methods. 1997;37(4):215-28.

ที่มา ข: Formigli L, Papucci L, Tani A, Schiavone N, Tempestini A, Orlandini G, et al. Aponecrosis: morphological and biochemical exploration of a syncretic process of cell death sharing apoptosis and necrosis. Journal of cellular physiology. 2000;182(1):41-9.

นิวเคลียสของเซลล์จะแตกออกเป็นชิ้นของโครมาตินที่อัดแน่นอยู่ภายในเยื่อหุ้มนิวเคลียส เมื่อกระบวนการตายของเซลล์ดำเนินต่อไป การบวมของเยื่อหุ้มเซลล์ จะมีขนาดใหญ่ขึ้น มีรูปทรงไข่หรือกลม แยกออกมาจากตัวเซลล์ ภายในประกอบด้วยชิ้นส่วนของนิวเคลียสที่แตกออก

(Nuclear fragments) ซึ่งเรียกลักษณะเช่นนี้ว่า Apoptotic bodies ดังภาพประกอบ 12 ซึ่งในช่วงแรก Apoptotic bodies ถือเป็นโครงสร้างที่ยังไม่เกิดการแตกออก (Intact structures) ทำให้การย้อมสีเซลล์ (Vital dyes) ไม่สามารถย้อมสี Apoptotic bodies ได้ แต่เมื่อเวลาผ่านไปเยื่อหุ้มเซลล์จะแตก (Membrane rupture) สีย้อมเซลล์ก็จะสามารถซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้ เหตุการณ์ดังกล่าวที่เกิดขึ้นกับ Apoptotic bodies เรียกว่า Secondary necrosis⁽⁵⁰⁾



ภาพประกอบ 12 แสดงลักษณะของ Blebings และ Apoptotic bodies

ที่มา: https://en.wikiversity.org/wiki/WikiJournal_of_Medicine/Cell_disassembly_during_apoptosis#cite_note-fn1-1

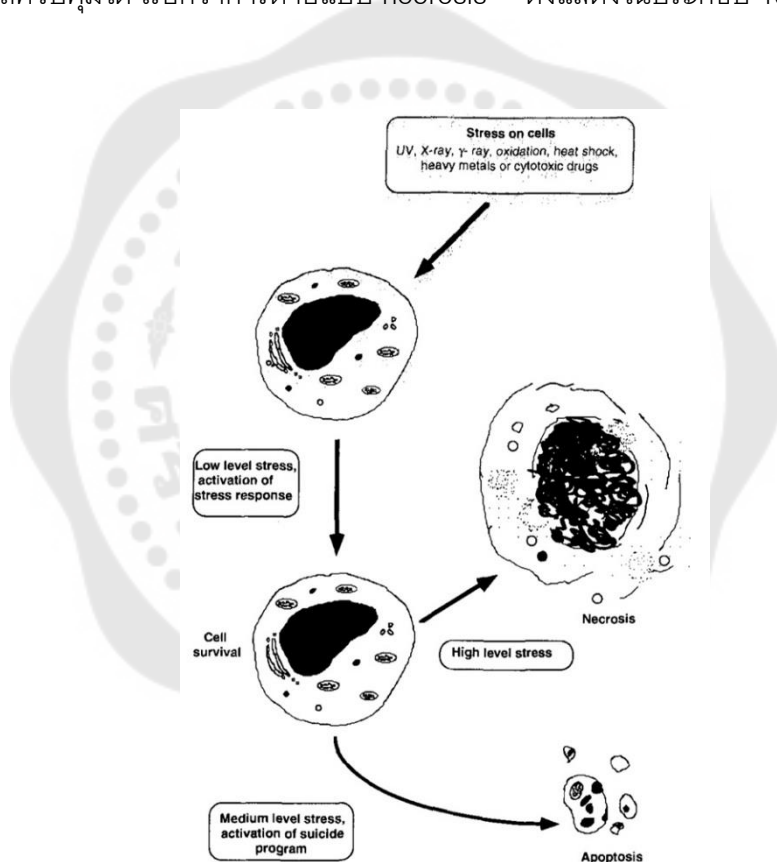
การตายของเซลล์โดยทั่วไป (Necrosis) เกิดจากพยาธิสภาพของเซลล์หรือเซลล์ได้รับอันตรายจากสิ่งกระตุ้นภายนอก ส่วนมากมักเกิดขึ้นพร้อมกันเป็นกลุ่มเซลล์ และจะกระตุ้นกระบวนการอักเสบของร่างกาย การพร่องพลังงาน (ATP depletion) ภายในเซลล์เป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้เซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลงสัณฐานวิทยา นอกจากนี้การเพิ่มปริมาณของแคลเซียมไอออน (Ca^{2+}) ภายในของเหลวภายในเซลล์ (Cytosol) จะส่งผลให้เกิดการสลายตัวของฟอสโฟลิพิด (Phospholipid) และโปรตีนโครงสร้างของเซลล์ (Cytoskeletal protein) นอกเหนือจากการทำงานของเอนไซม์ฟอสโฟลิเพส (Phospholipases) และโปรติเอส (Proteases)^(48, 50) การตายของเซลล์แบบ necrosis มีลักษณะเด่น คือ การทำลายความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ขาดคุณสมบัติการเป็นเยื่อเลือกผ่าน (Selective membrane permeability) ทำให้เซลล์มีลักษณะบวม (Swelling) ซึ่งต่างจากการตายของเซลล์แบบ apoptosis

ที่เซลล์มีลักษณะหดตัว หลังจากนั้นจะเกิดการสลายตัวของออร์แกเนลล์ ลักษณะของโครมาตินภายในนิวเคลียสมีการอัดแน่น ขนาดเล็ก รูปร่างไม่เป็นระเบียบ และมีขอบไม่ชัดเจน เมื่อเซลล์บวมมากขึ้นเยื่อหุ้มเซลล์จะแตกออก (Cell lysis) เกิดการปลดปล่อยองค์ประกอบภายในเซลล์สู่แมทริกซ์นอกเซลล์ (Extracellular matrix) ซึ่งองค์ประกอบของเซลล์ตายที่ถูกปลดปล่อยออกมาจะส่งผลให้เกิดการตายของเซลล์อื่นต่อไป นอกจากนี้ยังกระตุ้นให้เกิดกระบวนการอักเสบที่บริเวณดังกล่าวด้วย (Inflammatory response) จากตาราง 4 ได้เปรียบเทียบลักษณะการตายของเซลล์ทั้ง 2 รูปแบบ⁽⁵⁰⁾

ตาราง 4 แสดงลักษณะต่าง ๆ ของเซลล์ในกระบวนการตายของเซลล์

	การตายของเซลล์แบบapoptosis	การตายของเซลล์แบบnecrosis
ลักษณะการเกิด	เกิดแบบกระจาย หรือพบเป็นเซลล์เดี่ยว	เกิดพร้อมกันเป็นกลุ่ม เนื้อเยื่อมีการถูกทำลาย
ไซโตรพลาสซึม	หดตัว (Shrinkage) มีการสูญเสียของเหลวภายในเซลล์ เซลล์อัดแน่น	บวมออก (swelling) ออร์แกเนลล์มีการบวมออก
นิวเคลียส	พบการอัดแน่นของโครมาติน อยู่ที่ขอบของเยื่อหุ้มนิวเคลียส ต่อมานิวเคลียสจะแตกออกเป็นชิ้นเล็ก (fragments)	โครมาตินมีขนาดเล็ก กลางนิวเคลียสมีขอบไม่ชัดเจน ต่อมาพบการสลายตัวของนิวเคลียส (lysed)
เยื่อหุ้มเซลล์	มีการบวมออกของเยื่อหุ้มเซลล์ (blebbing)	พบการสลายตัวของเยื่อหุ้มเซลล์ และการรั่วออกขององค์ประกอบภายในเซลล์
การสลายตัวของดีเอ็นเอ (DNA breakdown)	เกิดผ่านการกระตุ้นของสารพันธุกรรม (gene activation)	เกิดผ่านกระบวนการย่อยสลาย (degradation)
การตอบสนองของเนื้อเยื่อ	ไม่กระตุ้นกระบวนการอักเสบ	กระตุ้นกระบวนการอักเสบ

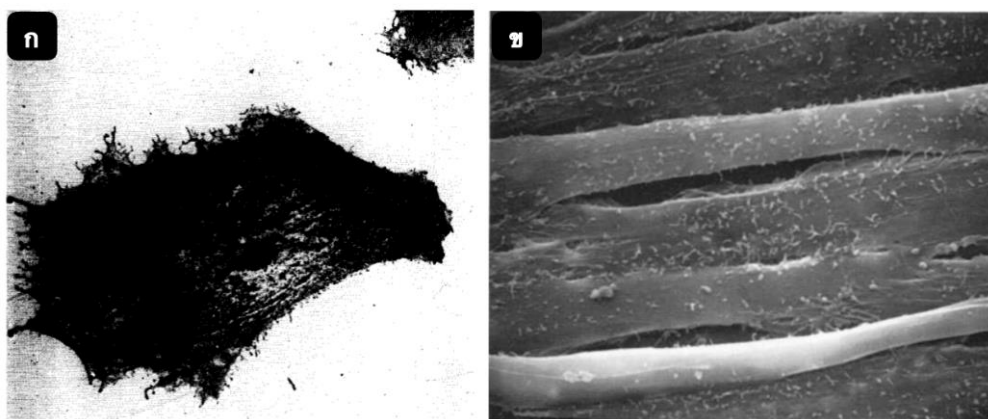
จากการตายของเซลล์ ทั้งรูปแบบของ apoptosis และ necrosis ปัจจัยที่ส่งเสริมให้เกิดกระบวนการดังกล่าว คือ ชนิดของสิ่งกระตุ้น (Type) และความรุนแรง (Intensity) เมื่อเซลล์ได้รับสิ่งกระตุ้นที่มีความรุนแรงต่ำ เซลล์จะมีความสามารถในการปรับตัวเพื่อให้มีชีวิตรอดในสภาวะใหม่ แต่หากชนิดและความรุนแรงของสิ่งกระตุ้นมีมากขึ้น เซลล์จะเกิดกระบวนการตายโดยการกระตุ้นจากสารภายในเซลล์เอง (Apoptosis) เพื่อตอบสนองต่อสารพิษ และถ้าสิ่งกระตุ้นนั้นมีความรุนแรงมากขึ้นอีกหรือสิ่งกระตุ้นนั้นมีการทำลายเซลล์อย่างรุนแรงฉับพลัน เซลล์จะไม่สามารถปรับตัวได้ทันในการหลั่งสารสั่งให้เซลล์ตนเองตาย ทำให้เกิดการตายของเซลล์แบบที่เซลล์ไม่สามารถควบคุมได้ เรียกว่าการตายแบบ necrosis⁽⁴⁸⁾ ดังแสดงในประกอบ 13



ภาพประกอบ 13 แสดงปัจจัยเรื่องความรุนแรงของสารพิษที่มีผลต่อการตายของเซลล์

ที่มา: Samali A, Gorman AM, Cotter TG. Apoptosis-the story so far. *Experientia*. 1996;52(10):933-41.

การเปลี่ยนแปลงสัณฐานวิทยาของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เมื่อได้รับสารพิษ (Morphological cell changes due to chemical toxicity)⁽⁵¹⁾ โดยทั่วไปเซลล์ไฟโบรบลาสต์จะมีลักษณะแบนยาว มีการแผ่เป็นรูปสี่เหลี่ยมหรือสามเหลี่ยมอยู่ที่พื้นจานเลี้ยงเซลล์⁽⁵²⁾ ดังแสดงในประกอบ 14



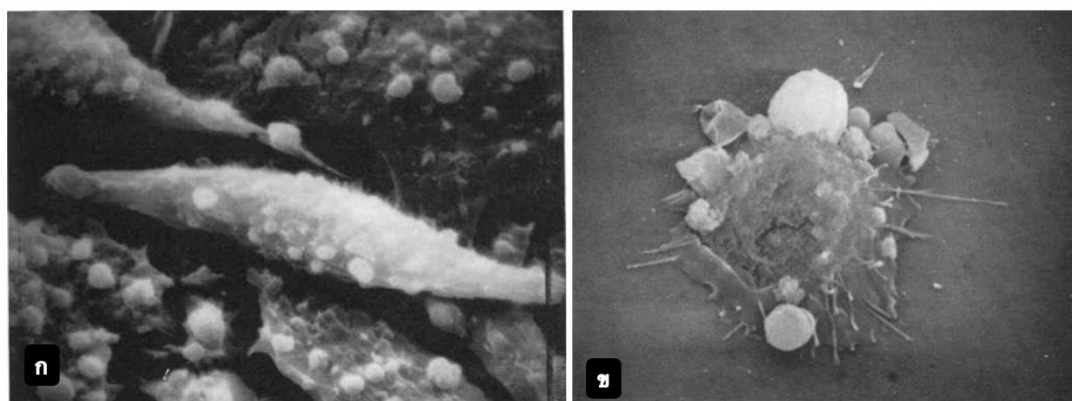
ภาพประกอบ 14 ภาพ SEM ก แสดงสัณฐานวิทยาของเซลล์ไลน์ไฟโบรบลาสต์ (HF 19: human fetal lung fibroblast) ข แสดงสัณฐานวิทยาของเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากเอ็นยึดปริทันต์มนุษย์ (Human PDL fibroblast) ที่ถูกเลี้ยงภายใต้สภาวะปกติ

ที่มา ก: Al-Nazhan S, Spangberg L. Morphological cell changes due to chemical toxicity of a dental material: An electron microscopic study on human periodontal ligament fibroblasts and L929 cells. Journal of Endodontics. 1990;16(3):129-34.

ที่มา ข: Hunter A, Archer CW, Walker PS, Blunn GW. Attachment and proliferation of osteoblasts and fibroblasts on biomaterials for orthopaedic use. Biomaterials. 1995;16(4):287-95.

แต่เมื่อเซลล์ได้รับสารพิษ ลักษณะรูปร่างของเซลล์จะเกิดการเปลี่ยนแปลงเพื่อตอบสนองต่อสภาวะที่เปลี่ยนไป โดยลักษณะที่พบได้บ่อย คือ เซลล์มีการหดตัวเป็นทรงกลมหรือรี มีการยื่นโครงร่างที่สั้นลง มีการแยกตัว (Cell detachment) ออกจากพื้นจานเลี้ยงเซลล์ ทำให้โครงร่างเซลล์ไม่มีการสัมผัสกันกับเซลล์ข้างเคียง และเมื่อเซลล์ได้รับสารพิษที่นานขึ้นหรือสารพิษมีความเข้มข้น

มากขึ้น เยื่อหุ้มเซลล์จะมีการบวมออก (Blebbing) ซึ่งเป็นลักษณะการกำจัดสารพิษออกจากเซลล์ ดังแสดงในภาพประกอบ 15 และหากเซลล์ยังคงอยู่ในสารพิษและไม่สามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาวะใหม่ได้ จะส่งผลให้เซลล์ตายในที่สุด



ภาพประกอบ 15 ก ภาพ SEM แสดงสัณฐานวิทยาของเซลล์ไลน์ไฟโบรบลาสต์ L-929 เมื่อได้รับสารพิษ เซลล์ยังคงรูปร่างทรงกระสวย แต่พบการบวมออกของเยื่อหุ้มเซลล์(Blebbing)
 ข ภาพ SEM แสดงสัณฐานวิทยาของเซลล์ไลน์ไฟโบรบลาสต์ L-929 เมื่อได้รับสารพิษ เซลล์มีลักษณะหดกลมและมีการบวมออกของเยื่อหุ้มเซลล์(Blebbing)

ที่มา: Al-Nazhan S, Spangberg L. Morphological cell changes due to chemical toxicity of a dental material: An electron microscopic study on human periodontal ligament fibroblasts and L929 cells. Journal of Endodontics. 1990;16(3):129-34.

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

ในการวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยได้ดำเนินงานตามขั้นตอนดังนี้

1. การกำหนดประชากรและการเลือกกลุ่มตัวอย่าง
2. ขั้นตอนการทดลอง
3. การเก็บรวบรวมข้อมูล
4. สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

การกำหนดประชากรและการเลือกกลุ่มตัวอย่าง

ประชากร

เซลล์ไฟโบร بلاสต์เนื้อเยื่อเหงือกที่ผ่านการคัดแยกมาจากเนื้อเยื่อเหงือก จากผู้ที่ให้ความยินยอมตนและเก็บไว้ในคลังเก็บเซลล์ ซึ่งได้รับการรับรองจากคณะกรรมการจริยธรรม สำหรับพิจารณาโครงการวิจัยที่ทำในมนุษย์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เลขที่ SWUEC-154/2562X

การเลือกกลุ่มตัวอย่าง

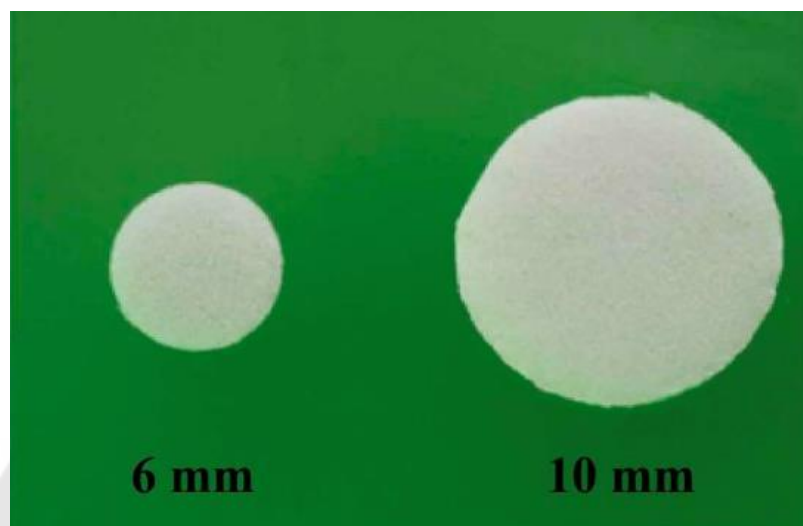
เลือกเซลล์ไฟโบร بلاสต์เนื้อเยื่อเหงือกโดยการสุ่ม 3-5 เซลล์ไลน์ (Cell line) เลือกเซลล์ที่เพาะเลี้ยงได้ในรุ่นที่ 3-8

ขั้นตอนการทดลอง

1. การเตรียมวัสดุห้ามเลือดจากอนุพันธ์โคโตซาน (CA/NOCC)

วัสดุห้ามเลือดจากอนุพันธ์โคโตซาน (CA/NOCC) ได้รับการอนุเคราะห์จากศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ (National metal and materials technology center: MTEC) ซึ่งมีวิธีการเตรียม ดังนี้ เทสารละลายคาร์บอกซีเมทิลโคโตซานร้อยละ 2.5 (น้ำหนัก/ปริมาตร) (2.5% N, O-Carboxymethyl Chitosan: NOCC) ปริมาณ 0.5 กรัม และโซเดียมแอลจีเนต (Sodium Alginate: SA) ปริมาณ 2.0 กรัม ในน้ำ 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายที่ผสมแล้วเทลงแบบหล่อ (Mold) และนำสารละลายไปแช่แข็งและทำให้แห้งด้วยเครื่องฟรีซไดรรายเออร์ (Freeze dryer) จะได้วัสดุมีลักษณะเป็นแผ่นคล้ายฟองน้ำ จากนั้นนำวัสดุมาแช่ในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ (Calcium chloride 10% wt.) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากการแช่วัสดุในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ตัววัสดุจะเกิดการแลกเปลี่ยนไอออน (Ion) ระหว่างโซเดียมไอออน (Na^+) ในโซเดียมแอลจีเนต กับแคลเซียมไอออน (Ca^{2+}) ในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ เกิดเป็นวัสดุที่มีองค์ประกอบของแคลเซียมแอลจีเนตและคาร์บอกซีเมทิลโคโตซานในสัดส่วน 80 ต่อ 20 โดย

น้ำหนักร (80/20: CA/NOCC) จากนั้นทำความสะอาดวัสดุด้วยน้ำสะอาดและทำให้แห้งอีกครั้งด้วยเครื่องฟรีซดรายเออร์ นำวัสดุที่ได้มาตัดเป็นชิ้นตามการใช้งาน คือ ตัดเป็นวงกลมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร และ 10 มิลลิเมตรหนา 1 มิลลิเมตร และนำวัสดุไปอบฆ่าเชื้อโดยวิธีการอบแก๊สเอทิลีนออกไซด์ (Ethylene oxide) และนำไปใช้งาน



ภาพประกอบ 16 แสดงวัสดุห้ามเลือดจากอนุพันธ์โคโคซาน (CA/NOCC) ขนาด 6 และ 10 มิลลิเมตร

2. การเพาะเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์เนื้อเยื่อเหงือก

ทำการเก็บเซลล์ไฟโบรบลาสต์เนื้อเยื่อเหงือกจากเนื้อเยื่อเหงือก (Gingival tissue) บริเวณฟันกรามแท้ซี่ที่ 3 ที่ปราศจากฟันผุ การอักเสบและการติดเชื้อ ซึ่งได้รับการผ่าตัดนำฟันออก ในผู้ป่วยที่มีร่างกายแข็งแรง ไม่มีโรคประจำตัว ที่คลินิกศัลยกรรมช่องปาก ชั้น 4 คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ภายใต้ความยินยอมของผู้ป่วย โดยเนื้อเยื่อเหงือกจะถูกตัดออกมาจากเหงือกที่อยู่บริเวณคอฟันและเหงือกส่วนเกินหลังจากทำการเย็บปิดแผล จากนั้นนำเนื้อเยื่อเหงือกที่ได้มาล้างด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลาไลน์ (Phosphate buffered saline; PBS) จำนวน 2 ครั้ง แล้วนำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็ม (DMEM; Dulbecco Modified Eagle's Medium high glucose) ที่มีฟีทาลโบวายซีรัม ร้อยละ 10 (10% Fetal Bovine Serum; FBS), กลูตามีน 2 มิลลิโมลาร์ (2 mM L-Glutamine), เพนนิซิลลิน 100IU ต่อมิลลิลิตร (100 IU Penicillin), สเตรปโตมัยซิน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (100µg/ml

Streptomycin) และแอมโฟเทอริซิน บี 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (5 µg/ml Amphotericin B) ภายใต้ตู้บัพที่มีความชื้นและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 (5% CO₂) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส การขยายจำนวนเซลล์จะทำการถ่ายเซลล์ (Subculture) ที่เจริญเต็มจานเลี้ยงเซลล์สู่จานเลี้ยงเซลล์ใหม่ในอัตราส่วน 1:5 โดยใช้เอนไซม์ทริปซิน-อีดีทีเอร้อยละ 0.25 (0.25% Trypsin-EDTA)

3. การศึกษาสัณฐานวิทยาของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เนื้อเยื่อเหงือกด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope: SEM)

จุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope: SEM)

การศึกษาสัณฐานวิทยาของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เนื้อเยื่อเหงือกด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope: SEM) หลังจากที่ได้เลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์เนื้อเยื่อเหงือกเพียงอย่างเดียวและร่วมกับวัสดุห้ามเลือดจากอนุพันธ์โคโตซาน (CA/NOCC) โดยตรง (GF+CN) โดยกลุ่มควบคุม (Control) คือกลุ่มที่เลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์เนื้อเยื่อเหงือกกับอาหารเลี้ยงเซลล์เพียงอย่างเดียว และทำการทดสอบใน 2 ช่วงเวลา คือ วันที่ 3 และ 7 โดยมีขั้นตอนโดยย่อ ดังนี้ แยกเซลล์ไฟโบรบลาสต์เนื้อเยื่อเหงือกออกจากกันโดยใช้เอนไซม์ทริปซิน-อีดีทีเอ ร้อยละ 0.25 (0.25% Trypsin-EDTA) วางกระจกกันไส (Cover slip) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 13 มิลลิเมตร ลงในหลุมที่จะหว่านเซลล์ไฟโบรบลาสต์เนื้อเยื่อเหงือก ในกลุ่มการทดสอบ GF+CN ให้วางวัสดุทดสอบขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 10 มิลลิเมตรหนา 1 มิลลิเมตร ลงบนกระจกกันไสในจานเลี้ยงเซลล์ก่อนการหว่านเซลล์ลงในจานเลี้ยงเซลล์ จากนั้นนับจำนวนเซลล์ และหว่านลงในจานเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุม โดยแต่ละหลุมจะมีจำนวนเซลล์เท่ากับ 6×10^4 เซลล์ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM/10% FBS ปริมาณ 1,000 ไมโครลิตร ทำการทดสอบ 2 ชุดการทดสอบ ตามระยะเวลาที่นำเซลล์มาศึกษาสัณฐานวิทยา คือ ศึกษาสัณฐานวิทยาเซลล์ไฟโบรบลาสต์เนื้อเยื่อเหงือกที่ผ่านการเลี้ยงร่วมกับวัสดุ CA/NOCC โดยตรง ในวันที่ 3 และวันที่ 7 จากนั้นนำจานเลี้ยงเซลล์เข้าตู้บัพที่มีความชื้นและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 (5% CO₂) ที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในชุดการทดสอบวันที่ 7 ทำการเลี้ยงและเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ จำนวน 2 ครั้งต่อสัปดาห์ เมื่อครบกำหนดวันทดสอบ นำเซลล์ไฟโบรบลาสต์เนื้อเยื่อเหงือกมาล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลาไลน์ (Phosphate buffered saline; PBS) จำนวน 2 ครั้ง จากนั้นทำการคงสภาพ (Primary fixation) เซลล์ที่อยู่บนแผ่นกระจกกันไสด้วยกลูตารัลดีไฮด์ในน้ำกลั่น ร้อยละ 2.5 (2.5% Glutaraldehyde) แช่ไว้ 4 ชั่วโมง ณ อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลาไลน์ จำนวน 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที ตามด้วยการทำให้ชิ้นงานเกิดการคายน้ำ (Dehydration) ด้วยเอทานอล (Gradient ethanol) ที่ค่อย ๆ เพิ่ม

ความเข้มข้นจากร้อยละ 25, 50, 75 และ 100 ปริมาณ 500 ไมโครลิตร ขึ้นตอนละ 10 นาที ตามลำดับ จากนั้นทำให้ตัวอย่างแห้งด้วยสารเคมี เฮกซะเมธิลไดไซลาเซน (Hexamethyldisilazane: HDMS) โดยเติมสารเคมีนี้ให้พอท่วมชิ้นตัวอย่าง แห้งไว้ในตู้ดูดควัน (Fume hood) ที่อุณหภูมิห้อง จนชิ้นตัวอย่างแห้งสนิท แล้วนำไปเคลือบทองด้วยเครื่องเคลือบอัตโนมัติ (Auto fine coater) จากนั้นนำชิ้นตัวอย่างไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope: SEM) ถ่ายรูปและนำมาวิเคราะห์ลักษณะของเซลล์ไฟโบร بلاสที่เนื้อเยื่อเหงือกและวัสดุ CA/NOCC ตามระยะเวลาที่ทำการทดสอบ

4. การทดสอบความมีชีวิตของเซลล์และอัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์ไฟโบร บลาสที่เนื้อเยื่อเหงือก

การทดสอบความมีชีวิตและอัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์ของเซลล์ไฟโบร بلاสที่เนื้อเยื่อเหงือก หลังจากที่ได้เลี้ยงเซลล์ไฟโบร بلاสที่เนื้อเยื่อเหงือกเพียงอย่างเดียวและร่วมกับวัสดุห้ามเลือดจากอนุพันธ์โคโดซาน (CA/NOCC) ทั้ง 2 สภาวะ คือ การเลี้ยงเซลล์แบบสัมผัสกับวัสดุ CA/NOCC โดยตรง (GF+CN) และเลี้ยงกับสารสกัด (Extract) จากวัสดุ CA/NOCC ในอาหารเลี้ยงเซลล์ (GF+CNE) โดยกลุ่มควบคุม (Control) คือกลุ่มที่เลี้ยงเซลล์ไฟโบร بلاสที่เนื้อเยื่อเหงือกกับอาหารเลี้ยงเซลล์เพียงอย่างเดียว การเตรียมสารสกัด (Extract) จากวัสดุ CA/NOCC ในอาหารเลี้ยงเซลล์ จะเตรียมในอัตราส่วน อาหารเลี้ยงเซลล์ (Culture medium) 1 มิลลิเมตร ต่อ วัสดุ CA/NOCC ขนาด 6 มิลลิเมตร จำนวน 1 ชิ้น แล้วนำไปแช่ในตู้บ่มที่มีความชื้นและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ร้อยละ 5 (5% CO₂) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยมีขั้นตอนการทดสอบมีดังนี้ แยกเซลล์ไฟโบร بلاสที่เนื้อเยื่อเหงือกออกจากกันโดยใช้เอนไซม์ทริปซิน-อีดีทีเอ ร้อยละ 0.25 (0.25% Trypsin-EDTA) ในกลุ่มการทดสอบ GF+CN ให้วางวัสดุทดสอบขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร หน้า 1 มิลลิเมตร ลงในจานเลี้ยงเซลล์ก่อนการหว่านเซลล์ลงในจานเลี้ยงเซลล์ จากนั้นนับจำนวนเซลล์ และหว่านลงในจานเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุม โดยแต่ละหลุมจะมีจำนวนเซลล์เท่ากับ 2×10^4 เซลล์ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM/10% FBS ปริมาณ 1,000 ไมโครลิตร ทำการทดลองซ้ำแต่ละกลุ่มการทดสอบจำนวน 2 หลุม และทำการทดสอบ 3 ชุดการทดสอบ ตามระยะเวลาที่นำเซลล์มาทดสอบความมีชีวิตและการเพิ่มจำนวนเซลล์ คือ ทดสอบความมีชีวิตและการเพิ่มจำนวนเซลล์วันที่ 1, 3 และวันที่ 6 จากนั้นนำจานเลี้ยงเซลล์เข้าตู้บ่มที่มีความชื้นและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ร้อยละ 5 (5% CO₂) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์ยึดติดกับจานเลี้ยงเซลล์ ในวันต่อมาให้เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ในกลุ่มการทดสอบ GF+CNE ด้วยสารสกัด (Extract) ที่สกัดจากวัสดุ CA/NOCC ปริมาณ 1,000 ไมโครลิตร ทำการ

วัดความมีชีวิตของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เนื้อเยื่อเหงือกด้วยการทดสอบเอ็มทีที (MTT assay; [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5 Diphenyltetrazoliumbromide]) โดยละลายผงเอ็มทีทีในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลิน (Phosphate buffered saline; PBS) ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วนำสารละลายเอ็มทีทีผสมกับอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็ม (DMEM) ที่ไม่มีซีรัม ในอัตราส่วน 10:100 ไมโครลิตร นำไปเติมลงในหลุมจานเลี้ยงเซลล์ หลุมละ 550 ไมโครลิตร จากนั้นนำเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 นาที หลังจากนั้นดูดสารละลายดังกล่าวออกจากหลุมเลี้ยงเซลล์ เติมนสาร Dimethyl sulfoxide (DMSO) ลงไปในหลุมเลี้ยงเซลล์ หลุมละ 500 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที บนเครื่องเขย่าสารละลาย (Rocking motion) เพื่อละลายผลึกฟอร์มazan แล้วนำไปวัดปริมาณการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร เพื่อประเมินความมีชีวิตของเซลล์ โดยใช้เครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์ (Asys UVM340 Microplate reader) และนำผลการทดสอบมาคำนวณอัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์ และนำมาคำนวณเป็นร้อยละโดยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (% Control) และทำการทดสอบความมีชีวิตและการเพิ่มจำนวนเซลล์ไฟโบรบลาสต์เนื้อเยื่อเหงือกในวันทดสอบที่ 3 และ 6 ด้วย การทดสอบเอ็มทีที (MTT assay) เช่นเดียวกัน⁽⁵³⁾

5. การทดสอบการตายของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เนื้อเยื่อเหงือกด้วยวิธีการย้อมติดสีทริปแพนบลู (Trypan blue exclusion dye)

การทดสอบการตายของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เนื้อเยื่อเหงือกโดยวิธีการย้อมติดสีทริปแพนบลู (Trypan blue exclusion dye) หลังจากที่ได้เลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์เนื้อเยื่อเหงือกเพียงอย่างเดียวและร่วมกับวัสดุห้ามเลือดจากอนุพันธ์โคโคซาน (CA/NOCC) ทั้ง 2 สภาวะ คือ การเลี้ยงเซลล์แบบสัมผัสกับวัสดุ CA/NOCC โดยตรง (GF+CN) และเลี้ยงกับสารสกัด (Extract) ที่สกัดจากวัสดุ CA/NOCC ในอาหารเลี้ยงเซลล์ (GF+CNE) โดยกลุ่มควบคุม (Control) คือ กลุ่มที่เลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์เนื้อเยื่อเหงือกกับอาหารเลี้ยงเซลล์เพียงอย่างเดียว การเตรียมสารสกัด (Extract) จากวัสดุ CA/NOCC ในอาหารเลี้ยงเซลล์ ทำในอัตราส่วนเช่นเดียวกับการทดสอบข้างต้น โดยมีขั้นตอนโดยย่อ ดังนี้ ทำการแยกเซลล์ไฟโบรบลาสต์เนื้อเยื่อเหงือกออกจากกันโดยใช้เอนไซม์ทริปซิน-อีดีทีเอ ร้อยละ 0.25 (0.25% Trypsin-EDTA) ในกลุ่มการทดสอบ GF+CN ให้วางวัสดุทดสอบขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตรหนา 1 มิลลิเมตร ลงในจานเลี้ยงเซลล์ก่อนการหว่านเซลล์ลงในจานเลี้ยงเซลล์ จากนั้นนับจำนวนเซลล์และหว่านลงในจานเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุม โดยแต่ละหลุมมีจำนวนเซลล์ 2×10^4 เซลล์ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM/10% FBS ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร หลังจากนั้นนำจานเลี้ยงเซลล์เข้าตู้อบที่มีความชื้นและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์

ร้อยละ 5 (5% CO₂) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์ยึดติดกับจานเลี้ยงเซลล์ ในวันต่อมาให้เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ในกลุ่มการทดสอบ GF+CNE ด้วยสารสกัด (Extract) ที่สกัดจากวัสดุ CA/NOCC ในอาหารเลี้ยงเซลล์ ปริมาณ 1,000 ไมโครลิตร ทำการเลี้ยงเซลล์และเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ 2 ครั้งต่อสัปดาห์ทั้งกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบ หลังจากเลี้ยงเซลล์เป็นระยะเวลา 14 วัน ให้ทดสอบการตายของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เนื้อเยื่อเหงือกโดยวิธีการย้อมติดสีทริปแพนบลู ดังนี้ ในกลุ่มการทดสอบ GF+CN ให้นำวัสดุ CA/NOCC ออกทิ้ง จากนั้นให้ทำการแยกเซลล์ไฟโบรบลาสต์เนื้อเยื่อเหงือกออกจากกันโดยใช้เอนไซม์ทริปซิน-อีดีทีเอ ร้อยละ 0.25 (0.25% Trypsin-EDTA) ปริมาณ 200 ไมโครลิตร หลังจากเซลล์หลุดออกจากพื้นจานเลี้ยงเซลล์ ให้เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM/10% FBS ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมอาหารเลี้ยงเซลล์ให้เข้ากันแล้วดูดสารละลายเซลล์ใส่หลอดเก็บ (Eppendorf) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำเซลล์ไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (Microcentrifuge) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 5000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 2 นาที จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ส่วนบนออกโดยไม่กระทบกระเทือนเซลล์ที่อยู่ส่วนล่าง ปริมาณ 200 ไมโครลิตร ผสมสารละลายเซลล์ที่เหลือให้เข้ากัน จากนั้นทำการย้อมสีทริปแพนบลู โดยการดูดสารละลายที่มีเซลล์ ปริมาณ 50 ไมโครลิตรและสารสีทริปแพนบลู (0.4% Trypan blue exclusion dye) ปริมาณ 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและรอเป็นเวลา 3 นาที จากนั้นดูดสารละลายเซลล์ที่ผ่านการย้อมติดสี มานับเซลล์ผ่านเครื่องมือนับเซลล์ (Hemocytometer) โดยนับเซลล์จาก 4 ช่องที่มุมของเครื่องมือนับเซลล์ ทำการบันทึกจำนวนเซลล์ทั้งหมดและจำนวนเซลล์ที่ย้อมติดสีฟ้าเข้มของแต่ละกลุ่มการทดสอบ โดยเซลล์ที่ย้อมติดสีฟ้าเข้มหมายถึงเซลล์ตาย และนำมาคำนวณเป็นร้อยละของเซลล์ที่ติดสีฟ้าเข้ม (% Blue cell) ของแต่ละกลุ่ม หลังจากนั้นนำค่าดังกล่าวมาคำนวณเป็นร้อยละเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (% Control)

6. การศึกษาระดับความเข้มข้นของแคลเซียมไอออนในอาหารเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์เนื้อเยื่อเหงือก (Calcium Ion concentration measurement)

การศึกษาระดับความเข้มข้นของแคลเซียมไอออนในอาหารเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์เนื้อเยื่อเหงือก (Culture medium) หลังจากที่ได้เลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์เนื้อเยื่อเหงือกเพียงอย่างเดียวและร่วมกับวัสดุห้ามเลือดจากอนุพันธ์โคโตซาน (CA/NOCC) โดยตรง (GF+CN) นอกจากนี้ได้การศึกษาระดับความเข้มข้นของแคลเซียมไอออนในสารสกัดจากวัสดุ CA/NOCC ในอาหารเลี้ยงเซลล์ โดยปราศจากการเลี้ยงเซลล์ (CNE) โดยทำการเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ในวันที่ 1, 3 และ 6 หลังการเลี้ยงเซลล์ เพื่อนำไปทดสอบระดับความเข้มข้นของแคลเซียมไอออน โดยมีขั้นตอนโดยย่อ ดังนี้ แยกเซลล์ไฟโบรบลาสต์เนื้อเยื่อเหงือกออกจากกันโดยใช้เอนไซม์ทริปซิน-อีดีทีเอ ร้อยละ

0.25 (0.25% Trypsin-EDTA) วางวัสดุ CA/NOCC ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร หน้า 1 มิลลิเมตรลงในจานเลี้ยงเซลล์ก่อนการหว่านเซลล์ ในกลุ่มทดสอบ GF+CN ส่วนในกลุ่มทดสอบ CNE ให้วางวัสดุ CA/NOCC ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร หน้า 1 มิลลิเมตรลงในจานเลี้ยงเซลล์เพียงอย่างเดียว ไม่ต้องหว่านเซลล์ จากนั้นนับจำนวนเซลล์ และหว่านลงในจานเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุม โดยแต่ละหลุมจะมีจำนวนเซลล์เท่ากับ 2×10^4 เซลล์ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM/10% FBS ปริมาณ 1,000 ไมโครลิตร หลังจากนั้นนำจานเลี้ยงเซลล์เข้าตู้อบที่มีความชื้นและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ร้อยละ 5 (5% CO₂) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์ยึดติดกับจานเลี้ยงเซลล์ ทำการเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ (Culture medium) ตามวันที่กำหนด คือ วันที่ 1, 3 และ 6 แล้วนำมาวิเคราะห์ระดับความเข้มข้นของแคลเซียมไอออนในอาหารเลี้ยงเซลล์ ผ่านชุดทดสอบระดับความเข้มข้นของแคลเซียมไอออน (QuantiChrom Calcium assay kit) โดยนำอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาณ 5 ไมโครลิตร ของแต่ละการทดสอบหยดลงจานเลี้ยงเซลล์แบบ 96 หลุม และเติมสารทำปฏิกิริยาในชุดทดสอบปริมาณ 200 ไมโครลิตร เขย่าเบา ๆ ให้เข้ากัน รอเป็นเวลา 3 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปวัดปริมาณการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 612 นาโนเมตร เพื่อประเมินระดับความเข้มข้นของแคลเซียมไอออน โดยเครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์ (Asys UVM340 Microplate reader) และทำการทดสอบระดับความเข้มข้นของแคลเซียมไอออนในอาหารเลี้ยงเซลล์ในวันทดสอบที่ 3 และ 6 เช่นเดียวกัน

การเก็บรวบรวมข้อมูล

1. ประเมินและวิเคราะห์พื้นฐานวิทยาของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เนื้อเยื่อเหงือก จากการส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope: SEM)
2. ประเมินความมีชีวิตและอัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เนื้อเยื่อเหงือก จากปริมาณการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร ในการทดสอบเอ็มทีที (MTT assay)
3. ประเมินการตายของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เนื้อเยื่อเหงือก จากการย้อมสีด้วยสีทริปแพนบลู (Trypan Blue dye exclusion test)
4. ประเมินระดับความเข้มข้นของแคลเซียมไอออน จากปริมาณการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 612 นาโนเมตร จากการทดสอบผ่านชุดวัดระดับความเข้มข้นของแคลเซียมไอออน (Calcium assay kit)

สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้โปรแกรม GraphPad Prism 8.4.0 ในระบบปฏิบัติการวินโดวส์ (Windows) ทำการทดสอบการแจกแจงปกติ (Normality test) โดยใช้ Shapiro-Wilk Test และใช้ One-way ANOVA วิเคราะห์ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานระหว่างกลุ่มตัวอย่าง ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยทำการทดลองซ้ำอย่างน้อย 5 ครั้ง เพื่อแสดงถึงความสามารถในการทำซ้ำ (Reproducibility) และความถูกต้องในการแปลผลการทดลอง



บทที่ 4

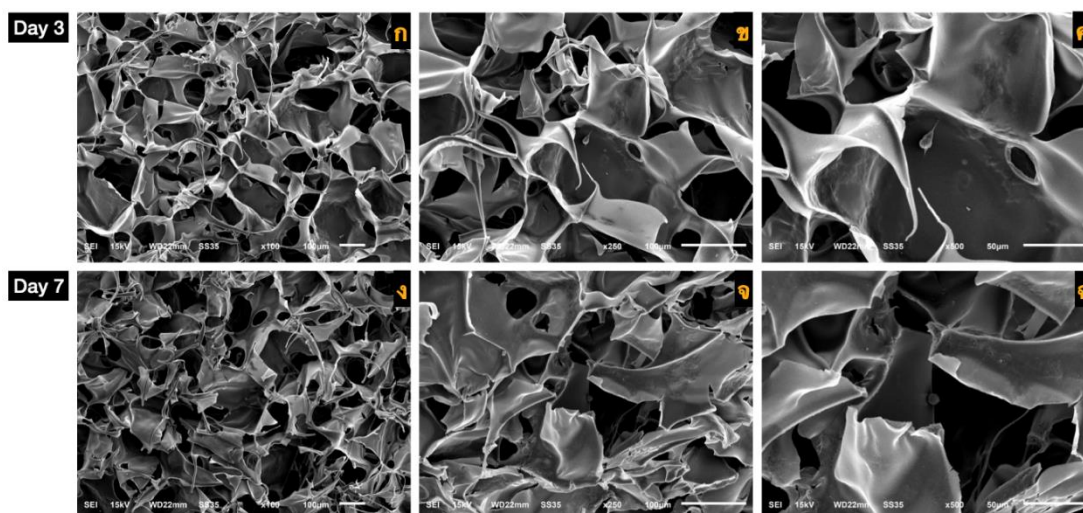
ผลการดำเนินงานวิจัย

จากการวิจัยเพื่อทดสอบความเป็นพิษและความเข้ากันได้ของวัสดุห้ามเลือดจากอนุพันธ์ไคโตซานในสัดส่วน 80 ต่อ 20 โดยน้ำหนัก (80/20: CA/NOCC) ต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์เนื้อเยื่อเหงือก (Human gingival fibroblast) ผู้วิจัยได้ดำเนินการทดสอบวัสดุห้ามเลือดจากอนุพันธ์ไคโตซานต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์เนื้อเยื่อเหงือกตามระเบียบ วิธีการและขั้นตอน เพื่อให้งานวิจัยนี้บรรลุกรอบแนวคิดและวัตถุประสงค์ที่กำหนดไว้ ดังนี้

1. สัณฐานวิทยาของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เนื้อเยื่อเหงือก
2. ความมีชีวิตและอัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เนื้อเยื่อเหงือก
3. การตายของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เนื้อเยื่อเหงือกโดยวิธีการย้อมติดสีทริปแฟนบลู
4. ระดับความเข้มข้นของแคลเซียมไอออน

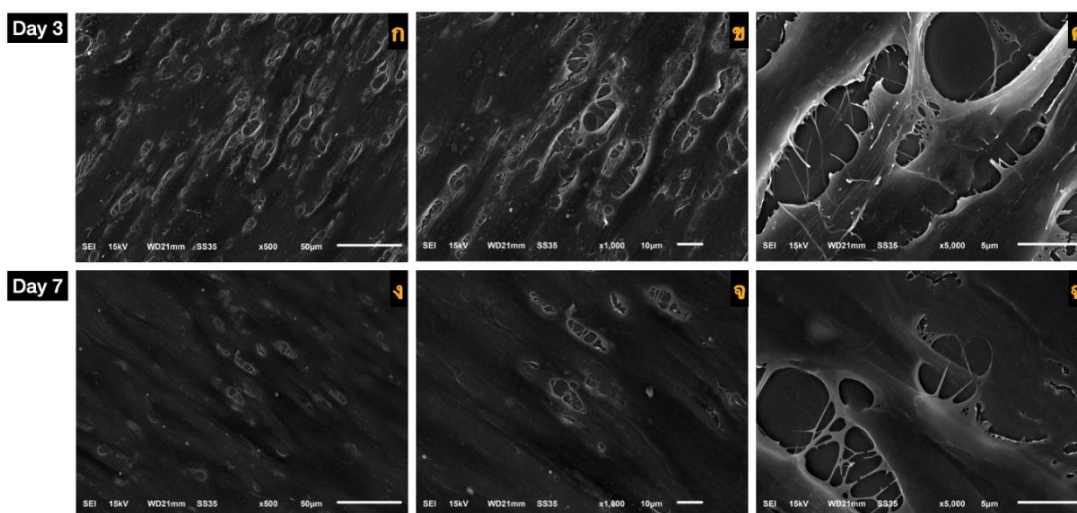
สัณฐานวิทยาของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เนื้อเยื่อเหงือก (Cell morphology)

การศึกษาสัณฐานวิทยาของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เนื้อเยื่อเหงือก หลังจากการทดสอบด้วยการเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์เนื้อเยื่อเหงือกเพียงอย่างเดียวและร่วมกับวัสดุห้ามเลือดจากอนุพันธ์ไคโตซาน (CA/NOCC) โดยตรง ในระยะเวลาการทดสอบ 2 ช่วงเวลา คือ วันทดสอบที่ 3 และวันที่ 7 ด้วยวิธีการส่องกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope: SEM) พบว่า วัสดุ CA/NOCC มีลักษณะเป็นรูพรุนขนาดเล็ก คล้ายฟองน้ำ โดยขนาดของรูพรุนมีขนาดประมาณ 100-200 ไมโครเมตร และเมื่อวันทดสอบผ่านไป ลักษณะของวัสดุห้ามเลือดในการทดสอบวันที่ 7 จะมีขนาดรูพรุนที่เล็กลง เนื่องจากโครงสร้างของรูพรุนมีการยุบตัวลงแสดงให้เห็นถึงการย่อยสลายของวัสดุเมื่อเวลาผ่านไป ดังแสดงในภาพประกอบ 17



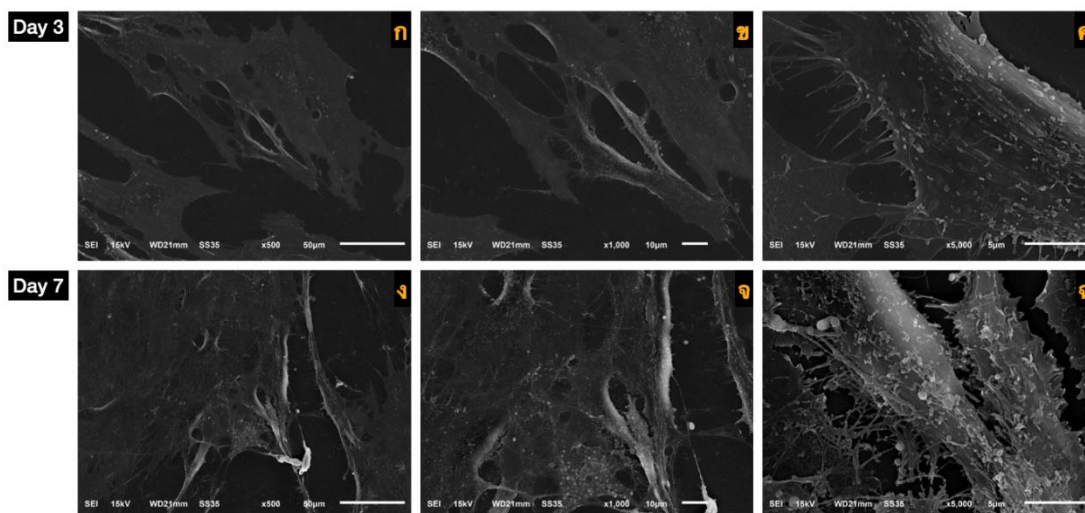
ภาพประกอบ 17 ภาพ SEM แสดงลักษณะของวัสดุห้ามเลือด CA/NOCC ในการทดสอบวันที่ 3 (รูป ก-ค) และวันที่ 7 (รูป ง-ฉ) ที่กำลังขยาย X100, X250, X500 ตามลำดับ

ในการทดสอบการเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์เนื้อเยื่อเหงือกเพียงอย่างเดียวและร่วมกับวัสดุ CA/NOCC โดยตรง พบว่า ในวันที่ 3 ของการทดสอบ กลุ่มควบคุมที่มีการเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์เนื้อเยื่อเหงือกเพียงอย่างเดียว เซลล์มีรูปร่างกระสวย (Fusiform cell) ผิวเรียบ มีการยื่นโครงร่าง (lamellipodia) ออกมาเพื่อยึดติดผิวกระจก ส่วนวันที่ 7 ของการทดสอบ เซลล์มีความหนาแน่นมากขึ้น และเซลล์ยังคงมีรูปร่างกระสวย (Fusiform cell) มีผิวเรียบ และมีการยื่นโครงร่าง (lamellipodia) ออกมาเพื่อยึดติดผิวกระจกเช่นเดิม ดังแสดงในภาพประกอบ 18



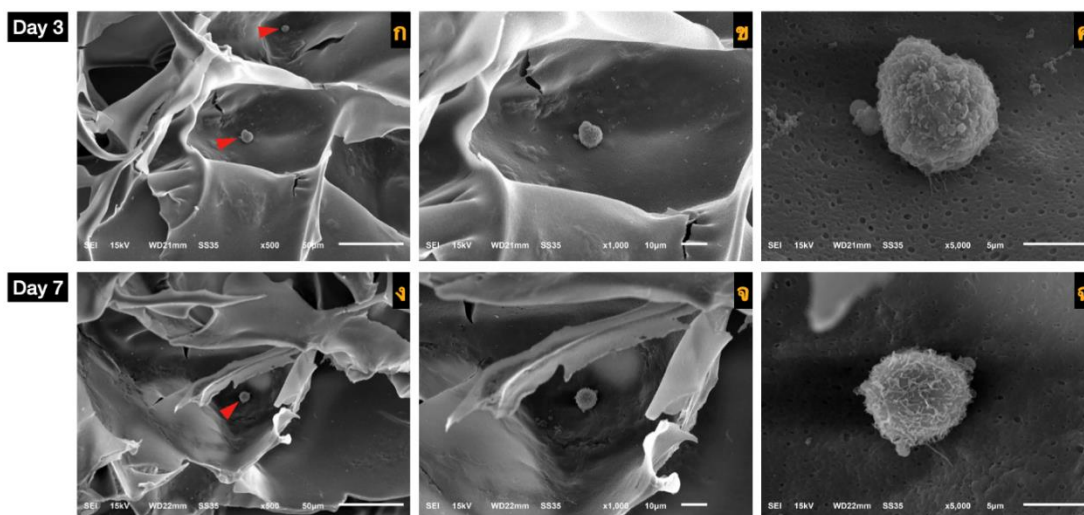
ภาพประกอบ 18 ภาพ SEM แสดงสัณฐานวิทยาของเซลล์โฟโบริบลาสที่เนื้อเยื่อเหงือกในกลุ่มควบคุมบนกระจกกันใส (Cover slip) ในการทดสอบวันที่ 3 (รูป ก-ค) และวันที่ 7 (รูป ง-ฉ) ที่กำลังขยาย X500, X1000, X5000 ตามลำดับ

ส่วนเซลล์โฟโบริบลาสที่เนื้อเยื่อเหงือกที่เลี้ยงร่วมกับวัสดุ CANOCC โดยตรง พบว่า ในวันที่ 3 ของการทดสอบ เซลล์มีการยึดติดที่ผิวกระจกรอบ ๆ วัสดุมากกว่าอยู่ในรูพรุนของวัสดุ เซลล์มีความหนาแน่นน้อยลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม เซลล์มีรูปร่างกระสวยและมีการยื่นโครงร่างออกมานอกตัวเซลล์เพื่อยึดติดผิวกระจก ที่ผิวเซลล์มีลักษณะขรุขระไม่เรียบ และที่เยื่อหุ้มเซลล์มีการบวมหรือเป็นตุ่มขนาดเล็ก (Blebs) ส่วนในวันที่ 7 ของการทดสอบ พบว่า เซลล์ส่วนมากยังคงยึดติดที่ผิวกระจกรอบ ๆ ตัววัสดุมากกว่าอยู่ในรูพรุนของวัสดุ เซลล์มีความหนาแน่นมากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับวันที่ 3 ของการทดสอบ แต่มีความหนาแน่นน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม เซลล์มีรูปร่างกระสวยและมีการยื่นโครงร่างออกมานอกตัวเซลล์ ที่ผิวเซลล์มีลักษณะขรุขระไม่เรียบ และที่เยื่อหุ้มเซลล์มีการบวมเป็นตุ่ม (Blebs) เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับวันที่ 3 ของการทดสอบ ดังแสดงในภาพประกอบ 19



ภาพประกอบ 19 ภาพ SEM แสดงสัณฐานวิทยาของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่เนื้อเยื่อเหงือกในกลุ่มทดสอบที่เลี้ยงร่วมกับวัสดุห้ามเลือด CA/NOCC บริเวณกระจกกันใส (cover slip) รอบวัสดุ ในการทดสอบวันที่ 3 (รูป ก-ค) และวันที่ 7 (รูป ง-ฉ) ที่กำลังขยาย X500, X1000, X5000 ตามลำดับ

ในการทดสอบการเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่เนื้อเยื่อเหงือกร่วมกับวัสดุ CA/NOCC โดยตรง พบว่า ในวันที่ 3 ของการทดสอบ เซลล์ที่อยู่บนผิวของวัสดุจะมีจำนวนน้อย มักพบเป็นเซลล์เดี่ยว ไม่อยู่รวมกันเป็นกลุ่ม เซลล์มีรูปร่างเป็นทรงกลมหรือทรงรี มีการยื่นโครงร่างขนาดเล็ก (Filopodia) ออกมานอกตัวเซลล์ ที่ผิวเซลล์มีลักษณะขรุขระไม่เรียบ และที่เยื่อหุ้มเซลล์มีการบวมเป็นตุ่มออกมา (blebings) ในวันที่ 7 ของการทดสอบ เซลล์ที่อยู่บนผิวของวัสดุ จะมีจำนวนน้อยลง มักอยู่เป็นเซลล์เดี่ยว เซลล์มีรูปร่างเป็นทรงกลมหรือทรงรี มีการยื่นโครงร่างขนาดเล็ก (Fibrils) ออกมานอกตัวเซลล์ ที่ผิวเซลล์มีลักษณะขรุขระไม่เรียบ และที่เยื่อหุ้มเซลล์มีการบวมเป็นตุ่มออกมามากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับวันที่ 3 ของการทดสอบ ดังแสดงในภาพประกอบ 20

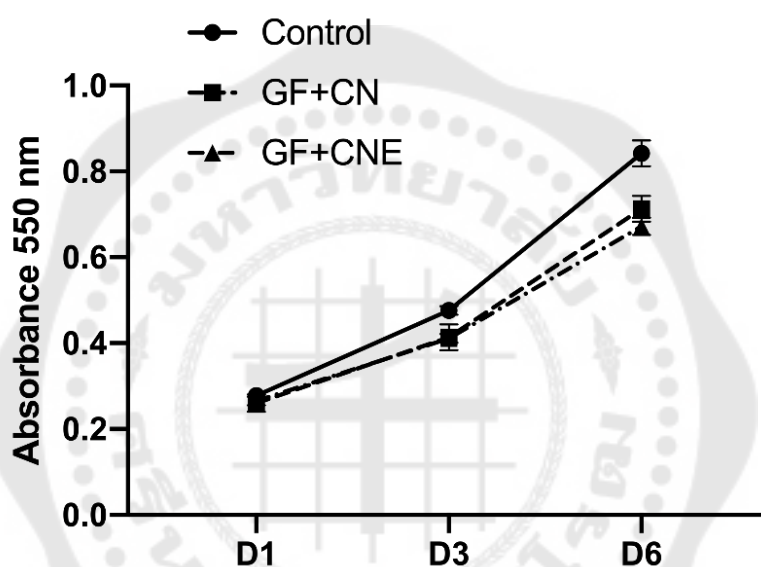


ภาพประกอบ 20 ภาพ SEM แสดงสัณฐานวิทยาของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เนื้อเยื่อเหงือกในกลุ่มทดสอบที่เลี้ยงร่วมกับวัสดุห้ามเลือดจากอนุพันธ์โคโคซาน บริเวณผิววัสดุ ในการทดสอบวันที่ 3 (รูป ก-ค) และวันที่ 7 (รูป ง-จ) ที่กำลังขยาย X500, X1000, X5000 ตามลำดับ

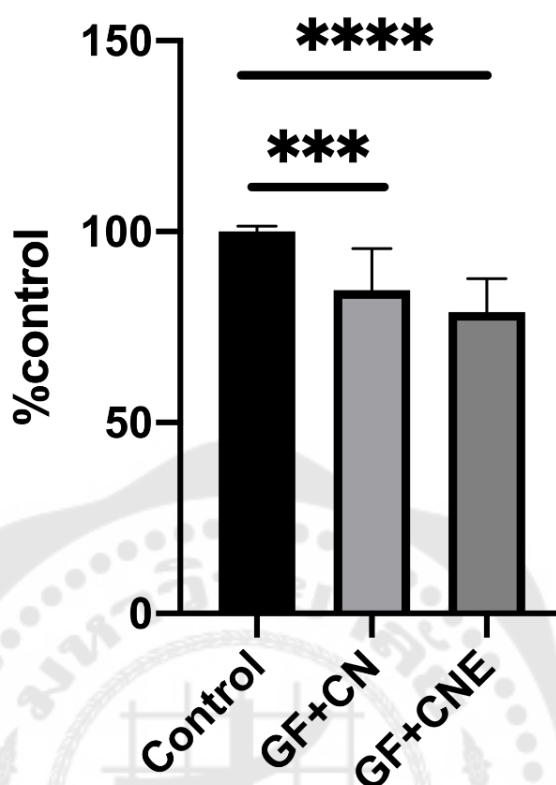
ความมีชีวิตและอัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เนื้อเยื่อเหงือก (Cell Viability and Cell Proliferation)

การทดสอบความมีชีวิตและอัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เนื้อเยื่อเหงือก ด้วยวิธีการทดสอบเอ็มทีที (MTT assay) จากการเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์เนื้อเยื่อเหงือกเพียงอย่างเดียวและร่วมกับวัสดุ CA/NOCC ในวันทดสอบวันที่ 1, 3 และ 6 จากการทดสอบทั้งหมด 5 ชุด พบว่า กลุ่มควบคุม (Control) และกลุ่มทดสอบที่มีการเลี้ยงเซลล์ร่วมกับวัสดุ CA/NOCC ทั้ง 2 สภาวะ คือ 1) กลุ่มทดสอบที่มีการเลี้ยงเซลล์ร่วมกับการวางวัสดุ CA/NOCC โดยตรง (GF+CN) และ 2) กลุ่มทดสอบที่มีการเลี้ยงเซลล์ร่วมกับสารสกัดจากวัสดุ CA/NOCC ในอาหารเลี้ยงเซลล์ (GF+CNE) พบว่าเซลล์ไฟโบรบลาสต์เนื้อเยื่อเหงือกมีชีวิตและมีความสามารถในการเพิ่มจำนวนเซลล์เมื่อเวลาผ่านไป โดยในกลุ่มควบคุม เซลล์จะมีความสามารถในการเพิ่มจำนวนมากที่สุด ส่วนในกลุ่มทดสอบทั้ง 2 กลุ่ม พบว่า เซลล์มีความมีชีวิตและมีความสามารถในการเพิ่มจำนวน (proliferative ability) ใกล้เคียงกัน แต่ความมีชีวิตของเซลล์ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมในวันการทดสอบเดียวกัน โดยกราฟเส้นแสดงความมีชีวิตของกลุ่มทดสอบทั้ง 2 กลุ่ม เริ่มแสดงความมีชีวิตของเซลล์ที่น้อยกว่ากลุ่มควบคุมตั้งแต่วันทดสอบวันที่ 3 และเห็นชัดมากขึ้นในวันทดสอบที่ 6 ดังภาพประกอบ 21 และอัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์ (proliferation rate)

สามารถคำนวณได้จากความชัน (slope analysis) ของค่าความมีชีวิตของเซลล์ (cell viability) จากการทดสอบวันที่ 1 ถึง 6 และคำนวณเป็นร้อยละของกลุ่มควบคุม (%Control) โดยอัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์ของกลุ่มทดสอบ GF+CN และ GF+CNE มีค่าร้อยละ คือ 85 และ 79 ของกลุ่มควบคุมตามลำดับ โดยค่าดังกล่าวมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P -value ของกลุ่มการทดสอบ GF+CN และ GF+CNE เท่ากับ 0.0006 และ <0.0001 ตามลำดับ) ดังภาพประกอบ 22



ภาพประกอบ 21 กราฟเส้นแสดงตัวแทนจากการทดสอบความมีชีวิต (Cell viability) ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เนื้อเยื่อเหงือก 1 ชุดการทดสอบ พบว่าเซลล์ไฟโบรบลาสต์เนื้อเยื่อเหงือกมีความสามารถในการเพิ่มจำนวนเซลล์เมื่อเวลาผ่านไป ระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบ ในวันที่ 1, 3 และ 6 (GF: gingival fibroblast, CN: CA/NOCC, CNE: CA/NOCC Extract)

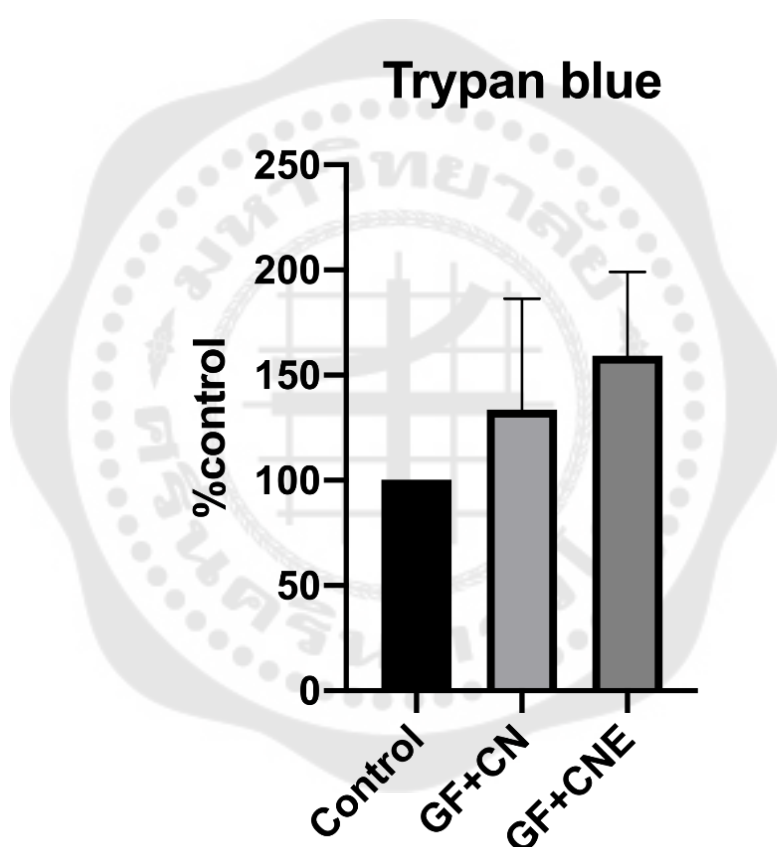


ภาพประกอบ 22 กราฟแท่งแสดงอัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์ไฟโบรบลาสต์เนื้อเยื่อเหงือก (Proliferation rate) ระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบ จากการทดสอบทั้งหมด 5 ชุด (***) : P -value = 0.0006, **** : P -value < 0.0001, GF: gingival fibroblast, CN: CA/NOCC, CNE: CA/NOCC Extract)

การตายของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เนื้อเยื่อเหงือกโดยวิธีการย้อมติดสีทริปแพนบลู (Trypan blue dye exclusion test)

การศึกษาการตายของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เนื้อเยื่อเหงือก ด้วยวิธีการย้อมด้วยสีทริปแพนบลู (Trypan blue dye exclusion test) โดยเซลล์ที่ย้อมติดสีฟ้าเข้มหลังการทดสอบ หมายถึงเซลล์ตายหรือเซลล์ที่กำลังจะตาย ด้วยหลักการที่สีย้อมสามารถเข้าสู่ภายในเซลล์ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์ที่ตายแล้ว และเข้าไปจับกับโปรตีนภายในเซลล์ ในการทดสอบนี้ได้ทดสอบกับการเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์เนื้อเยื่อเหงือกเพียงอย่างเดียวและร่วมกับวัสดุ CA/NOCC ทั้ง 2 สภาวะ คือ การเลี้ยงเซลล์แบบสัมผัสกับวัสดุ CA/NOCC โดยตรง (GF+CN) และเลี้ยงกับสารสกัดจากวัสดุ

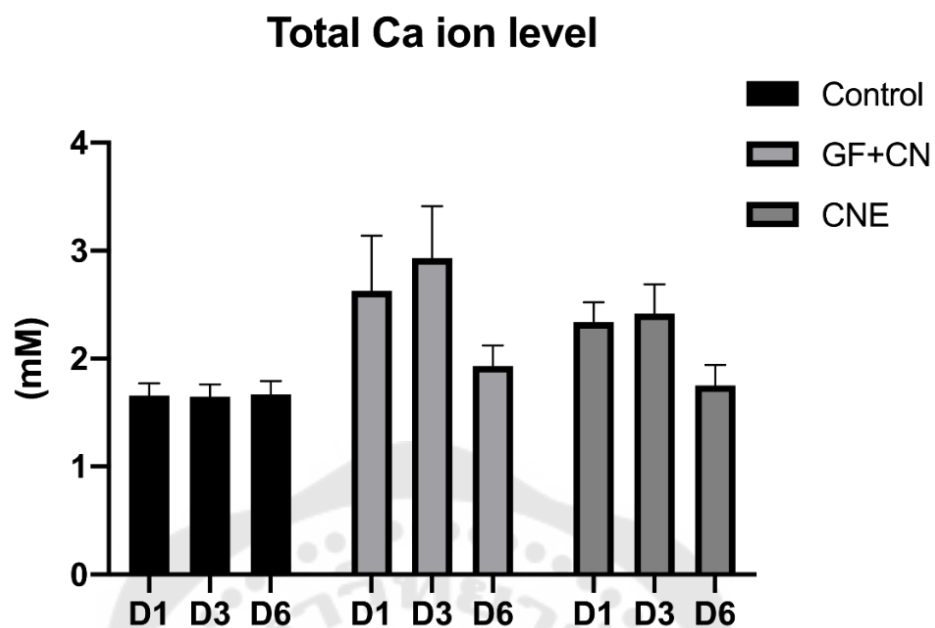
CA/NOCC ในอาหารเลี้ยงเซลล์ (GF+CNE) โดยทดสอบการตายของเซลล์ในวันที่ 14 ของการเลี้ยงเซลล์ ทำการทดสอบทั้งหมด 5 ชุด ผลการทดสอบพบว่า มีจำนวนเซลล์ตายในทุกกลุ่มการทดสอบ เมื่อนำค่าดังกล่าวมาคำนวณเป็นร้อยละเซลล์ตายต่อกลุ่มควบคุม (%Control) พบว่ากลุ่มทดสอบที่มีการเลี้ยงเซลล์ร่วมกับวัสดุ CA/NOCC ทั้ง 2 สภาวะ คือ GF+CN และ GF+CNE พบจำนวนเซลล์ตายโดยเฉลี่ยสูงกว่ากลุ่มควบคุม ที่ร้อยละ 134 และ 177 ตามลำดับ โดยค่าดังกล่าวไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ดังภาพประกอบ 23



ภาพประกอบ 23 กราฟแท่งแสดงจำนวนเซลล์ตาย ในการทดสอบวันที่ 14 ทำการคำนวณเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมและคำนวณเป็นร้อยละ (%Control) ระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบ จากการทดสอบทั้งหมด 5 ชุด (GF: gingival fibroblast, CN: CA/NOCC, CNE: CA/NOCC Extract)

ระดับความเข้มข้นของแคลเซียมไอออน(Calcium Ion concentration measurement)

จากการศึกษาระดับความเข้มข้นของแคลเซียมไอออนในอาหารเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์เนื้อเยื่อเหงือก (Culture medium) หลังจากที่ได้เลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์เนื้อเยื่อเหงือกเพียงอย่างเดียวและร่วมกับวัสดุ CA/NOCC โดยตรง โดยทดสอบอาหารเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์เนื้อเยื่อเหงือกในวันที่ 1 3 และ 6 พบว่า ระดับความเข้มข้นของแคลเซียมไอออนในอาหารเลี้ยงเซลล์ในกลุ่มควบคุม มีค่า 1.66 mM ในวันที่ 1 มีค่า 1.65 mM ในวันที่ 3 และ 1.67 mM ในวันที่ 6 ในขณะที่ระดับความเข้มข้นของแคลเซียมไอออนในอาหารเลี้ยงเซลล์ ในกลุ่มทดสอบที่มีการเลี้ยงเซลล์ร่วมกับวัสดุ CA/NOCC โดยตรง (GF+CN) มีค่า 2.63 mM ในวันที่ 1 มีค่า 2.93 mM ในวันที่ 3 และมีค่า 1.93 mM ในวันที่ 6 นอกจากนี้คณะผู้วิจัยยังได้ทำการวัดระดับความเข้มข้นของแคลเซียมไอออนในอาหารเลี้ยงเซลล์ ที่แช่กับวัสดุห้ามเลือด CA/NOCC โดยที่ไม่มีการเลี้ยงเซลล์ (CNE) พบว่า มีค่า 2.34 mM ในวันที่ 1 มีค่า 2.42 mM ในวันที่ 3 และมีค่า 1.75 mM ในวันที่ 6 จากการทดสอบจะเห็นว่าระดับความเข้มข้นของแคลเซียมไอออนในอาหารเลี้ยงเซลล์ ในการทดสอบวันที่ 6 ของกลุ่ม GF+CN และ CNE มีค่าลดลง เนื่องมาจากมีการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์และเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่เข้าไป ทำให้ปริมาณแคลเซียมไอออนที่วัดได้ในวันที่ 6 เป็นส่วนของวัสดุปลดปล่อยออกมาใหม่ ต่างจากกลุ่มควบคุมที่มีระดับแคลเซียมไอออนใกล้เคียงกันทั้ง 3 ช่วงเวลาทดสอบ ถึงแม้จะมีการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ในวันเดียวกัน ทั้งนี้คณะผู้วิจัยได้ทำการวัดระดับความเข้มข้นของแคลเซียมไอออนในอาหารเลี้ยงเซลล์ (culture medium) เพื่อเป็นค่าพื้นฐาน มีค่า 1.42 mM โดยผลการทดสอบทั้งหมดได้แสดงในภาพประกอบ 24



ภาพประกอบ 24 กราฟแท่งแสดงระดับความเข้มข้นของแคลเซียมไอออน (Ca^{2+} concentration) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ ในวันทดสอบที่ 1 3 และ 6 (GF: gingival fibroblast, CN: CA/NOCC, CNE: CA/NOCC Extract)

บทที่ 5

อภิปรายผล สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

อภิปรายผลการวิจัย

ในการพัฒนาผลิตภัณฑ์หรือวัสดุทางการแพทย์เพื่อนำมาใช้งานกับมนุษย์ การประเมินประสิทธิภาพและการทดสอบความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์เป็นสิ่งจำเป็น เพื่อลดผลข้างเคียงจากการใช้งานให้น้อยที่สุด ความสามารถในการระบุถึงความเป็นพิษหรืออันตรายจากผลิตภัณฑ์และผลพลอยได้ของผลิตภัณฑ์ (By-product) รวมถึงการประมาณการความเสี่ยงจากการใช้ผลิตภัณฑ์เป็นเรื่องที่ต้องทดสอบก่อนนำมาใช้งานในมนุษย์⁽⁵⁴⁾ โดยการทดสอบความเข้ากันได้และความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cytotoxicity test) เป็นพื้นฐานสำคัญในการพัฒนาวัสดุหรือผลิตภัณฑ์ทางการแพทย์ และสามารถนำมาต่อยอดเพื่อใช้งานกับมนุษย์ได้อย่างปลอดภัย⁽⁵⁵⁾ นอกจากนี้การทดสอบขั้นพื้นฐานกับเซลล์ยังช่วยลดระยะเวลาในการพัฒนาวัสดุ รวมถึงการลดการใช้สัตว์ทดลองและใช้สัตว์ทดลองอย่างปลอดภัย⁽⁵⁶⁾ การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ สามารถนำเซลล์ไลน์ (Cell lines) หรือ เซลล์จากมนุษย์โดยตรง (Target primary cells) มาใช้ในการทดสอบ เพื่อศึกษาการตอบสนองของเซลล์ต่อผลิตภัณฑ์ ทั้งในแง่ของการเปลี่ยนแปลงการทำหน้าที่ของเซลล์ (Cellular functions) หรือความมีชีวิตของเซลล์ (Cell viability) ในหลากหลายแง่มุม เช่น ลักษณะวิทยาของเซลล์ การเพิ่มจำนวนเซลล์ การยึดเกาะของเซลล์ และการตายของเซลล์⁽⁵⁵⁾ ในการพัฒนาวัสดุ CA/NOCC ก็เช่นเดียวกัน ทางคณะผู้วิจัยได้ทดสอบคุณสมบัติของวัสดุและประสิทธิภาพการห้ามเลือดทางห้องปฏิบัติการ⁽²¹⁾ และได้ทดสอบความเข้ากันได้และความเป็นพิษต่อเซลล์ พบว่า วัสดุห้ามเลือดดังกล่าวไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ไฟโบรบลาสต์ L-929⁽²⁴⁾ และมีประสิทธิภาพการห้ามเลือดที่ดี อีกทั้งได้มีการทดสอบในระดับสัตว์ทดลองและมนุษย์ พบว่าวัสดุ CA/NOCC สามารถห้ามเลือดได้ดี^(26, 57) ไม่ระคายเคืองต่อผิวหนังมนุษย์ ไม่ก่อให้เกิดการแพ้ต่อผิวหนังมนุษย์⁽²⁸⁾ และสามารถย่อยสลายได้เองในร่างกายมนุษย์ภายในระยะเวลา 3 เดือน⁽⁴⁶⁾ และเพื่อพัฒนาวัสดุ CA/NOCC ให้สามารถใช้งานได้ในช่วงปากได้ การทดสอบความเข้ากันได้และความเป็นพิษต่อเซลล์ที่คัดแยกมาจากเนื้อเยื่อในช่องปากจึงเป็นสิ่งสำคัญ ทางคณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษาความเข้ากันได้ของวัสดุ CA/NOCC กับเซลล์สร้างกระดูกจากขากรรไกรมนุษย์ พบว่า เซลล์สร้างกระดูกมีความเข้ากันได้กับวัสดุห้ามเลือดชนิดดังกล่าว คือ เซลล์สร้างกระดูกมีลักษณะพื้นฐานวิทยาและความมีชีวิตที่ใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุม⁽²⁹⁾ แต่ทั้งนี้ภายในช่องปากประกอบด้วยเซลล์หลากหลายชนิด และเซลล์ไฟโบรบลาสต์เนื้อเยื่อเหงือกถือเป็นหนึ่งในเซลล์ในช่องปากที่มีโอกาสสัมผัสกับวัสดุห้าม

เลือดดังกล่าว ดังนั้นการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์เนื้อเยื่อเหงือกจึงเป็นขั้นตอนหนึ่งในการพัฒนาวัสดุห้ามเลือดชนิดนี้ให้สามารถนำไปใช้ในช่องปากต่อไป

จากการศึกษาฐานฐานวิทยาเซลล์ไฟโบรบลาสต์เนื้อเยื่อเหงือก ที่ได้ทำการทดสอบร่วมกับวัสดุ CA/NOCC ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) พบว่า เซลล์ไฟโบรบลาสต์เนื้อเยื่อเหงือกที่ยึดเกาะภายในผิวของวัสดุห้ามเลือด มีลักษณะกลมและหดตัว ไม่มีการยื่นโครงร่างมายึดเกาะที่ผิววัสดุ และเซลล์มีความหนาแน่นน้อย มักอยู่เป็นเซลล์เดี่ยว ไม่รวมตัวกันเป็นกลุ่ม ซึ่งไม่สอดคล้องกับผลการทดสอบก่อนหน้าที่ศึกษาความเข้ากันได้ของวัสดุห้ามเลือดชนิดดังกล่าวกับเซลล์ไลน์ไฟโบรบลาสต์ L-929 พบว่า เซลล์ไลน์ดังกล่าวสามารถยึดเกาะและเพิ่มจำนวนเซลล์ได้ดีในวัสดุ CA/NOCC ที่มีการผสมสัดส่วนระหว่างแคลเซียมแอลจีเนตและคาร์บอกซีเมธิลไคโตซานในหลายสัดส่วน⁽²⁵⁾ ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากชนิดของเซลล์ที่แตกต่างกัน ทำให้การตอบสนองของเซลล์ต่อวัสดุต่างกัน^(58, 59) นอกจากนี้เซลล์ไฟโบรบลาสต์เนื้อเยื่อเหงือกยังมีเยื่อหุ้มเซลล์ไม่เรียบ มีตุ่มหรือการบวมของเยื่อหุ้มเซลล์ (Blebs) และมีการยื่นเส้นใยขนาดเล็ก (Fibrils) ออกจากเซลล์ ซึ่งไม่พบลักษณะดังกล่าวในเซลล์กลุ่มควบคุม โดยการแสดงออกของตุ่มหรือการบวมของเยื่อหุ้มเซลล์ สามารถบ่งชี้ได้ถึงเซลล์นั้นได้รับสารพิษหรือเซลล์กำลังตาย (Apoptosis)⁽⁶⁰⁻⁶³⁾ ในขณะที่การยื่นเส้นใยขนาดเล็กของเซลล์ บ่งชี้ถึงเซลล์กำลังกำจัดสารพิษออกจากเซลล์⁽⁶⁴⁾ เมื่อพิจารณาฐานฐานวิทยาของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เนื้อเยื่อเหงือกในวัสดุห้ามเลือด ในวันที่ 3 และวันที่ 7 ของการทดสอบ พบว่า ลักษณะของเซลล์มีการเปลี่ยนแปลงไปเล็กน้อย คือ ที่เยื่อหุ้มเซลล์มีการบวมเป็นตุ่มออกมามากขึ้นในวันทดสอบที่ 7 ขณะที่ฐานฐานของเซลล์อื่น ๆ เช่น เซลล์มีลักษณะกลมและหดตัว ไม่มีการยื่นโครงร่างมายึดเกาะที่ผิววัสดุ มีเยื่อหุ้มเซลล์ไม่เรียบ ขรุขระ ยังคงมีลักษณะเดิม และเซลล์มีความหนาแน่นน้อยเช่นเดิม ไม่มีการยึดเกาะของเซลล์เพิ่มมากขึ้น

การศึกษาความมีชีวิตและการเพิ่มจำนวนเซลล์ไฟโบรบลาสต์เนื้อเยื่อเหงือก ที่เลี้ยงร่วมกับวัสดุ CA/NOCC โดยใช้วิธีทดสอบเอ็มทีที (MTT assay)⁽⁶⁵⁾ ซึ่งเป็นวิธีการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ขั้นต้น ที่มีวิธีการเรียบง่าย แต่มีความไว (Sensitivity) ในการทดสอบ รวมทั้งสามารถในการทำซ้ำได้ดี (Reproducibility)⁽⁶⁶⁾ โดยหลักการของเอ็มทีที คือ ทดสอบการทำงานของไมโทคอนเดรีย (Mitochondria) ภายในเซลล์ที่มีชีวิต ซึ่งจะมีเอ็นไซม์ดีไฮโดรจีเนส (Dehydrogenase) ที่สามารถตัดวงแหวนเตตราโซล (Tetrazole ring) ให้ได้ผลึกฟอร์มazan⁽⁵⁶⁾ ในการดูอัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์ (Proliferation rate) สามารถคำนวณได้จากค่าความชัน (slope analysis) ของความมีชีวิตของเซลล์ (Cell viability) จากการทดสอบวันที่ 1 ถึง

วันที่ 6 และคำนวณเป็นร้อยละของกลุ่มควบคุม (%Control) โดยผลการศึกษาดังกล่าวการเพิ่มจำนวนเซลล์ไฟโบรบลาสต์เนื้อเยื่อเหงือก ที่เลี้ยงร่วมกับวัสดุ CA/NOCC ทั้ง 2 สภาวะ คือ GF+CN และ GF+CNE มีค่าเท่ากับ 85 และ 79 ตามลำดับ ซึ่งอัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์ดังกล่าวมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยผลการทดสอบดังกล่าวมีความสอดคล้องกับการทดสอบพื้นฐานวิทยาของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เนื้อเยื่อเหงือก ที่บ่งชี้ว่าวัสดุ CA/NOCC มีความเป็นพิษต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์เนื้อเยื่อเหงือก

การศึกษการตายของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เนื้อเยื่อเหงือก ที่เลี้ยงร่วมกับวัสดุ CA/NOCC ด้วยการย้อมสีทริปแฟนบลู ซึ่งเป็นการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ใช้มาเป็นเวลานาน⁽⁶⁷⁾ มีวิธีการทดสอบค่อนข้างแม่นยำ สามารถทำได้ง่าย รวดเร็ว มีราคาไม่แพง⁽⁶⁸⁾ และสามารถแปลผลการทดสอบได้ชัดเจน หากสามารถควบคุมปัจจัยที่ส่งผลต่อการทดสอบได้ดี^(69, 70) โดยหลักการของการย้อมสีทริปแฟนบลู คือ สีทริปแฟนบลูสามารถผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ในเซลล์ที่ตายหรือกำลังจะตายได้ และเข้าไปจับกับโปรตีนภายในเซลล์⁽⁷¹⁾ ทำให้เซลล์ดังกล่าวแสดงผลเป็นเซลล์สีฟ้าเข้มภายใต้การส่องกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง จากการศึกษาพบพบว่าในวันที่ 14 ของการทดสอบ พบเซลล์ตายทุกกลุ่มการทดสอบ โดยกลุ่มทดสอบที่ทำการเลี้ยงเซลล์ร่วมกับวัสดุ CA/NOCC ทั้ง 2 สภาวะ มีจำนวนเซลล์ตายโดยเฉลี่ยสูงกว่ากลุ่มควบคุม แต่ค่าดังกล่าวไม่มีความแตกต่างทางสถิติ จากผลการทดสอบ พบว่า ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานมีค่ากว้าง ซึ่งอาจเป็นผลมาจากเซลล์ที่นำมาทดสอบเป็นเซลล์ที่เพาะเลี้ยงจากเนื้อเยื่อมนุษย์ที่ต่างบุคคลกัน ทำให้การตอบสนองของเซลล์ต่อวัสดุออกมาต่างกัน อย่างไรก็ตามผลการทดสอบนี้ มีส่วนสนับสนุนการเปลี่ยนแปลงพื้นฐานวิทยาของเซลล์ ความมีชีวิตและอัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์ที่ลดลงในเซลล์ไฟโบรบลาสต์เนื้อเยื่อเหงือก ที่ทดสอบร่วมกับวัสดุ CA/NOCC ซึ่งแสดงถึงผลกระทบในเชิงลบของวัสดุที่มีต่อเซลล์อย่างชัดเจน

จากการคิดค้นและพัฒนาวัสดุ CA/NOCC วัสดุห้ามเลือดชนิดดังกล่าวมีองค์ประกอบทางเคมี 2 ส่วน คือ คาร์บอกซีเมทิลไคโตซาน (*N,O*-Carboxymethylchitosan) ซึ่งเป็นอนุพันธ์หนึ่งของสารไคโตซาน และแคลเซียมแอลจีเนต (Calcium alginate) ที่เกิดขึ้นระหว่างขั้นตอนการผลิตจากการแลกเปลี่ยนไอออนระหว่างโซเดียมไอออนและแคลเซียมไอออน^(22, 25) ของสารแอลจีเนต ซึ่งองค์ประกอบทางเคมีของสารทั้ง 2 ชนิดมีคุณสมบัติที่ดี เหมาะสมในการนำมาพัฒนาเป็นสารห้ามเลือดเฉพาะที่ กล่าวคือ คาร์บอกซีเมทิลไคโตซาน มีคุณสมบัติในการเข้ากันได้กับเซลล์ได้ดี ไม่มีความเป็นพิษ สามารถย่อยสลายเองได้ตามธรรมชาติ นอกจากนี้ยังส่งเสริมการหายของแผล จากคุณสมบัติการห้ามเลือดที่ดี^(19, 72) ในขณะที่แอลจีเนต คือ สารประเภทโพลีแซ็กคาไรด์ (Polysaccharide) ชนิดหนึ่ง ซึ่งเป็นโมเลกุลคาร์โบไฮเดรตสายยาวเช่นเดียวกับไคโตซาน สามารถ

สกัดได้จากสารห่วยทะเลสีน้ำตาล โดยทั่วไปจะนำมาใช้งานในรูปแบบสารประกอบ เช่น แคลเซียมแอลจีเนต หรือโซเดียมแอลจีเนต⁽⁴³⁾ ที่มีคุณสมบัติห้ามเลือดได้ดี ส่งเสริมการหายของแผล มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพ สามารถย่อยสลายได้เอง และมีราคาไม่แพง^(41, 73) แต่จากการศึกษาของคณะผู้วิจัย พบว่า วัสดุห้ามเลือดนี้มีความเป็นพิษต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์เนื้อเยื่อเหงือกจากมนุษย์ ดังแสดงในการทดสอบมาตรฐานวิทยา ความมีชีวิตและอัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์ และการทดสอบการตายของเซลล์ แต่ในขณะที่การศึกษาก่อนหน้านี้ พบว่า วัสดุ CA/NOCC มีความเข้ากันกับเซลล์ไลน์ไฟโบรบลาสต์ L-929 ได้ดี และเมื่อปรับเปลี่ยนสัดส่วนระหว่างคาร์บอกซีเมธิลไคโตซานและแคลเซียมแอลจีเนต ให้มีความหลากหลาย พบว่าเซลล์ไลน์ไฟโบรบลาสต์ดังกล่าวสามารถเจริญบนวัสดุได้ดีทุกสัดส่วน และเซลล์มีความหนาแน่นมากขึ้นเมื่อเพิ่มสัดส่วนของแคลเซียมแอลจีเนตในวัสดุห้ามเลือด⁽²⁵⁾ เช่นเดียวกับการศึกษาของ Phaewphala และคณะ ในปี 2020 ที่พบว่า เซลล์สร้างกระดูกจากขากรรไกรมนุษย์ (Primary human alveolar osteoblast) มีความเข้ากันได้ดีกับวัสดุ CA/NOCC โดยเซลล์ดังกล่าวมีมาตรฐานวิทยา ความมีชีวิตและอัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์ที่ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม ทั้งนี้การที่ผลทดสอบออกมาต่างกัน อาจมีสาเหตุจากการใช้เซลล์ต่างชนิดกันทำให้การตอบสนองของเซลล์ต่อวัสดุออกมาต่างกัน^(58, 59) อีกทั้งวิธีการวิจัยและสภาวะแวดล้อมต่าง ๆ ที่แตกต่างกันก็สามารถส่งผลต่อผลการศึกษาเช่นกัน

เพื่อเป็นการวิเคราะห์ถึงสาเหตุที่อาจส่งผลให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์เนื้อเยื่อเหงือกของวัสดุห้ามเลือด CA/NOCC มีการศึกษาก่อนหน้านี้ทำการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารคาร์บอกซีเมธิลไคโตซานและแคลเซียมแอลจีเนต พบว่า คาร์บอกซีเมธิลไคโตซานไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ เมื่อนำมาทดสอบกับเซลล์ไลน์ MCF-7 (Breast cancer cells) โดยเซลล์ไลน์ชนิดดังกล่าวมีความมีชีวิตถึงร้อยละ 98 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม⁽⁷⁴⁾ เช่นเดียวกับการทดสอบในเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากผิวหนังมนุษย์⁽⁷⁵⁾ เซลล์ไลน์ไฟโบรบลาสต์หนู NIH3T3⁽⁷⁶⁾ และเซลล์ไลน์ไมโอโบลาสต์หนู L-6⁽⁷⁷⁾ พบว่าเซลล์ดังกล่าวมีความสามารถเข้ากันได้ดีกับสารคาร์บอกซีเมธิลไคโตซาน และมีการศึกษาพบว่าสารคาร์บอกซีเมธิลไคโตซานสามารถช่วยกระตุ้นการเพิ่มจำนวนเซลล์และการเคลื่อนที่ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากผิวหนังมนุษย์ ซึ่งช่วยส่งเสริมให้เกิดการหายของแผลที่ดี^(78, 79) นอกจากนี้สารคาร์บอกซีเมธิลไคโตซานยังสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในด้านการนำยา (drug delivery) เข้าสู่ร่างกายมนุษย์ มีการศึกษาของ Geisberger และคณะ ในปี 2011⁽⁸⁰⁾ ได้ศึกษาถึงประสิทธิภาพการนำยาและความเข้ากันได้ดีต่อเซลล์ของสารคาร์บอกซีเมธิลไคโตซาน พบว่า นอกจากสารคาร์บอกซีเมธิลไคโตซานจะไม่มีความเป็นพิษต่อ

เซลล์ไลน์ Hela (Human cervical cancer cell) แล้ว ยังสามารถช่วยลดผลข้างเคียงของยาที่นำเข้าสู่ร่างกายด้วย

ในขณะเดียวกันแคลเซียมแอลจีเนตถูกนำมาศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์เพื่อประเมินความปลอดภัยและศึกษาปัจจัยที่อาจส่งผลข้างเคียงต่อการทำงานของเซลล์ จากงานวิจัยของ Suzuki และคณะ ในปี 1998^(81, 82) ได้ทำการศึกษาถึงผลกระทบของระดับความเข้มข้นแคลเซียมไฮดรอกไซด์ในสารสกัดวัสดุปิดแผลจากแคลเซียมแอลจีเนต พบว่า แคลเซียมแอลจีเนตมีผลยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์ไลน์ไฟโบรบลาสต์ L929 โดยพบว่าหากสารสกัดจากแคลเซียมแอลจีเนตในอาหารเลี้ยงเซลล์มีปริมาณของแคลเซียมไฮดรอกไซด์มากขึ้น จะส่งผลให้เกิดการยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์มากขึ้น ดังนั้นทางผู้วิจัยจึงได้พัฒนาวัสดุปิดแผลชนิดใหม่ที่มีการปลดปล่อยระดับความเข้มข้นของแคลเซียมไฮดรอกไซด์ลดลง เพื่อเป็นการลดผลเสียของแคลเซียมไฮดรอกไซด์ต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ เช่นเดียวกับการศึกษาของ Bohari Siti P.M. และคณะ ในปี 2011⁽⁸³⁾ ที่ทำการทดสอบระดับความเข้มข้น (concentration) ของแคลเซียมแอลจีเนตต่อความมีชีวิตและการเพิ่มจำนวนเซลล์ พบว่าแคลเซียมแอลจีเนตที่ความเข้มข้นสูงจะก่อให้เกิดการตายของเซลล์ไลน์ไฟโบรบลาสต์หนู NIH 3T3 ได้มากกว่าแคลเซียมแอลจีเนตความเข้มข้นต่ำ นอกจากนี้ Rosdy M. และคณะ ได้ทำการศึกษาในปี 1990⁽⁸⁴⁾ โดยได้ศึกษาความเป็นพิษของวัสดุปิดแผลทั้ง 16 ชนิดที่มีจำหน่ายในท้องตลาด ต่อเซลล์เคอราติโนไซต์จากผิวหนังมนุษย์ (Normal human keratinocytes) และเซลล์ไลน์ไฟโบรบลาสต์ MRC5 (Human embryonic lung fibroblasts) พบว่าผลิตภัณฑ์คาลโตสแตท (Kaltostat) ซึ่งมีองค์ประกอบทางเคมีเป็นแคลเซียมแอลจีเนต มีความเป็นพิษต่อเซลล์ที่นำมาทดสอบทั้ง 2 ชนิด โดยเซลล์ที่สัมผัสกับผลิตภัณฑ์คาลโตสแตท เซลล์จะมีสัญญาณวิทยาที่เปลี่ยนไป มีความหนาแน่นของเซลล์ลดลง ไม่สามารถยึดเกาะกับจานเลี้ยงเซลล์ได้ และมีบางส่วนทำให้เซลล์ตาย เช่นเดียวกับการศึกษาในปี 2006 ของ Paddle-Ledinek J.E. และคณะ⁽⁸⁵⁾ ได้ทำการทดสอบความเป็นพิษของวัสดุปิดแผลที่มีจำหน่ายในท้องตลาด 9 ชนิด โดยใช้สารสกัดจากวัสดุปิดแผล (extract) ในการทดสอบ ต่อเซลล์เคอราติโนไซต์จากผิวหนังมนุษย์ (Human keratinocytes) จากการศึกษา พบว่า วัสดุที่นำมาทดสอบ มีผลิตภัณฑ์ที่มีองค์ประกอบเป็นแอลจีเนตอยู่ 3 ชนิด คือ ผลิตภัณฑ์แอลจีไซท์เอ็ม (Algisite M) ผลิตภัณฑ์คอนทรีตเอช (Contreet-H) และผลิตภัณฑ์ซีซอร์บ (SeaSorb) โดยการทดสอบพบว่าผลิตภัณฑ์ทั้ง 3 ชนิดมีการปลดปล่อยแคลเซียมไฮดรอกไซด์ออกมาสู่สารสกัดในปริมาณมาก (3.06-4.89 mmol/L) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (0.10 mmol/L) ซึ่งส่งผลให้การมีชีวิตและการเพิ่มจำนวนเซลล์เคอราติโนไซต์จากผิวหนังมนุษย์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อีกทั้งสัญญาณวิทยาของเซลล์ที่เลี้ยงภายใต้สารสกัดจาก

วัสดุปิดแผลทั้ง 3 ชนิด มีการเปลี่ยนแปลงไปจากสัณฐานวิทยาของเซลล์ปกติ แต่อย่างไรก็ตามมีงานวิจัยของ Doyle JW. และคณะ ในปี 1996 พบว่า แคลเซียมแอลจีเนตช่วยส่งเสริมการเพิ่มจำนวนเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากผิวหนังมนุษย์ (Human dermal fibroblast) แต่ยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์เอนโดทีเลียลจากหลอดเลือด (Microvascular endothelial cell) และเซลล์เคอราติโนไซต์ (Human keratinocyte) ของมนุษย์ ในทางกลับกัน แคลเซียมแอลจีเนตยังยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากผิวหนังมนุษย์ แต่ไม่ส่งผลต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์เคอราติโนไซต์ของมนุษย์ โดยผู้วิจัยได้อธิบายปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นว่าเป็นผลกระทบจากแคลเซียมไอออน ที่เกิดจากการปลดปล่อยแคลเซียมไอออนจากแคลเซียมแอลจีเนต⁽⁸⁶⁾ จากการศึกษาก่อนหน้านี้ของเรา พบว่า การสลายตัวของวัสดุ CA/NOCC ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ชาโลน (PBS) ได้ผลิตภัณฑ์ (Degraded products) เป็นสารโซเดียมแอลจีเนต (Sodium alginate) ซึ่งเกิดจากการแลกเปลี่ยนโซเดียมไอออนจากสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ชาโลน กับแคลเซียมไอออนจากแคลเซียมแอลจีเนต ทำให้ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ชาโลนมีปริมาณแคลเซียมไอออนมากขึ้น⁽²⁵⁾ แต่จากผลการทดสอบความเข้ากันได้กับเซลล์ ที่ได้ทำการทดสอบวัสดุ CA/NOCC ร่วมกับเซลล์ไลน์ไฟโบรบลาสต์ L929 พบว่า เมื่อเพิ่มปริมาณแคลเซียมแอลจีเนตในวัสดุหุ้มเลือด กลับทำให้มีการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไลน์ไฟโบรบลาสต์ L929 มากขึ้น⁽²⁵⁾ ซึ่งต่างจากการศึกษาข้างต้น ทั้งนี้อาจเกิดจากเซลล์ต่างชนิดกัน วิธีการทดสอบ รวมถึงองค์ประกอบทางเคมีแคลเซียมแอลจีเนตที่ต่างกัน ทำให้ผลการศึกษาดูออกมาต่างกัน

จากการวัดระดับความเข้มข้นของแคลเซียมไอออนในอาหารเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์เนื้อเยื่อเหงือก พบว่า ในอาหารเลี้ยงเซลล์ในกลุ่มทดสอบที่เลี้ยงเซลล์ร่วมกับวัสดุ CA/NOCC มีความเข้มข้นของแคลเซียมไอออน 2.63 mM ในวันที่ 1 และ 2.93 mM ในวันที่ 3 ของการทดสอบ โดยที่อาหารเลี้ยงเซลล์ในกลุ่มควบคุม มีความเข้มข้นของแคลเซียมไอออน 1.66 mM ในวันที่ 1 และ 1.65 mM ในวันที่ 3 ของการทดสอบ จากปริมาณของแคลเซียมไอออนในอาหารเลี้ยงเซลล์ในกลุ่มทดสอบแสดงให้เห็นว่า ภายในอาหารเลี้ยงมีระดับแคลเซียมไอออนที่สูงเกินระดับที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ มีรายงานของ Kulesz-Martin M.F. และคณะในปี 1984 ได้ศึกษาระดับความเหมาะสมของแคลเซียมไอออน (Ca^{2+} concentration) ในการเจริญของเซลล์ชนิดต่าง ๆ พบว่า เซลล์ต่างชนิดกันมีความต้องการความเข้มข้นของแคลเซียมไอออนในการเจริญในระดับที่ต่างกัน โดยระดับความเข้มข้นของแคลเซียมไอออนที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเซลล์ไฟโบรบลาสต์อยู่ที่ 1.4 mM⁽⁸⁷⁾ ปริมาณของแคลเซียมไอออนที่สูงเกินระดับที่เหมาะสมในการเจริญของเซลล์ จะส่งผลให้เกิดการนำแคลเซียมไอออนเข้าสู่เซลล์มากขึ้นและมีการกระจาย

แคลเซียมไอออนไปสู่องค์ประกอบต่าง ๆ ของเซลล์ ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ในด้านต่าง ๆ คือ ทำให้การทำงานของไมโทคอนเดรียบกพร่อง รบกวนการทำงานของระบบโครงร่างภายในเซลล์ และก่อให้เกิดการสลายตัวของเซลล์ผ่านการกระตุ้นของแคลเซียมไอออน^(88, 89) ซึ่งจากผลการศึกษาของเราพบว่า วัสดุ CA/NOCC ส่งผลให้ควมมีชีวิตและอัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์ไฟโบรบลาสที่เนื้อเยื่อเหงือกลดลง จากการทดสอบด้วยวิธีเอ็มทีที ซึ่งเป็นวิธีการทดสอบการมีชีวิตของเซลล์ผ่านการทำงานของไมโทคอนเดรีย และเซลล์ไฟโบรบลาสที่เนื้อเยื่อเหงือกมีสัญญาณวิทยาที่เปลี่ยนแปลงจากปกติ คือ มีเยื่อหุ้มเซลล์ที่ไม่เรียบ มีการบวมหรือเป็นตุ่มขนาดเล็กแตกออกมา (Blebs) และมีการยื่นโครงร่างขนาดเล็ก (Fibrils) ออกมานอกตัวเซลล์ ซึ่งแสดงถึงการเปลี่ยนแปลงการทำงานของระบบโครงร่าง (Cytoskeleton) ภายในเซลล์ ที่แสดงออกเมื่อเซลล์ได้รับสารพิษ^(88, 89)

สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาความเป็นพิษของวัสดุ CA/NOCC ต่อเซลล์ไฟโบรบลาสที่เนื้อเยื่อเหงือกพบว่า วัสดุ CA/NOCC มีความเป็นพิษต่อเซลล์ไฟโบรบลาสที่เนื้อเยื่อเหงือก โดยก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณวิทยาของเซลล์ไปจากปกติ รวมทั้งส่งผลให้ควมมีชีวิตและอัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และพบจำนวนเซลล์ตายโดยเฉลี่ยสูงกว่ากลุ่มควบคุม ทั้งนี้คาดว่าความเป็นพิษของวัสดุ CA/NOCC อาจเกิดการปลดปล่อยแคลเซียมไอออนระดับสูงสู่อาหารเลี้ยงเซลล์

ข้อเสนอแนะ

จากการตั้งสมมุติฐานเรื่องระดับความเข้มข้นของแคลเซียมไอออนที่มีระดับสูง อาจเป็นสาเหตุทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางสัญญาณวิทยาของเซลล์รวมถึงควมมีชีวิตและอัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์ที่ลดลง ดังนั้นเพื่อเป็นการพัฒนาวัสดุห้ามเลือดชนิดดังกล่าวให้มีความเข้ากันได้กับเซลล์จากเนื้อเยื่อในช่องปาก การปรับปรุงหรือแก้ไของค์ประกอบทางเคมีของสารห้ามเลือด การพัฒนาสัดส่วนของสารตั้งต้นทั้ง 2 ชนิดในวัสดุห้ามเลือด หรือการล้างวัสดุดังกล่าวก่อนนำไปเลี้ยงร่วมกับเซลล์ เพื่อลดปริมาณแคลเซียมไอออนที่ปลดปล่อยออกมาในปริมาณสูง อาจเป็นหนึ่งในปัจจัยที่ต้องพิจารณา เพื่อทำให้วัสดุห้ามเลือดดังกล่าวมีความเข้ากันได้กับเซลล์ทุกชนิดในช่องปาก และสามารถนำมาใช้ห้ามเลือดในงานศัลยกรรมช่องปากได้ต่อไปในอนาคต

บรรณานุกรม

1. Kamoh A, Swantek J. Hemostasis in oral surgery. Dental clinics of North America. 2012;56(1):17-23, vii.
2. Malmquist JP, Clemens SC, Oien HJ, Wilson SL. Hemostasis of oral surgery wounds with the HemCon Dental Dressing. Oral Maxillofac Surg Clin North Am. 2008;66(6):1177-83.
3. Achneck HE, Sileshi B, Jamiolkowski RM, Albala DM, Shapiro ML, Lawson JH. A comprehensive review of topical hemostatic agents: efficacy and recommendations for use. Ann surg. 2010;251(2):217-28.
4. MP SK. Local hemostatic agents in the management of bleeding in oral surgery. AJPCR. 2016;9(3):35-41.
5. Azargoon H, Williams BJ, Solomon ES, Kessler HP, He J, Spears R. Assessment of hemostatic efficacy and osseous wound healing using HemCon dental dressing. J Endod. 2011;37(6):807-11.
6. Rossmann JA, Rees TD. A comparative evaluation of hemostatic agents in the management of soft tissue graft donor site bleeding. Journal of periodontology. 1999;70(11):1369-75.
7. Matthew IR, Browne RM, Frame JW, Millar BG. Tissue response to a haemostatic alginate wound dressing in tooth extraction sockets. British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery. 1993;31(3):165-9.
8. Kølsen Petersen J, Krogsgaard J, Nielsen KM, Nørgaard EB. A comparison between 2 absorbable hemostatic agents: gelatin sponge (Spongostan®) and oxidized regenerated cellulose (Surgicel®). International Journal of Oral Surgery. 1984;13(5):406-10.
9. Finn MD, Schow SR, Schneiderman ED. Osseous regeneration in the presence of four common hemostatic agents. Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons. 1992;50(6):608-12.
10. Nooh N, Abdullah WA, Grawish Mel A, Ramalingam S, Javed F, Al-Hezaimi K. The

effects of surgicel and bone wax hemostatic agents on bone healing: An experimental study. *Indian J Orthop.* 2014;48(3):319-25.

11. Khan MA, Mujahid M. A review on recent advances in chitosan based composite for hemostatic dressings. *International journal of biological macromolecules.* 2019;124:138-47.

12. Vezeau PJ. Topical hemostatic agents: what the oral and maxillofacial surgeon needs to know. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am.* 2016;28(4):523-32.

13. Rao SB, Sharma CP. Use of chitosan as a biomaterial: studies on its safety and hemostatic potential. *Journal of Biomedical Materials Research.* 1997;34(1):21-8.

14. Pippi R, Santoro M, Cafolla A. The effectiveness of a new method using an extra-alveolar hemostatic agent after dental extractions in older patients on oral anticoagulation treatment: an inpatient study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2015;120(1):15-21.

15. Kumar KRA, Kumar J, Sarvagna J, Gadde P, Chikkaboriah S. Hemostasis and Post-operative Care of Oral Surgical Wounds by Hemcon Dental Dressing in Patients on Oral Anticoagulant Therapy: A Split Mouth Randomized Controlled Clinical Trial. *J Clin Diagn Res.* 2016;10(9):ZC37-ZC40.

16. Pippi R, Santoro M, Cafolla A. The Use of a Chitosan-Derived Hemostatic Agent for Postextraction Bleeding Control in Patients on Antiplatelet Treatment. *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons.* 2017;75(6):1118-23.

17. Klokkevold PR, Vandemark L, Kenney EB, Bernard GW. Osteogenesis enhanced by chitosan (poly-N-acetyl glucosaminoglycan) in vitro. *Journal of periodontology.* 1996;67(11):1170-5.

18. Muzzarelli RA, Biagini G, Bellardini M, Simonelli L, Castaldini C, Fratto G. Osteoconduction exerted by methylpyrrolidinone chitosan used in dental surgery. *Biomaterials.* 1993;14(1):39-43.

19. Shariatnia Z. Carboxymethyl chitosan: Properties and biomedical applications. *International journal of biological macromolecules.* 2018;120:1406-19.

20. Qin C, Li H, Xiao Q, Liu Y, Zhu J, Du Y. Water-solubility of chitosan and its antimicrobial activity. *Carbohydrate Polymers*. 2006;63(3):367-74.
21. Janvikul W, Uppanan P, Thavornyutikarn B, Krewraing J, Prateepasen R. In vitro comparative hemostatic studies of chitin, chitosan, and their derivatives. *Journal of Applied Polymer Science*. 2006;102:445-51.
22. Janvikul W, Uppanan P, Kosorn W, Phusuksombati D, Prateepasen R, editors. Evaluation of efficacy of Chitosan Derivative Based Hemostat: In Vitro and In Vivo studies. The 2nd International Symposium on Biomedical Engineering (ISBME 2006). 2006, November 8-10; Bangkok, Thailand.
23. Janvikul W, Uppanan P, Thavornyutikarn B, Krewraing J, Prateepasen R. In vitro comparative hemostatic studies of chitin, chitosan, and their derivatives. *J Appl Polym Sci*. 2006;102(1):445-51.
24. Janvikul W, Uppanan P, Thavornyutikarn B, Prateepasen R, Swasdison S. Fibroblast interaction with carboxymethylchitosan-based hydrogels. *Journal of materials science Materials in medicine*. 2007;18(5):943-9.
25. Janvikul W, Uppanan P, Thavornyutikarn B, editors. Calcium Alginate, N,O Carboxymethylchitosan and Their Blends: In Vitro Biocompatibility and Biodegradability. The world Congress on Bioengineering 2007 (WACBE). 2007, July 9-11; Bangkok Thailand. .
26. Janvikul W, Thavornyutikarn B, Kosorn W, Surattanawanich P. Clinical study of chitosan-derivative-based hemostat in the treatment of split-thickness donor sites. *J Maejo International Journal of Science Technology*. 2013;7(3):385.
27. Thavornyutikarn B, Kosorn W, Surattanawanich P, Wongparami U, Janvikul W. Chitosan Derivative-based Hemostat: Irritation, Hypersensitivity and Absorbability Study. *Journal of Metals, Materials and Minerals*. 2013;23:49-52.
28. Wongparami U, Janvikul W, Thavornyutikarn B, Kosorn W. Preliminary Clinical Trial Results on Human Irritation and Delayed-type Hypersensitivity Evaluation of Chitosan Derivative-based Hemostats. *วารสารวิชาการ รพศ/รพท เขต 4*. 2011;13(1):60-9.
29. Phaewphala K, Kosorn W, Janvikul W, Kittrueangphatchara K, Sricholpech M.

Biocompatibility of a Chitosan-derived Hemostatic Agent with Human Alveolar Osteoblasts. *M Dent J.* 2020;40(3):277-88.

30. ชัชวาลย์ ศรีสวัสดิ์. การห้ามเลือด (HEMOSTASIS). กรุงเทพฯ: ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล; 2555.
31. Chatupos V. bleeding disorder in oral surgery. *CM Dent J.* 2006;27(1):25-36.
32. Santhosh Kumar MP. Local hemostatic agents in the management of bleeding in oral surgery. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research.* 2016;9.
33. Matica MA, Aachmann FL, Tøndervik A, Sletta H, Ostafe V. Chitosan as a Wound Dressing Starting Material: Antimicrobial Properties and Mode of Action. *Int J Molecular sciences.* 2019;20(23):5889.
34. Stricker-Krongrad A-H, Alikhassy Z, Matsangos N, Sebastian R, Marti G, Lay F, et al. Efficacy of chitosan-based dressing for control of bleeding in excisional wounds. *J plastic surgery.* 2018;18.
35. Pogorielov MV, Sikora VZ. Chitosan as a hemostatic agent: current state. *European Journal of Medicine.* 2015;2(1):24-33.
36. Fan W, Yan W, Xu Z, Ni H. Erythrocytes load of low molecular weight chitosan nanoparticles as a potential vascular drug delivery system. *Colloids Surfaces B: Biointerfaces.* 2012;95:258-65.
37. Whang HS, Kirsch W, Zhu YH, Yang CZ, Hudson SM. Hemostatic Agents Derived from Chitin and Chitosan. *Journal of Macromolecular Science, Part C.* 2005;45(4):309-23.
38. Rinaudo M. Main properties and current applications of some polysaccharides as biomaterials. *Polymer International.* 2008;57(3):397-430.
39. Lee KY, Mooney DJ. Alginate: Properties and biomedical applications. *Progress in Polymer Science.* 2012;37(1):106-26.
40. Blair S, Jarvis P, Salmon M, McCollum C. Clinical trial of calcium alginate haemostatic swabs. *British Journal of Surgery.* 1990;77(5):568-70.
41. Taskin AK, Yasar M, Ozaydin İ, Kaya B, Bat O, Ankarali S, et al. The hemostatic effect of calcium alginate in experimental splenic injury model. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derd.* 2013;19(3):195-9.

42. Qin Y. Alginate fibres: an overview of the production processes and applications in wound management. *Polymer international*. 2008;57(2):171-80.
43. Thomas S. Alginate dressings in surgery and wound management—Part 1. *Journal of wound care*. 2000;9(2):56-60.
44. Wang C, Luo W, Li P, Li S, Yang Z, Hu Z, et al. Preparation and evaluation of chitosan/alginate porous microspheres/Bletilla striata polysaccharide composite hemostatic sponges. *Carbohydrate Polymers*. 2017;174:432-42.
45. Hattori H, Amano Y, Nogami Y, Takase B, Ishihara M. Hemostasis for Severe Hemorrhage with Photocrosslinkable Chitosan Hydrogel and Calcium Alginate. *Annals of Biomedical Engineering*. 2010;38(12):3724-32.
46. Surattanawanich P, Janvikul W, Thavomyutikarn B, Kosorn W. Preliminary Clinical Study on Resorbability of Chitosan Derivative-based Hemostat in Surgical treatment of Penile Paraffinoma. *วารสารการแพทย์และสาธารณสุขเขต 2.1(1):1-8*.
47. Chiquet M, Katsaros C, Kleetsas D. Multiple functions of gingival and mucoperiosteal fibroblasts in oral wound healing and repair. *Periodontology* 2000. 2015;68(1):21-40.
48. Samali A, Gorman AM, Cotter TG. Apoptosis-the story so far. *Experientia*. 1996;52(10):933-41.
49. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*. 2007;35(4):495-516.
50. Allen RT, Hunter WJ, Agrawal DK. Morphological and biochemical characterization and analysis of apoptosis. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. 1997;37(4):215-28.
51. Al-Nazhan S, Spangberg L. Morphological cell changes due to chemical toxicity of a dental material: An electron microscopic study on human periodontal ligament fibroblasts and L929 cells. *Journal of Endodontics*. 1990;16(3):129-34.
52. Abercrombie M. Fibroblasts. *J Clin Pathol Suppl (R Coll Pathol)*. 1978;12:1-6.
53. De Souza Costa CA, Hebling J, Scheffel DL, Soares DG, Basso FG, Ribeiro AP. Methods to evaluate and strategies to improve the biocompatibility of dental materials and

operative techniques. *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials*. 2014;30(7):769-84.

54. De Jong W, Carraway J, Geertsma R. In vivo and in vitro testing for the biological safety evaluation of biomaterials and medical devices. *Biocompatibility and performance of medical devices*: Elsevier; 2020. p. 123-66.

55. Groth T, Falck P, Miethke R-R. Cytotoxicity of biomaterials—basic mechanisms and in vitro test methods: a review. *J Alternatives to Laboratory Animals*. 1995;23(6):790-9.

56. Li W, Zhou J, Xu Y. Study of the in vitro cytotoxicity testing of medical devices. *J Biomedical reports*. 2015;3(5):617-20.

57. Angspatt A, Taweerattanasil B, Janvikul W, Chokrungrvaranont P, Sirimaharaj W. Carboxymethylchitosan, alginate and tulle gauze wound dressings: a comparative study in the treatment of partial-thickness wounds. *J Asian Biomedicine*. 2011;5(3):413-6.

58. Cree I, Andreotti P. Measurement of cytotoxicity by ATP-based luminescence assay in primary cell cultures and cell lines. *J Toxicology in vitro*. 1997;11(5):553-6.

59. Wang MO, Etheridge JM, Thompson JA, Vorwald CE, Dean D, Fisher JP. Evaluation of the in vitro cytotoxicity of cross-linked biomaterials. *J Biomacromolecules*. 2013;14(5):1321-9.

60. Zhou H-m, Shen Y, Wang Z-j, Li L, Zheng Y-f, Häkkinen L, et al. In vitro cytotoxicity evaluation of a novel root repair material. *J Journal of endodontics*. 2013;39(4):478-83.

61. Asgary S, Moosavi SH, Yadegari Z, Shahriari S. Cytotoxic effect of MTA and CEM cement in human gingival fibroblast cells. Scanning electronic microscope evaluation. *J The New York state dental journal*. 2012;78(2):51-4.

62. Mills JC, Stone NL, Erhardt J, Pittman RN. Apoptotic membrane blebbing is regulated by myosin light chain phosphorylation. *J The Journal of cell biology*. 1998;140(3):627-36.

63. Barros L, Kanaseki T, Sabirov R, Morishima S, Castro J, Bittner C, et al. Apoptotic and necrotic blebs in epithelial cells display similar neck diameters but different kinase dependency. *J Cell Death Differentiation*. 2003;10(6):687-97.

64. Messer RL, Bishop S, Lucas LC. Effects of metallic ion toxicity on human gingival

fibroblasts morphology. *J Biomaterials*. 1999;20(18):1647-57.

65. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Journal of immunological methods*. 1983;65(1-2):55-63.

66. Sgouras D, Duncan R. Methods for the evaluation of biocompatibility of soluble synthetic polymers which have potential for biomedical use: 1—Use of the tetrazolium-based colorimetric assay (MTT) as a preliminary screen for evaluation of in vitro cytotoxicity. *J of Materials Science: Materials in Medicine*. 1990;1(2):61-8.

67. Chan LL-Y, Rice WL, Qiu J. Observation and quantification of the morphological effect of trypan blue rupturing dead or dying cells. *J Plos one*. 2020;15(1):e0227950.

68. McMahon TA, Rohr JR. Trypan blue dye is an effective and inexpensive way to determine the viability of *Batrachochytrium dendrobatidis* zoospores. *J EcoHealth*. 2014;11(2):164-7.

69. Tennant JR. Evaluation of the trypan blue technique for determination of cell viability. *J Transplantation*. 1964;2(6):685-94.

70. Jones KH, Senft JA. An improved method to determine cell viability by simultaneous staining with fluorescein diacetate-propidium iodide. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 1985;33(1):77-9.

71. Chan LL-Y, Kuksin D, Lavery DJ, Saldi S, Qiu J. Morphological observation and analysis using automated image cytometry for the comparison of trypan blue and fluorescence-based viability detection method. *Cytotechnology*. 2015;67(3):461-73.

72. Jimtaisong A, Saewan N. Utilization of carboxymethyl chitosan in cosmetics. *Int j of cosmet sci*. 2014;36(1):12-21.

73. Szekalska M, Pucitowska A, Szymańska E, Ciosek P, Winnicka K. Alginate: Current Use and Future Perspectives in Pharmaceutical and Biomedical Applications. *International Journal of Polymer Science*. 2016;2016:7697031.

74. Anitha A, Divya Rani VV, Krishna R, Sreeja V, Selvamurugan N, Nair SV, et al. Synthesis, characterization, cytotoxicity and antibacterial studies of chitosan, O-carboxymethyl and N,O-carboxymethyl chitosan nanoparticles. *Carbohydrate Polymers*.

2009;78(4):672-7.

75. Abdull Rasad MSB, Halim AS, Hashim K, Rashid AHA, Yusof N, Shamsuddin S. In vitro evaluation of novel chitosan derivatives sheet and paste cytocompatibility on human dermal fibroblasts. *Carbohydrate Polymers*. 2010;79(4):1094-100.
76. Li X, Kong X, Zhang Z, Nan K, Li L, Wang X, et al. Cytotoxicity and biocompatibility evaluation of N,O-carboxymethyl chitosan/oxidized alginate hydrogel for drug delivery application. *International journal of biological macromolecules*. 2012;50(5):1299-305.
77. Shi X, Fang Q, Ding M, Wu J, Ye F, Lv Z, et al. Microspheres of carboxymethyl chitosan, sodium alginate and collagen for a novel hemostatic in vitro study. *Journal of Biomaterials Applications*. 2015;30(7):1092-102.
78. Chen X-G, Wang Z, Liu W-S, Park H-J. The effect of carboxymethyl-chitosan on proliferation and collagen secretion of normal and keloid skin fibroblasts. *Biomaterials*. 2002;23(23):4609-14.
79. Chen R-N, Wang G-M, Chen C-H, Ho H-O, Sheu M-T. Development of N,O-(Carboxymethyl)chitosan/Collagen Matrixes as a Wound Dressing. *Biomacromolecules*. 2006;7(4):1058-64.
80. Geisberger G, Paulus S, Carraro M, Bonchio M, Patzke GR. Synthesis, characterisation and cytotoxicity of polyoxometalate/carboxymethyl chitosan nanocomposites. *Chemistry A European Journal*. 2011;17(16):4619-25.
81. Suzuki Y, Nishimura Y, Tanihara M, Suzuki K, Kitahara AK, Yamawaki Y, et al. Development of alginate gel dressing. *Journal of Artificial Organs*. 1998;1(1):28-32.
82. Suzuki Y, Nishimura Y, Tanihara M, Suzuki K, Nakamura T, Shimizu Y, et al. Evaluation of a novel alginate gel dressing: Cytotoxicity to fibroblasts in vitro and foreign-body reaction in pig skin in vivo. *Journal of Biomedical Materials Research*. 1998;39(2):317-22.
83. Bohari SPM, Hukins DWL, Grover LM. Effect of calcium alginate concentration on viability and proliferation of encapsulated fibroblasts. *Bio-Medical Materials and Engineering*. 2011;21:159-70.
84. Rosdy M, Clauss LC. Cytotoxicity testing of wound dressings using normal human

keratinocytes in culture. *Journal of biomedical materials research*. 1990;24(3):363-77.

85. Paddle-Ledinek JE, Nasa Z, Cleland HJ. Effect of Different Wound Dressings on Cell Viability and Proliferation. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 2006;117(7S).

86. Doyle JW, Roth TP, Smith RM, Li YQ, Dunn RM. Effect of calcium alginate on cellular wound healing processes modeled in vitro. *Journal of Biomedical Materials Research*. 1996;32(4):561-8.

87. Kulesz-Martin M, Fabian D, Bertram J. Differential calcium requirements for growth of mouse skin epithelial and fibroblast cells. *Cell Proliferation*. 1984;17(5):525-33.

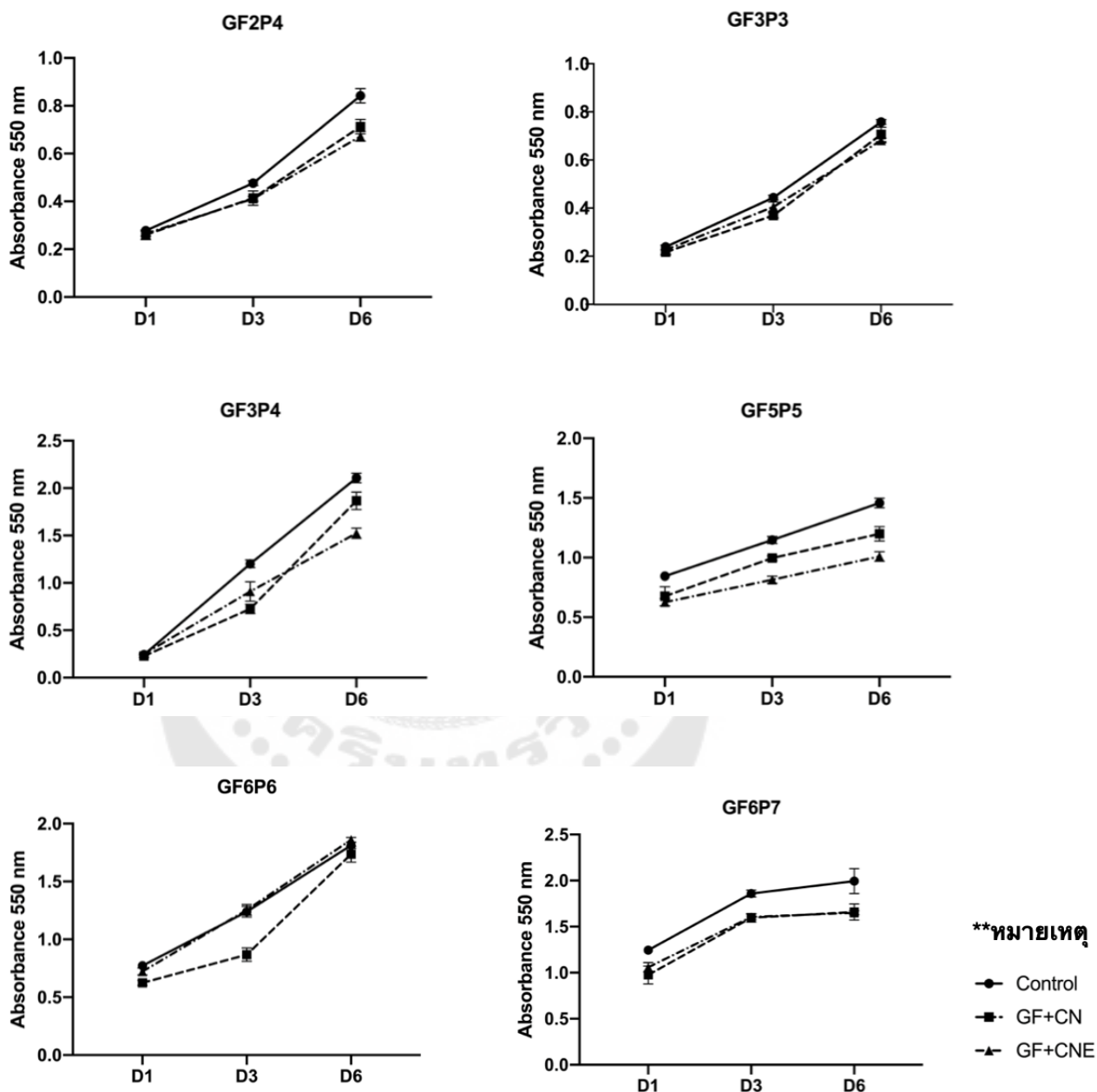
88. Sank A, Chi M, Shima T, Reich R, Martin G. Increased calcium levels alter cellular and molecular events in wound healing. *Surgery*. 1989;106(6):1141-8.

89. Orrenius S, McCabe MJ, Nicotera P. Ca^{2+} -dependent mechanisms of cytotoxicity and programmed cell death. *Toxicol Lett*. 1992;64-65:357-64.

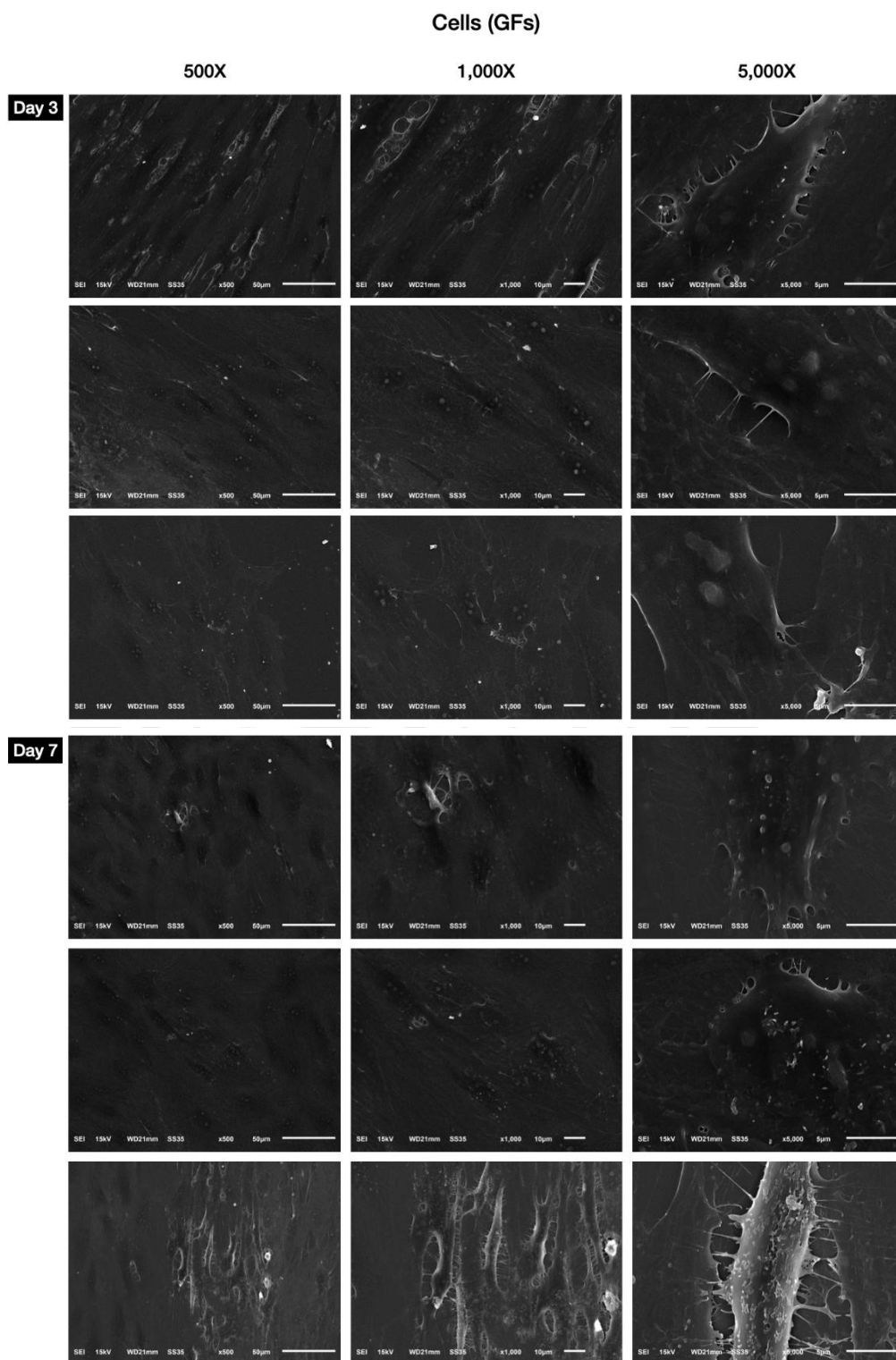


ภาคผนวก

Cell Proliferation of Human gingival fibroblasts

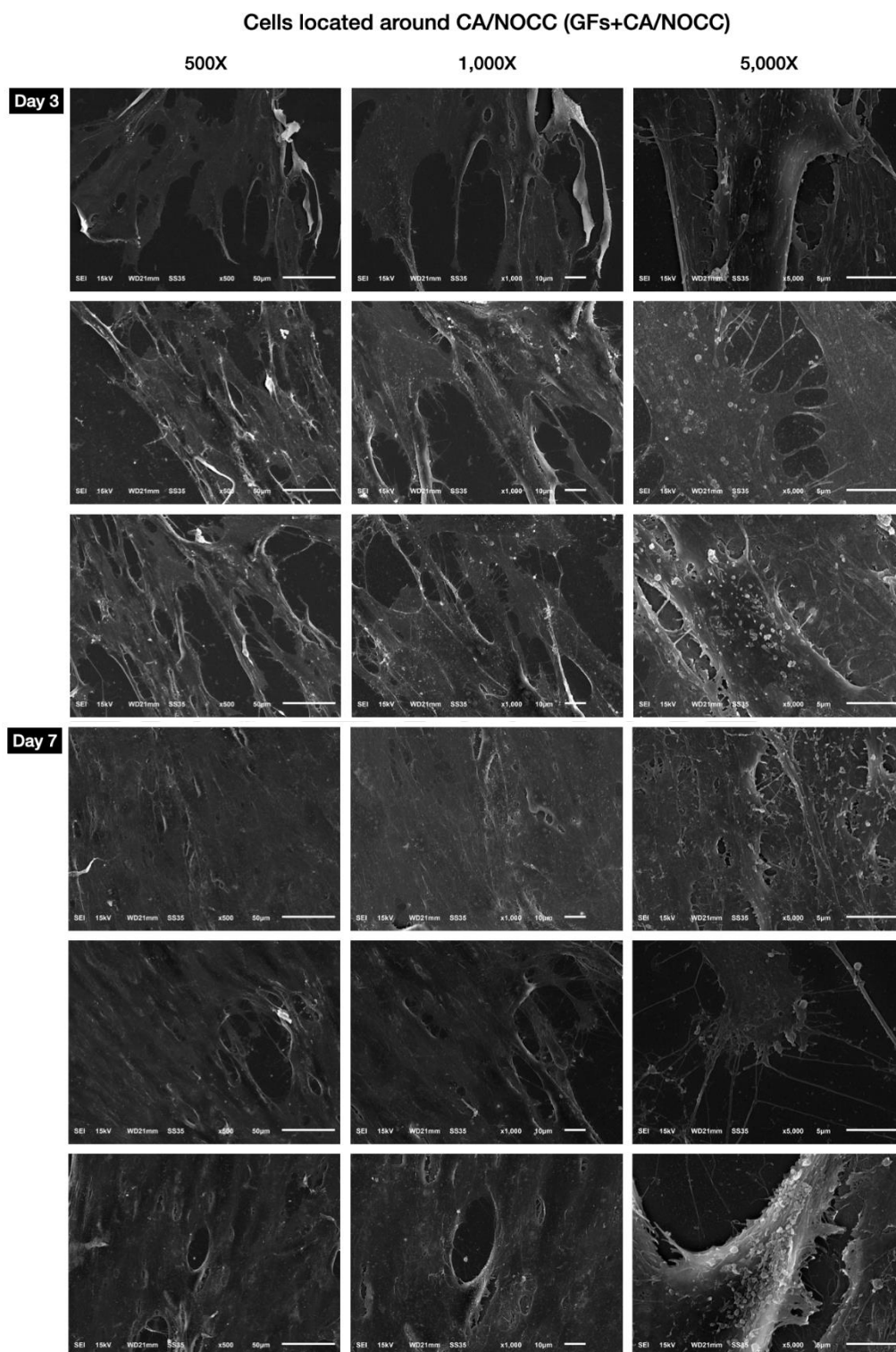


ภาพประกอบ 25 กราฟเส้นแสดงการทดสอบความมีชีวิต (Cell viability) ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ เนื้อเยื่อเหงือก 6 ชุดการทดสอบ ระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบ ในวันที่ 1, 3 และ 6 (GF: gingival fibroblast, CN: CA/NOCC, CNE: CA/NOCC Extract)



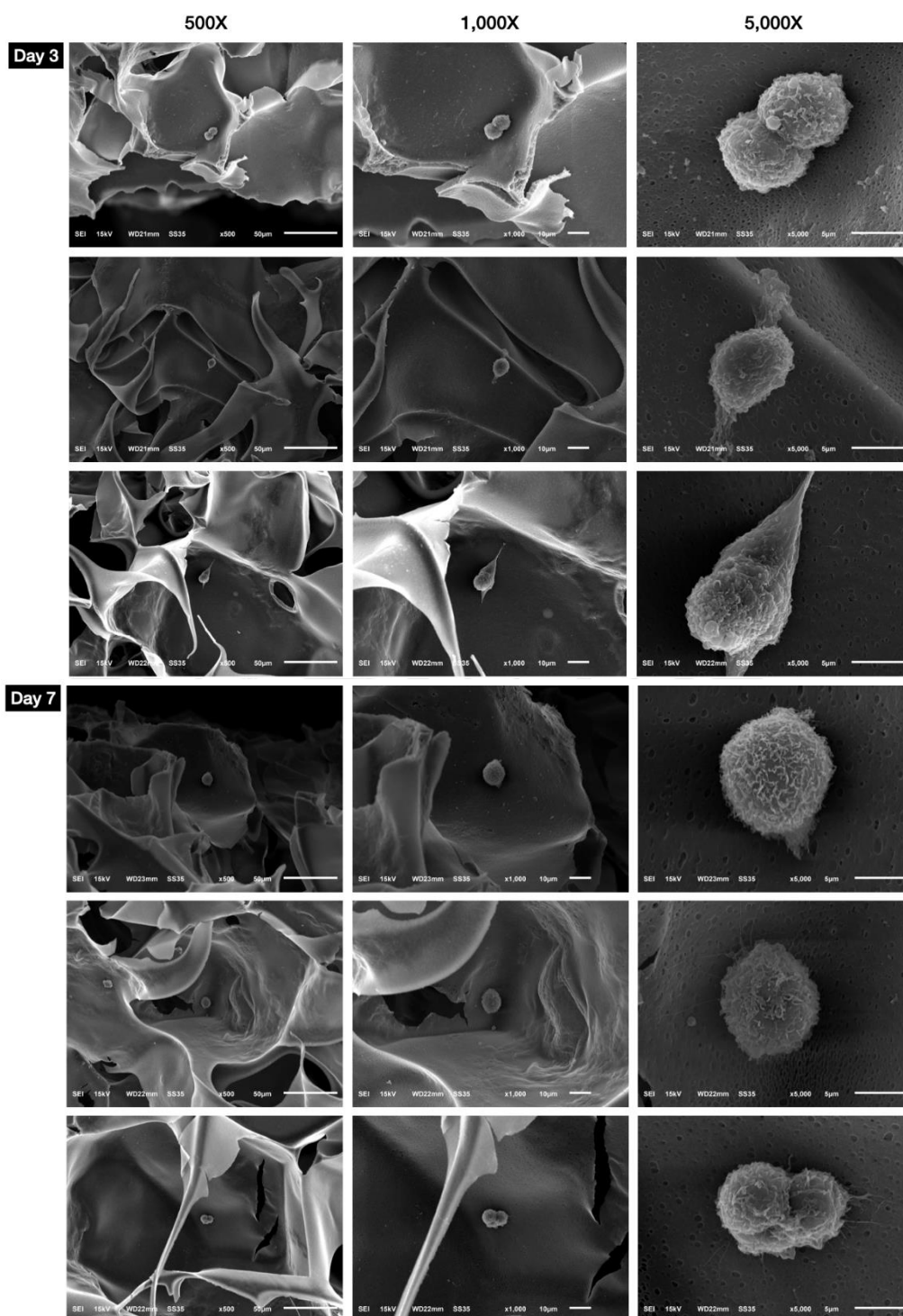
ภาพประกอบ 26 ภาพ SEM แสดงสัณฐานวิทยาของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เนื้อเยื่อเหงือกในกลุ่มควบคุมบนกระจกกันไส (Cover slip) ในการทดสอบวันที่ 3 และวันที่ 7 ที่กำลังขยาย X500

X1,000 และ X5,000 ตามลำดับ



ภาพประกอบ 27 ภาพ SEM แสดงสัณฐานวิทยาของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เนื้อเยื่อเยื่อหุ้มในกลุ่มทดสอบที่เลี้ยงร่วมกับวัสดุห้ามเลือด CA/NOCC บริเวณกระจกอบวัสดุ ในการทดสอบวันที่ 3 และวันที่ 7 ที่กำลังขยาย X500 X1,000 และ X5,000 ตามลำดับ

Cells associated with CA/NOCC (GFs+CA/NOCC)



ภาพประกอบ 28 ภาพ SEM แสดงสัณฐานวิทยาของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เนื้อเยื่อเหงือกในกลุ่มทดสอบที่เลี้ยงร่วมกับวัสดุห้ามเลือดCA/NOCC บริเวณผิววัสดุ ในการทดสอบวันที่ 3 และวันที่ 7 ที่กำลังขยาย X500 X1,000 และ X5,000 ตามลำดับ

MF-04-version-2.0

วันที่ 18 ต.ค. 61



**หนังสือยืนยันการยกเว้นการรับรอง
คณะกรรมการจริยธรรมสำหรับพิจารณาโครงการวิจัยที่ทำในมนุษย์
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ**

(เอกสารนี้เพื่อแสดงว่าคณะกรรมการจริยธรรมสำหรับพิจารณาโครงการวิจัยที่ทำในมนุษย์ ได้พิจารณาโครงการวิจัยนี้)

ชื่อโครงการวิจัย : ผลของวัสดุห้ามเลือดจากอนุพันธ์โคโคซานต่อการทำหน้าที่ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์
เนื้อเยื่อเหงือกของมนุษย์

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัย : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ทันตแพทย์หญิงมานิสา ศรีชลเพชร

หน่วยงานต้นสังกัด : คณะทันตแพทยศาสตร์

รหัสโครงการวิจัย : SWUEC-154/2562X

โครงการวิจัยนี้เป็นโครงการวิจัยที่เข้าข่ายยกเว้น (Research with Exemption from SWUEC)

วันที่ยืนยัน : 4 มิถุนายน 2562

ยืนยันโดย : คณะกรรมการจริยธรรมสำหรับพิจารณาโครงการวิจัยที่ทำในมนุษย์
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

คณะกรรมการจริยธรรมสำหรับพิจารณาโครงการวิจัยที่ทำในมนุษย์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ดำเนินการรับรองโครงการวิจัยตามแนวทางหลักจริยธรรมการวิจัยในคนที่เป็นสากล ได้แก่ Declaration of Helsinki, the Belmont Report, CIOMS Guidelines และ the International Conference on Harmonization in Good Clinical Practice (ICH-GCP)

ออกให้ ณ วันที่ 26 กรกฎาคม 2562

ลงชื่อ.....
(นายปิยชาติ บุญเพ็ญ)
กรรมการและผู้ช่วยเลขานุการคณะกรรมการจริยธรรม
สำหรับพิจารณาโครงการวิจัยที่ทำในมนุษย์

ลงชื่อ.....
(แพทย์หญิงสุรพร ภัทรสุวรรณ)
ประธานคณะกรรมการจริยธรรม
สำหรับพิจารณาโครงการวิจัยที่ทำในมนุษย์

หมายเลขรับรอง : SWUEC/X-154/2562



ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	ทพ.ธนวัฒน์ มหัสธรียพงษ์
วัน เดือน ปี เกิด	13 สิงหาคม 2533
สถานที่เกิด	อำเภอขามเฒ่า จังหวัดกำแพงเพชร
วุฒิการศึกษา	ทันตแพทยศาสตรบัณฑิต คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ พ.ศ. 2557
ที่อยู่ปัจจุบัน	21 หมู่ 4 ตำบลยางสูง อำเภอขามเฒ่า จังหวัดกำแพงเพชร 62130

