



ความเข้ากันได้ทางชีวภาพของวัสดุห้ามเลือดจากอนุพันธ์ไคโตซานที่มีความหลากหลายของ
สัดส่วนการผสมต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นไคปริทันต์ของมนุษย์

BIOCOMPATIBILITY OF THE CHITOSAN-DERIVED HEMOSTATIC AGENTS AT
VARYING COMPOSITION RATIOS ON HUMAN PERIODONTAL LIGAMENT
FIBROBLASTS

วรวพล แซ่เฮ้ง

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

2564

ความเข้ากันได้ทางชีวภาพของวัสดุห้ามเลือดจากอนุพันธ์โคโตซานที่มีความหลากหลายของ
สัดส่วนการผสมต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นดोปริทันต์ของมนุษย์



ปริญญานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาการช่องปากและแม็กซิลโลเฟเชียล
คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ปีการศึกษา 2564
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

BIOCOMPATIBILITY OF THE CHITOSAN-DERIVED HEMOSTATIC AGENTS AT
VARYING COMPOSITION RATIOS ON HUMAN PERIODONTAL LIGAMENT
FIBROBLASTS



WORAPOL SAEHENG

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

2021

Copyright of Srinakharinwirot University

ปริญญานิพนธ์

เรื่อง

ความเข้ากันได้ทางชีวภาพของวัสดุห้ามเลือดจากอนุพันธ์โคโคซานที่มีความหลากหลายของสัดส่วนการผสมต่อเซลล์ไฟ

โบรบลาสท์เอ็นไคปริพันธ์ของมนุษย์

ของ

วรพล แซ่เฮ้ง

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาการช่องปากและแม็กซิลโลเฟเชียล
ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์จักรชัย เอกปัญญาสกุล)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์

ที่ปรึกษาหลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ทพญ.มานิสา ศรีชลเพชร)

ประธาน

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชยารพ สุพรรณชาติ)

กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.ทพญ.อรุณวรรณ หล้าอุบล)

ชื่อเรื่อง	ความเข้ากันได้ทางชีวภาพของวัสดุห้ามเลือดจากอนุพันธ์ไคโตซานที่มีความหลากหลายของสัดส่วนการผสมต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นอีทีปริพันธ์ของมนุษย์
ผู้วิจัย	วรพล แซ่เฮ้ง
ปริญญา	วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต
ปีการศึกษา	2564
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ทพญ. มานีสา ศรีชลเพ็ชร

วัสดุห้ามเลือดจากอนุพันธ์ไคโตซาน Calcium Alginate/N, O-carboxymethyl chitosan (CA/NOCC: CN) เป็นวัสดุที่มีความเข้ากันได้กับผิวหนังของมนุษย์ ก่อนการพัฒนาวัสดุนี้มาใช้ห้ามเลือดในช่องปาก ความเข้ากันได้ทางชีวภาพของวัสดุ CA/NOCC ในสัดส่วน 80:20 ได้รับการทดสอบและแสดงความเข้ากันได้กับเซลล์สร้างกระดูกของมนุษย์ แต่แสดงผลที่เป็นพิษต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์เนื้อเยื่อเหงือกของมนุษย์ ซึ่งคาดว่าความเป็นพิษต่อเซลล์อาจมาจากแคลเซียมไอออนระดับสูงที่ปลดปล่อยออกมาจากวัสดุ CA/NOCC งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของวัสดุ CA/NOCC ที่เตรียมในหลายสัดส่วน ต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นอีทีปริพันธ์ โดยประเมินลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด และอัตราการเพิ่มจำนวนของเซลล์ด้วยวิธีเอ็มทีทีจากวันที่ 1-6 วัสดุ CA/NOCC ถูกผลิตในหลายสัดส่วน ได้แก่ 100%CA CN80/20 CN25/75 และ 100%NOCC ในรูปแบบปกติและรูปแบบที่มีการเชื่อมขวาง (cross-linked) ในโครงสร้างของวัสดุเพื่อลดการสลายตัวขององค์ประกอบ NOCC กลุ่มควบคุมคือกลุ่มที่มีการเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นอีทีปริพันธ์เท่านั้น จากผลการทดลอง การลดสัดส่วนองค์ประกอบของ CA หรือการกำจัดแคลเซียมไอออนจากวัสดุด้วยการล้างก่อนการทดสอบ ไม่ได้ส่งผลให้เซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นอีทีปริพันธ์มีอัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบกับวัสดุในสัดส่วนเดียวกัน เซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นอีทีปริพันธ์ในกลุ่ม CA/NOCC ที่ผ่านกระบวนการเชื่อมขวาง มีอัตราการเพิ่มจำนวนที่เพิ่มขึ้นเล็กน้อย นอกจากนี้อัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์ในทุกกลุ่มวัสดุทดสอบที่ผ่านกระบวนการเชื่อมขวาง (100%CA, CN80/20, CN25/75, and 100%NOCC) อยู่ที่ประมาณร้อยละ 70 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม แต่เมื่อทำการกำจัดแคลเซียมไอออนจากวัสดุกลุ่มดังกล่าวด้วยการล้างก่อนการทดสอบ อัตราการเพิ่มจำนวนของเซลล์ในทุกกลุ่มทดสอบส่วนใหญ่ไม่ค่อยเปลี่ยนแปลง ยกเว้นเซลล์ในกลุ่ม 100%NOCC-W ที่มีอัตราเพิ่มจำนวนของเซลล์ประมาณร้อยละ 55 ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบส่วนใหญ่ อีกทั้งเซลล์ในกลุ่มนี้มีลักษณะพื้นผิวที่ขรุขระมากที่สุดจากการปรากฏเส้นใย (fibrils) และตุ่มพองใส (blebs) โดยสรุปแล้วการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าองค์ประกอบในวัสดุห้ามเลือด CA/NOCC ที่มีความเป็นไปได้สูงที่จะส่งผลโดยเป็นพิษต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นอีทีปริพันธ์ น่าจะมาจากองค์ประกอบการสลายตัวของ NOCC นอกจากนี้ส่วนของ CA ที่อยู่ในวัสดุกลุ่มต่างๆอาจมีส่วนร่วมในการการส่งผลเชิงลบต่อเซลล์ด้วย จากการพบอัตราการเพิ่มของเซลล์ลดลงร้อยละ 30 ในทุกกลุ่ม ดังนั้นอาจมีความจำเป็นในการค้นหาองค์ประกอบของวัสดุที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ในการศึกษาในอนาคต

คำสำคัญ : ไฟโบรบลาสต์เอ็นอีทีปริพันธ์, แคลเซียมอัลจินต, คาร์บอกซีเมทิลไคโตซาน

Title	BIOCOMPATIBILITY OF THE CHITOSAN-DERIVED HEMOSTATIC AGENTS AT VARYING COMPOSITION RATIOS ON HUMAN PERIODONTAL LIGAMENT FIBROBLASTS
Author	WORAPOL SAEHENG
Degree	MASTER OF SCIENCE
Academic Year	2021
Thesis Advisor	Assistant Professor Marnisa Sricholpech , Ph.D.

The chitosan-derived hemostatic material, Calcium Alginate/N, O-carboxymethyl chitosan (CA/NOCC: CN) has been shown to be biocompatible with human skin. Prior to its use for bleeding control in the oral cavity, the biocompatibility of the CA/NOCC material at the ratio of 80:20 was tested and shown to be cytocompatible with human primary osteoblasts, while cytotoxic effects were observed in human primary gingival fibroblasts. From that study, high level of calcium ion released from CA/NOCC was suggested as a the cytotoxic component. This study aimed to investigate the effects of the CA/NOCC materials of varying ratios on periodontal ligament fibroblasts (PDLFs). Cell morphology was evaluated by scanning electron microscopy, while cell proliferation rates were determined by using MTT assays from days 1-6. CA/NOCC materials were developed at varying composition ratios i.e., 100%CA, CN80/20, CN25/75, and 100%NOCC in their normal and cross-linked form, which decreased the degradation rate of the NOCC component. The normal culture of PDLFs was used as the control. From our result, the reduction of the CA component or prewashing the CA/NOCC materials decreased the levels of calcium ion release and did not result in the increase of PDLFs proliferation rates. However, among the same component ratio, PDLFs in the cross-linked CA/NOCC groups showed slightly higher proliferation rates. In addition, the proliferation of PDLFs in all the cross-linked material test groups (100%CA, CN80/20, CN25/75, and 100%NOCC) were about 70% of the control. Interestingly, by prewashing the cross-linked materials, PDLFs proliferation rates in most of the test groups were relatively unchanged, except in the 100%NOCC-W group (55%), which was significantly lower compared to the control and most test groups. Besides, their cell surface was the most irregular from the formation of numerous fibrils and cellular blebbing. In summary, this study has shown that the potential component in the CA/NOCC material which is cytotoxic to the PDLFs is mostly likely the degradation product of NOCC. Moreover, there might be some negative contribution from the groups of materials containing CA as well, since they resulted in about 30% decrease of PDLFs proliferation rates. Therefore, future studies to identify the cytotoxic components might be warranted.

Keyword : Peridontal ligament fibroblast, Calcium alginate, Carboxymethyl chitosan

กิตติกรรมประกาศ

ปริญญานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความสามารถ ความช่วยเหลือ และความเอาใจใส่อย่างดียิ่งตลอดจนการให้คำแนะนำ และข้อคิดเห็นที่เป็นประโยชน์สำหรับการปรับแก้ไขข้อบกพร่องจากคณะกรรมการผู้ควบคุมปริญญานิพนธ์

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ทพญ.ดร.มานิสา ศรีชลเพ็ชร ที่ได้ให้ความเมตตากรุณาเป็นที่ปรึกษา และให้ความช่วยเหลือชี้แนะแนวทางที่เป็นประโยชน์ต่อการศึกษา และการทำปริญญานิพนธ์นี้ด้วยความเอาใจใส่อย่างดียิ่งตลอดมา

ขอกราบขอบพระคุณคณะผู้วิจัยนำโดย ดร.วนิดา จันทรวีกุล จากศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ (MTEC) ที่ได้กรุณาให้ความอนุเคราะห์ในการให้ข้อมูลความรู้ตลอดจนการสนับสนุนผลิตวัสดุห้ามเลือดจากอนุพันธุ์โคโตซานที่ใช้ทดสอบกับเซลล์ในการศึกษาครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ และกรรมการบริหารหลักสูตรสาขาวิทยาการช่องปาก และแม็กซิลโลเฟเชียลคณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒทุกท่านที่ได้กรุณาประสิทธิ์ประสาทความรู้ต่างๆ ให้แก่ผู้วิจัยตลอดจนให้ความช่วยเหลือในการทำวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณภาควิชาโสตศูรวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒที่กรุณาอนุเคราะห์สถานที่ และอุปกรณ์หลักในการทำวิจัย รวมถึงเจ้าหน้าที่ประจำห้องปฏิบัติการชั้น 10 ที่คอยช่วยเหลือ และอำนวยความสะดวกตลอดการทำงานวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณทุนอุดหนุนการวิจัยจากโรงพยาบาลทันตกรรมคณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒที่ทำให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณ ทพญ.กัลติมาศ แผลวฉลา และทพ.ธนวัฒน์ มหฺสฉริยพงษ์ รุ่นพี่ในกลุ่มผู้วิจัยของผู้ช่วยศาสตราจารย์ ทพญ.ดร.มานิสา ศรีชลเพ็ชร ที่ถ่ายทอดความรู้ และให้คำแนะนำต่างๆ ในการทำวิจัยให้สำเร็จลุล่วงได้เป็นอย่างดี

ขอขอบคุณพี่ๆ และเพื่อนๆ สาขาวิทยาการช่องปากและแม็กซิลโลเฟเชียลรวมถึงบุคคลอีกหลายท่านที่ไม่ได้กล่าวนามไว้ ณ ที่นี้ที่ได้ให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจให้กับผู้วิจัยมาโดยตลอด

สุดท้ายนี้ ผู้วิจัยขอโน้มรำลึกถึงคุณของบิดา มารดา และครูอาจารย์ที่อบรมสั่งสอนให้ความรู้เป็นกำลังใจ และให้การสนับสนุนผู้วิจัยด้วยดีตลอดมา



สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญรูปภาพ	ฎ
บทที่ 1 บทนำ.....	15
ภูมิหลัง	15
ความมุ่งหมายของงานวิจัย.....	16
ความสำคัญของงานวิจัย	16
ขอบเขตของการวิจัย	16
นิยามคำศัพท์เฉพาะ	17
กรอบแนวคิดในการวิจัย	18
สมมติฐานงานวิจัย.....	18
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	19
วัสดุห้ามเลือดเฉพาะที่ (Local hemostatic agent)	20
ไคติน ไคโตซาน และ HemCon [®] dental dressing.....	25
กลไกการห้ามเลือดของไคโตซาน (Hemostatic mechanisms of chitosan)	28
วัสดุห้ามเลือดจากอนุพันธ์ไคโตซาน N, O-carboxymethyl chitosan (NOCC)	31
เอ็นยี่ดปริทันต์ (Periodontal ligament หรือ PDL)	37
วิธีการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cell viability assays)	38

แคลเซียมไอออน (calcium ion).....	41
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	43
การกำหนดกลุ่มประชากรและการเลือกกลุ่มตัวอย่าง.....	43
ขั้นตอนการทดลอง.....	43
การเก็บรวบรวมข้อมูล.....	46
สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล.....	46
บทที่ 4 ผลการดำเนินงานวิจัย.....	47
ปริมาณของแคลเซียมไอออน.....	47
การเพิ่มจำนวนของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นดอทีเลียล.....	49
ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นดอทีเลียล.....	54
บทที่ 5 สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.....	60
อภิปรายผลการวิจัย.....	60
สรุปผลการวิจัย.....	64
ข้อเสนอแนะ.....	64
บรรณานุกรม.....	65
ภาคผนวก.....	74
ประวัติผู้เขียน.....	77

สารบัญตาราง

หน้า

ตาราง 1 ชื่อทางการค้า และกระบวนการห้ามเลือดของวัสดุห้ามเลือดต่าง ๆ ในปัจจุบัน.....	24
ตาราง 2 แสดงค่าเฉลี่ย (mean) ของปริมาณแคลเซียมไอออน (มิลลิโมลาร์ หรือ mM) และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ที่วัดได้ ณ วันที่ 1 3 และ 6 ของกลุ่ม PDLFs (กลุ่มควบคุม) CN80/20 และ CN25/75	50



สารบัญรูปภาพ

หน้า

ภาพประกอบ 1 กรอบแนวคิดในการวิจัย	18
ภาพประกอบ 2 ภาพแสดงโครงสร้างของไคติน ไคโตซานที่ไม่มีประจุ และไคโตซานที่มีประจุเป็นบวก โดยผ่านกระบวนการ deacetylation.....	26
ภาพประกอบ 3 ภาพแสดงขนาดของวัสดุห้ามเลือด HemCon [®] bandage (ชาย) และ HemCon [®] dental dressing (ขาว)	27
ภาพประกอบ 4 ภาพแสดงรูปแบบของปฏิกิริยาการแข็งตัวของเลือดบนพื้นผิววัสดุ (FXIIa, FXIa, FIXa และ FXa เปลี่ยนแปลงไปเป็น XII, XI, IX และ X ตามลำดับ).....	30
ภาพประกอบ 5 ภาพแสดงกระบวนการห้ามเลือดด้วยการก่อตัวเป็นเจล (gelling hemostatic mechanism) ของส่วนประกอบที่ไม่ชอบน้ำของไคโตซาน และเซลล์เม็ดเลือดแดงทำปฏิกิริยากันเป็นร่างแห	31
ภาพประกอบ 6 ภาพแสดงอนุพันธ์ของไคโตซานตามค่า DS จากการเกิด carboxylation โดยมีค่า DS น้อยกว่า 1 ได้เป็นสาร O-carboxymethyl chitosan (A) และมีค่า DS มากกว่าหรือเท่ากับ 1 ได้เป็นสาร N, O-carboxymethyl chitosan (B)	32
ภาพประกอบ 7 ภาพแสดงผลการทดลองของระยะเวลาในการห้ามเลือด (bleeding time)	33
ภาพประกอบ 8 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์สร้างกระดูกที่เลี้ยงมาเป็นระยะเวลา 3 วัน บนแผ่นกระจกกันใส โดยเซลล์สร้างกระดูกที่ปราศจาก CA/NOCC เป็นกลุ่มควบคุม (OBs) และเซลล์สร้างกระดูกที่มี CA/NOCC เป็นกลุ่มทดสอบ (OBs+CA/NOCC) กำลังขยาย 250X 1000X และ 3000X และกราฟแท่งแสดงอัตราการเพิ่มจำนวนของเซลล์ที่พบว่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ.....	35
ภาพประกอบ 9 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เนื้อเยื่อเหงือกที่เลี้ยงมาเป็นระยะเวลา 3 วัน บนแผ่นกระจกกันใส โดยเซลล์ไฟโบรบลาสต์เนื้อเยื่อเหงือกที่ปราศจาก CA/NOCC เป็นกลุ่มควบคุม (GFs) และเซลล์ไฟโบรบลาสต์เนื้อเยื่อเหงือกที่มี CA/NOCC เป็นกลุ่มทดสอบ (GFs+CA/NOCC) กำลังขยาย 500X และ 3000X ตามลำดับ ลูกศรชี้เหลืองชี้บริเวณตุ่มพองใส (cellular blebbing) ที่เกิดขึ้นบนผิวเซลล์ และกราฟแท่งแสดงอัตราการเพิ่มจำนวนของ	

เซลล์ของกลุ่ม GFs+CA/NOCC ที่น้อยกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p - value < 0.0001)	36
ภาพประกอบ 10 ภาพแสดงโครงสร้างของ MTT ที่ทำปฏิกิริยากับ NADH ได้เป็นสาร formazan	39
ภาพประกอบ 11 ภาพแสดงโครงสร้างของ resazurin และ resorufin ภายหลังการรับอิเล็กตรอนจากเซลล์ที่มีชีวิต	40
ภาพประกอบ 12 รูปแสดงปริมาณแคลเซียมไอออนในอาหารเลี้ยงเซลล์ใน วันที่ 1, 3 และ 6 ตามลำดับ โดยเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของปริมาณแคลเซียมไอออนเป็นมิลลิโมลาร์ (mM) ระหว่าง 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ หรือกลุ่มควบคุม (PDLFs) กลุ่มที่เลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์ร่วมกับวัสดุหุ้มเลือดสัดส่วน 80:20 และ 25:75 (CN80/20 และ CN25/75 ตามลำดับ) (**** มีนัยสำคัญทางสถิติ p - value < 0.0001, ** มีนัยสำคัญทางสถิติ p - value < 0.01 และ ns ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ) (n = 2x2 หลุม)	49
ภาพประกอบ 13 กราฟแท่งแสดงอัตราการเพิ่มจำนวนของเซลล์ในกลุ่ม PDLFs (กลุ่มควบคุม) ,CN80/20 และ CN25/75 พบว่ากลุ่ม CN80/20 และ CN25/75 มีอัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์น้อยกว่ากลุ่ม PDLFs อย่างมีนัยสำคัญ (**** มีนัยสำคัญทางสถิติ p - value < 0.0001 และ ns ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ) (n = 4x2 หลุม).....	50
ภาพประกอบ 14 กราฟแท่งแสดงอัตราการเพิ่มจำนวนของเซลล์เปรียบเทียบการทดสอบแบบปกติกับแบบ pre-washed โดยพบกลุ่ม CN25/75-W มีอัตราการเพิ่มจำนวนของเซลล์น้อยกว่า CN25/75 และ CN80/20 (**** มีนัยสำคัญทางสถิติ p - value < 0.0001, ** มีนัยสำคัญทางสถิติ p - value < 0.01 และ * มีนัยสำคัญทางสถิติ p - value < 0.05) (n = 2x2 หลุม)	52
ภาพประกอบ 15 กราฟแท่งแสดงอัตราการเพิ่มจำนวนของเซลล์เปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม PDLFs (กลุ่มควบคุม) และวัสดุหุ้ม CA/NOCC ที่เตรียมแบบปกติ และแบบ cross-link (กลุ่มทดสอบ) ในสัดส่วน 80:20 และ 25:75 (**** มีนัยสำคัญทางสถิติ p - value < 0.0001, *** มีนัยสำคัญทางสถิติ p - value < 0.001 และ ns ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ) (n = 4x2 หลุม)	53
ภาพประกอบ 16 กราฟแท่งแสดงอัตราการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นยัดปริพันธ์ที่เลี้ยงร่วมกับวัสดุหุ้มเลือด CA/NOCC ที่ผ่านการ cross-link สัดส่วนต่างๆ โดยการทดสอบแบบปกติ และแบบ pre-washed (**** มีนัยสำคัญทางสถิติ p - value < 0.0001, *** มีนัยสำคัญทาง	

สถิติ p - value < 0.001, ** มีนัยสำคัญทางสถิติ p - value < 0.01 และ * มีนัยสำคัญทางสถิติ p - value < 0.05) (n = 4x2 กลุ่ม)..... 54

ภาพประกอบ 17 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นยิดปริทัศน์ที่เลี้ยงมาเป็นระยะเวลา 7 วัน บนแผ่นกระจกใส โดยมีกลุ่มควบคุม (PDLFs) และกลุ่มทดสอบที่ทำการเลี้ยงเซลล์ร่วมกับวัสดุห้ามเลือด CA/NOCC สัดส่วนต่างๆ ที่ผ่านการ cross-link โดยทำการทดสอบแบบปกติ (ด้านซ้าย) และแบบ pre-washed (ด้านขวา) ที่กำลังขยาย 1000X และ 4000X ตามลำดับ 55

ภาพประกอบ 18 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นยิดปริทัศน์ที่เลี้ยงมาเป็นระยะเวลา 7 วัน บนแผ่นกระจกใส โดยเป็นภาพของเซลล์ในกลุ่ม PDLF 100%NOCC และ 100%NOCC-W ที่กำลังขยาย 250X, 1000X และ 4000X ตามลำดับ ลูกศรชี้เหลืองแสดงตุ่มพองใส (blebs) ที่พบบนผิวของเซลล์ 56

ภาพประกอบ 19 ลักษณะของวัสดุห้ามเลือด CA/NOCC ที่ผ่านการเลี้ยงร่วมกับเซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นยิดปริทัศน์เป็นระยะเวลา 7 วัน โดยภาพทางฝั่งด้านซ้ายเป็นของวัสดุที่เลี้ยงเซลล์ แบบปกติ ส่วนภาพทางฝั่งด้านขวาเป็นของวัสดุที่ผ่านการ pre-washed ก่อนเลี้ยงกับเซลล์ ทำการวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) ที่กำลังขยาย 100X และ 250X . 57

ภาพประกอบ 20 ลักษณะของเซลล์บนวัสดุห้ามเลือด CA/NOCC ในสัดส่วนต่างๆ ที่ผ่านการ cross-link และเลี้ยงร่วมกับเซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นยิดปริทัศน์เป็นระยะเวลา 7 วัน โดยภาพทางฝั่งด้านซ้ายเป็นของวัสดุที่เลี้ยงเซลล์แบบปกติ ส่วนภาพทางฝั่งด้านขวาเป็นของวัสดุที่ผ่านการ pre-washed ก่อนเลี้ยงกับเซลล์ ทำการวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) ที่กำลังขยาย 1000X และ 4000X 58

ภาพประกอบ 21 ลักษณะวัสดุห้ามเลือด CA/NOCC สัดส่วนต่างๆ ที่ทดสอบแบบปกติ และแบบ pre-washed..... 59

ภาพประกอบ 22 ลักษณะวัสดุห้ามเลือด CA/NOCC สัดส่วนต่างๆ ที่ผ่านการเลี้ยงร่วมกับเซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นยิดปริทัศน์เป็นระยะเวลา 7 วัน มีการเตรียมชิ้นงานด้วยสารละลายต่างๆ และทำให้แห้ง เพื่อทำการวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) 59

ภาพประกอบ 23 ภาพหนังสือยืนยันการยกเว้นการรับรองคณะกรรมการจริยธรรมสำหรับพิจารณาโครงการวิจัยที่ทำในมนุษยมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒของโครงการวิจัยนี้ (หมายเลขรับรอง :

SWUEC/X-022/2563) 75

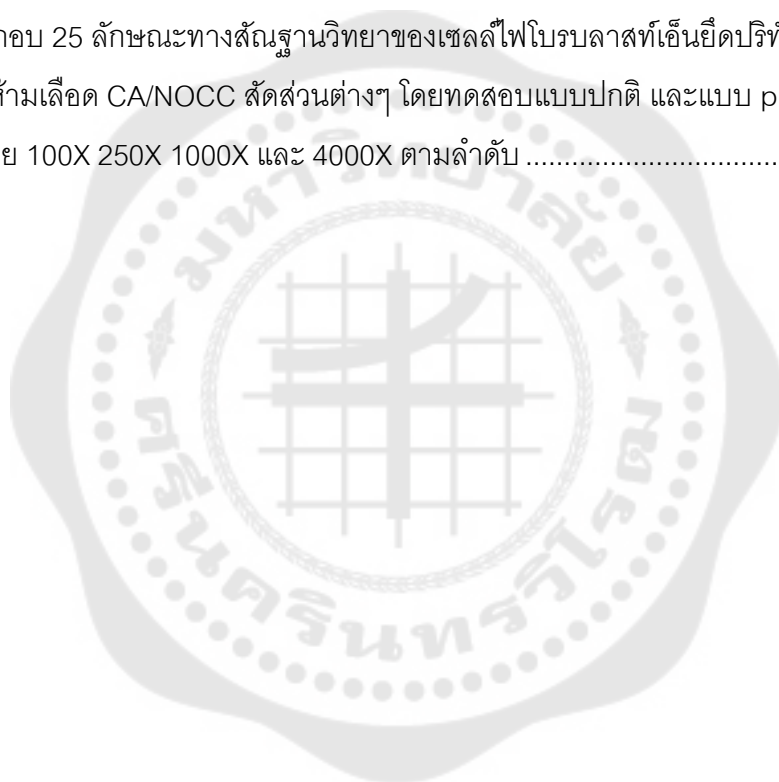
ภาพประกอบ 24 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นดอทีเลียลที่เลี้ยงมาเป็นระยะเวลา 7 วัน บนแผ่นกระจกใส โดยมีกลุ่ม PDLF และกลุ่มที่ทดสอบกับวัสดุห้ามเลือด

CA/NOCC สัดส่วนต่างๆ โดยทดสอบแบบปกติ และแบบ pre-washed ที่กำลังขยาย 250X

1000X และ 4000X ตามลำดับ 76

ภาพประกอบ 25 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นดอทีเลียล และลักษณะของวัสดุห้ามเลือด CA/NOCC สัดส่วนต่างๆ โดยทดสอบแบบปกติ และแบบ pre-washed ที่

กำลังขยาย 100X 250X 1000X และ 4000X ตามลำดับ 76



บทที่ 1

บทนำ

ภูมิหลัง

Carboxymethyl chitosan เป็นสารอนุพันธ์ไคโตซานชนิดหนึ่งที่กำลังพัฒนาขึ้นมา เพื่อให้มีคุณสมบัติการละลายในช่วง pH ที่หลากหลาย และมีคุณสมบัติทางชีวภาพที่ดีกว่าไคโตซานในหลายๆ ด้าน (1) โดยมีการศึกษาที่พบว่าสารอนุพันธ์ไคโตซานมีคุณสมบัติที่ดีต่อมนุษย์ มีความเข้ากันได้ดีกับเนื้อเยื่อ ไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ และมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียได้ (2, 3) สามารถนำมาใช้ในวิทยาการทางการแพทย์ได้หลากหลายรูปแบบ เช่น ในการนำสารอนุพันธ์ไคโตซานมาผลิตเป็นวัสดุห้ามเลือด เนื่องจากวัสดุห้ามเลือดชนิดนี้จะมีประจุเป็นบวกภายในโครงสร้างทำให้เกิดปฏิกิริยาดึงดูดเกล็ดเลือด และเม็ดเลือดแดงที่มีประจุเป็นลบ ส่งเสริมให้เกิดกระบวนการห้ามเลือดได้อย่างมีประสิทธิภาพ (4) วัสดุห้ามเลือดอนุพันธ์ไคโตซานจึงมีประโยชน์ในการนำไปใช้ห้ามเลือดเฉพาะที่ในผู้ป่วยที่ได้รับการบาดเจ็บกลายเป็นลิ่มของเลือดโดยไม่ต้องหยุดยา ทำให้ลดโอกาสการเกิดภาวะหัวใจขาดเลือด และภาวะหัวใจล้มเหลวได้ (5)

ก่อนหน้านี้กลุ่มนักวิจัยของศูนย์เทคโนโลยีโลหะ และวัสดุแห่งชาติ (MTEC) ได้พัฒนาคุณสมบัติของสารห้ามเลือดอนุพันธ์ไคโตซานอีกรูปแบบหนึ่งขึ้นมา คือ calcium alginate/ N, O-carboxymethyl chitosan (CA/NOCC) เป็นสารที่ถูกเตรียมโดยใช้สารองค์ประกอบของโซเดียมอัลจีเนต (sodium alginate: SA) กับ N, O-carboxymethyl chitosan (NOCC) ขึ้นรูปเป็นวัสดุคล้ายฟองน้ำ ที่นำไปจุ่มลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ เพื่อให้เกิดการแลกเปลี่ยน Na^+ - Ca^{2+} แล้วได้เป็นวัสดุห้ามเลือด CA/NOCC ซึ่งผ่านการทดสอบคุณสมบัติในระดับห้องปฏิบัติการ และในสัตว์ทดลองมาแล้ว โดยพบว่าไม่เป็นพิษต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของหนูชนิด L929 และเซลล์ไฟโบรบลาสต์มนุษย์ (6-8) และสามารถห้ามเลือดได้ดีในการทดสอบกับหนูทดลอง (9) นอกจากนี้มีการนำไปทดลองบนผิวหนังของมนุษย์พบว่าสามารถห้ามเลือดได้อย่างมีประสิทธิภาพ และปลอดภัย (10) โดยไม่ก่อให้เกิดการระคายเคือง (11) ไม่ทำให้เกิดอาการแพ้ และสามารถสลายตัวได้เมื่อใช้ในการผ่าตัดรักษาการฉีกขาดแผลปลอมเข้าไปในองคชาติ (12)

วัสดุห้ามเลือด CA/NOCC จึงได้รับความสนใจในการนำมาใช้ห้ามเลือดในงานศัลยกรรมในช่องปาก โดยเบื้องต้นมีการศึกษาความเข้ากันได้ทางชีวภาพของวัสดุห้ามเลือด CA/NOCC กับเซลล์ปฐมภูมิที่ผ่านการคัดแยกจากเนื้อเยื่อในช่องปาก ได้แก่ กระดูกขากรรไกร เนื้อเยื่อเหงือก และเอ็นยึดปริทันต์ เมื่อนำวัสดุห้ามเลือด CA/NOCC ที่มีสัดส่วนน้ำหนัก 80:20 มาทดสอบพบว่าวัสดุห้ามเลือดไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์สร้างกระดูก (13) ในขณะที่เมื่อทดสอบกับเซลล์

ไฟโบรบลาสต์เนื้อเยื่อเหงือก กลับพบความผิดปกติของลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ และมีการลดลงของอัตราการเพิ่มจำนวนของเซลล์ (14) โดยคาดว่าอาจเป็นผลมาจากปริมาณแคลเซียมไฮดรอกไซด์ที่ปลดปล่อยจากวัสดุห้ามเลือด CA/NOCC สู่อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มากกว่าปกติ (14) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ที่รายงานว่าเมื่อมีปริมาณแคลเซียมไฮดรอกไซด์ภายนอกเซลล์มากเกินไปจะทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ โดยเกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์โดยมีการยื่นออกของผิวเซลล์ (protrusion) หรือเกิดการสร้างตุ่มพองใส (bleb formation) (15) หรือพบว่าเมื่อผลทำให้อัตราการเพิ่มจำนวนของเซลล์ลดลง (16, 17) จึงเป็นไปได้ว่าระดับของแคลเซียมไฮดรอกไซด์ภายนอกเซลล์อาจมีผลต่อการมีชีวิต รูปร่าง และการทำหน้าที่ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีจุดมุ่งหมายในการศึกษาการตอบสนองของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นไคปริทันต์ของมนุษย์กับวัสดุห้ามเลือด CA/NOCC ที่มีการปรับสัดส่วนการผสมของ sodium alginate กับ NOCC ที่จะส่งผลให้สัดส่วนของ CA เปลี่ยนแปลงไป โดยทดสอบกับเซลล์เพื่อศึกษาการตอบสนองของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นไคปริทันต์ของมนุษย์

ความมุ่งหมายของงานวิจัย

เพื่อประเมินผลของวัสดุห้ามเลือด CA/NOCC ที่มีการปรับสัดส่วนการผสมของ calcium alginate กับ NOCC ต่อการทำหน้าที่ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นไคปริทันต์

ความสำคัญของงานวิจัย

เมื่อทดสอบวัสดุห้ามเลือด CA/NOCC ที่มีความหลากหลายของสัดส่วนการผสม แล้วพบความเข้ากันได้ทางชีวภาพของวัสดุ กับเซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นไคปริทันต์ คือ เซลล์มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่เป็นปกติ และมีอัตราการเพิ่มจำนวนของเซลล์ที่ดีขึ้น ทำให้สามารถนำความรู้ที่ได้มาปรับใช้ เพื่อพัฒนาวัสดุห้ามเลือด CA/NOCC ให้เป็นประโยชน์ในงานศัลยกรรมในช่องปากในอนาคตได้

ขอบเขตของการวิจัย

ประชากรที่ใช้ในการวิจัย

เซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นไคปริทันต์ที่ผ่านการคัดแยกมาจากเนื้อเยื่อเอ็นไคปริทันต์ที่อยู่บริเวณผิวรากฟันของผู้ที่ให้ความยินยอม เก็บไว้ในคลังเก็บเซลล์ และได้รับการรับรองจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ (SWUEC-022/2563X)

กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัย

เซลล์ไฟโบรบลาสท์เอ็นไนด์ปริทันต์ที่ทำการสุม 3-5 เซลล์ไลน์ (cell line) และเลือกเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในรุ่นที่ 3-8 มาทำการทดลองตัวแปรที่ศึกษา

1. ตัวแปรอิสระ ประกอบด้วย

1.1 วัสดุห้ามเลือด CA/NOCC (CN) ที่มีการปรับสัดส่วนของ CA : NOCC และมีการเตรียมในรูปแบบปกติ ได้แก่ 100%CA, CN80/20, CN25/75 และรูปแบบที่มีการเชื่อมขวาง (cross-link : X) ส่วนของ NOCC ได้แก่ CN80/20X, CN25/75X และ 100%NOCC

2. ตัวแปรตาม ประกอบด้วย

2.1 การแสดงออกของลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ไฟโบรบลาสท์เอ็นไนด์ปริทันต์

2.2 การเพิ่มจำนวนของเซลล์ไฟโบรบลาสท์เอ็นไนด์ปริทันต์

นิยามคำศัพท์เฉพาะ

CA/NOCC หมายถึง วัสดุห้ามเลือด calcium alginate/ N, O-carboxymethyl chitosan (CA/NOCC) เป็นสารที่ถูกเตรียมโดยใช้สารองค์ประกอบของ โซเดียมอัลจิเนต (sodium alginate: SA) กับ N, O-carboxymethyl chitosan (NOCC) และผ่านการจุ่มในสารละลาย CaCl_2

DMEM ++ หมายถึง (DMEM; Dulbecco Modified Eagle's Medium high glucose) ที่มีฟีทาลคัลฟซีรัม ร้อยละ 10 (10% Fetal calf serum; FCS) กลูตามีน 2 มิลลิโมลาร์ (2 mM L-Glutamine) เพนนิซิลลิน 100 IU ต่อมิลลิลิตร (100 IU Penicillin) สเตร็ปโตมัยซิน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (100 $\mu\text{g/ml}$ Streptomycin) และแอมโฟเทอรีซินบี 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (5 $\mu\text{g/ml}$ Amphotericin B)

100%CA หมายถึง วัสดุห้ามเลือดที่มีองค์ประกอบเป็น calcium alginate ทั้งหมด

100%NOCC หมายถึง วัสดุห้ามเลือดที่มีองค์ประกอบเป็น NOCC ทั้งหมด

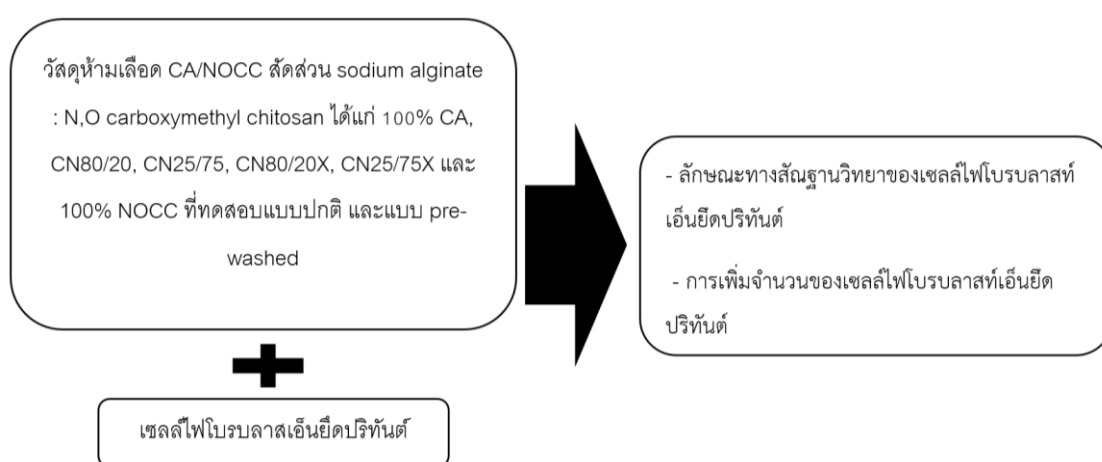
CNxx/yyX

CNxx/yy หมายถึง วัสดุห้ามเลือด CA/NOCC สัดส่วน xx : yy (sodium alginate : N, O-carboxymethyl chitosan)

X หมายถึง การนึ่งวัสดุห้ามเลือดด้วยเครื่องอบแรงดันไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เพื่อทำให้เกิด cross-link ของวัสดุ

W หมายถึง วัสดุห้ามเลือด CA/NOCC ที่ถูกขจัดแคลเซียมไอออน (pre-washed) ที่ปลดปล่อยออกมาด้วยการแช่ในอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมงก่อนนำไปทำการทดลอง

กรอบแนวคิดในการวิจัย



ภาพประกอบ 1 กรอบแนวคิดในการวิจัย

สมมติฐานงานวิจัย

เมื่อปรับลดสัดส่วนของ CA ในวัสดุห้ามเลือด CA/NOCC จะทำให้วัสดุห้ามเลือดมีความเข้ากันได้ทางชีวภาพที่ดีกับเซลล์โพลีโพรพิลีนเอ็นอีทีพรีทนต์ คือ พบลักษณะทางสัณฐานวิทยา และการเพิ่มจำนวนของเซลล์ในกลุ่มทดสอบที่ใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุม

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การทบทวนการศึกษาจากงานวิจัย หรือบทความที่เกี่ยวข้องจากเอกสาร เนื้อหาจึงถูกรวบรวมตามแต่ละหัวดังต่อไปนี้

1. วัสดุห้ามเลือดเฉพาะที่ (Local hemostatic agent)
2. ไคติน ไคโตซาน และ HemCon® dental dressing
3. การศึกษากระบวนการห้ามเลือดของไคโตซาน (Hemostatic mechanisms of chitosan)
4. วัสดุห้ามเลือดจากอนุพันธ์ไคโตซาน N, O-carboxymethyl chitosan (NOCC)
5. เอ็นยึดปริทันต์ (Periodontal ligament)
6. วิธีการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cell viability assays)
7. แคลเซียมไอออน (Calcium ion)

วัสดุห้ามเลือดเฉพาะที่ (Local hemostatic agent)

วัสดุห้ามเลือดเฉพาะที่เป็นสารที่ช่วยกระตุ้นให้เกิดการห้ามเลือดด้วยกลไกเชิงกล หรือการกระตุ้นให้เกิด coagulation cascade ขึ้น (18) และอาศัยคุณสมบัติของวัสดุห้ามเลือดที่ดี เช่น สามารถสลายตัวได้ เข้ากันได้ดีกับเนื้อเยื่อ ง่ายต่อการใช้งาน และมีราคาถูก(8) ถูกพัฒนาเพื่อนำมาใช้ห้ามเลือดในมนุษย์ได้ จนถึงในปัจจุบันวัสดุห้ามเลือดที่นิยมใช้ในงานผ่าตัดภายในช่องปากมีหลากหลายชนิด และรูปแบบ ดังต่อไปนี้

1. วัสดุห้ามเลือดจากเซลลูโลส (Oxidized regenerated cellulose: Surgicel Original[®], Surgicel Nu-Knit[®], Surgicel Fibrillar[®], Interceed[®], Gelitacel[®])

วัสดุห้ามเลือดจากเซลลูโลสเป็นวัสดุห้ามเลือดที่ผลิตจากพืช ซึ่งมีองค์ประกอบของอัลฟาเซลลูโลส โดยวัสดุจะมีลักษณะเป็นตาข่ายผ้าสีขาวที่ผ่านการฆ่าเชื้อโรคเรียบร้อยแล้ว เมื่อนำมาใช้งานจะพบว่าวัสดุมีการขยายขนาด เกิดเป็นแรงกดทับของวัสดุห้ามเลือดบนบาดแผล เนื่องจากวัสดุห้ามเลือดชนิดนี้มีความสามารถในการดูดซับของเหลว (Adsorption) ทำให้วัสดุสามารถขยายตัวได้ถึง 7-10 เท่าของน้ำหนัก โดยความสามารถในการดูดซับนั้นขึ้นอยู่กับหลายปัจจัยด้วยกัน เช่น ขนาดและปริมาณของวัสดุที่ใช้ ความอิ่มตัว (saturation) ของเลือด และเนื้อเยื่อต่างๆ ที่เกี่ยวข้องโดยรอบ (19) วัสดุห้ามเลือดจากเซลลูโลสมีฤทธิ์เป็นกรด ส่งผลให้ยับยั้งการทำงานของ thrombin และเมื่อนำมาใช้งานจึงเกิดกระบวนการอักเสบ และการตายของเนื้อเยื่อได้ ซึ่งความเป็นกรดนี้ยังทำให้วัสดุสามารถต้านจุลชีพได้ (bacteriostatic) (20) วัสดุห้ามเลือดชนิดนี้ถูกนำมาใช้ในการห้ามเลือดบริเวณที่เป็นเส้นเลือดฝอย หลอดเลือดดำ และเส้นเลือดแดงขนาดเล็ก โดยมีการศึกษาพบว่าวัสดุห้ามเลือดจากเซลลูโลสมีโอกาทำให้เกิดความผิดปกติในการรับรู้ความรู้สึกแบบชั่วคราวภายหลังการหายของบาดแผลได้ วัสดุห้ามเลือดจากเซลลูโลสสามารถสลายตัวทั้งหมดภายในเวลา 4-8 สัปดาห์ และพบข้อจำกัดในการใช้งานอยู่หลายกรณีด้วยกัน เช่น ไม่แนะนำให้ใช้ในบาดแผลที่มีลักษณะปิด เนื่องจากคุณสมบัติการบวมของวัสดุห้ามเลือดอาจทำให้บาดแผลเปิดออกมาใหม่ได้ ไม่แนะนำให้ใช้ในบริเวณที่มีการหักของกระดูก เนื่องจากวัสดุห้ามเลือดจะรบกวนการสร้างกระดูกใหม่ เป็นต้น นอกจากนี้วัสดุชนิดนี้สามารถก่อให้เกิดอาการไม่พึงประสงค์ได้เช่นกัน เช่น เมื่อฝังวัสดุไว้ในบาดแผลแล้วเกิดปฏิกิริยาต่อต้านสิ่งแปลกปลอมใน

ร่างกาย (foreign body reaction) หรือการตีบตันของหลอดเลือดเมื่อใช้วัสดุห้ามเลือดจากเซลลูโลสห่อหุ้มหลอดเลือดแน่นเกินไป เป็นต้น (21)

2. วัสดุห้ามเลือดจากเจลาติน (Gelatin-based product: Surgifoam[®], Gelfoam[®], Gelfilm[®], Spongostan[®], Gelita-spon[®], Geli putty[®])

วัสดุห้ามเลือดจากเจลาตินเป็นวัสดุห้ามเลือดที่ผลิตมาจากเจลาติน ซึ่งถูกนำไปใช้อย่างแพร่หลาย โดยวัสดุชนิดนี้จะมีลักษณะเป็นฟองน้ำที่มีรูพรุน มีความยืดหยุ่น และมีคุณสมบัติในการดูดซึมของเหลวได้ วัสดุห้ามเลือดจากเจลาตินมีรูปร่างของผลิตภัณฑ์หลายรูปแบบ เช่น แบบแผ่นฟิล์ม แบบฟองน้ำ หรือแบบผง ซึ่งจะสามารถดูดซึมเลือดได้ประมาณ 40 เท่าของน้ำหนักตัว และสามารถขยายตัวได้ถึง 200% โดยปริมาตร วัสดุห้ามเลือดชนิดนี้ทำหน้าที่เป็นโครงข่าย (scaffold) ให้เซลล์เม็ดเลือดเข้ามาเกาะ สามารถยับยั้งภาวะเลือดออกของเส้นเลือดขนาดเล็กได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่ไม่เหมาะสมสำหรับการใช้ห้ามเลือดที่ออกจากเส้นเลือดขนาดใหญ่ เนื่องจากวัสดุจะหลุดออกจากบริเวณที่มีเลือดออกมาก นอกจากนี้ข้อดีของการใช้วัสดุห้ามเลือดจากเจลาตินพบว่าการเกิดปฏิกิริยาต่อสิ่งแปลกปลอมในเนื้อเยื่อน้อยมาก มีความสามารถในการสลายตัวเป็นของเหลวภายในหนึ่งสัปดาห์ และสลายตัวทั้งหมดภายใน 4-6 สัปดาห์ จึงมักถูกนำมาใช้ในการจัดการภาวะเลือดออกจากการถอนฟัน

นอกจากนี้วัสดุห้ามเลือดชนิดนี้สามารถถูกฝังอยู่ในบาดแผลได้ โดยไม่ก่อให้เกิดแผลเป็น และมีการศึกษาที่พบว่าวัสดุห้ามเลือดจากเจลาตินสามารถห้ามเลือดได้อย่างมีประสิทธิภาพมากกว่าวัสดุห้ามเลือดที่เป็นผลิตภัณฑ์จากคอลลาเจน (22) อย่างไรก็ตาม เมื่อนำวัสดุห้ามเลือดจากเจลาตินไปใช้งานอาจมีการขยายขนาดของวัสดุทำให้เกิดการกดทับเส้นประสาท (23, 24) และเนื่องจากวัสดุมีลักษณะเป็นรูพรุนคล้ายฟองน้ำจึงสามารถพบการสะสมของแบคทีเรียภายในวัสดุ ซึ่งส่งผลให้เกิดฝีหนองขึ้นมา (25) นอกจากนี้วัสดุนี้อาจทำให้เกิดอาการแพ้ขึ้นได้ รวมถึงอาจเกิดอาการไม่พึงประสงค์ต่าง ๆ เช่น ปฏิกิริยาต่อต้านสิ่งแปลกปลอมในร่างกาย ภาวะที่มีเลือดคั่งในเนื้อเยื่อ (hematoma) และการติดเชื้อแบบเฉพาะที่ เป็นต้น (19)

3. วัสดุห้ามเลือดจากคอลลาเจน (Collagen-based products: Instat[®], Helitene[®], Helistat[®], Avitene[®], Avitene flour[®], Avitene Ultrafoam[®], Endo Avitene[®], Avitene Ultrawrap[®])

วัสดุห้ามเลือดจากคอลลาเจนเป็นวัสดุห้ามเลือดคล้ายฟองน้ำ ถูกผลิตขึ้นมาจากคอลลาเจนที่สกัดจากเอ็นของกล้ามเนื้อวัว (bovine flexor tendon) ผ่านกระบวนการระเหยแห้ง

(lyophilization) ทำให้วัสดุห้ามเลือดชนิดนี้มีลักษณะคล้ายฟองน้ำสีขาว นุ่มและยืดหยุ่น มีคุณสมบัติในการดูดซึมน้ำ หรือของเหลวได้มากกว่าน้ำหนักตัวหลายเท่า นำไปใช้งานด้วยการวางวัสดุลงบนบาดแผลเป็นระยะเวลา 2-5 นาที เมื่อวัสดุสัมผัสกับบริเวณที่มีเลือดออกจะเกิดการรวมกลุ่มของเกล็ดเลือดบนวัสดุ ซึ่งลักษณะคล้ายฟองน้ำของวัสดุห้ามเลือดนี้จะเป็นโครงข่าย 3 มิติที่เสริมความแข็งแรงของลิ่มเลือดได้เป็นอย่างดี เมื่อทำการห้ามเลือดเรียบร้อยแล้วสามารถนำวัสดุห้ามเลือดออก หรือดึงวัสดุไว้ในบริเวณบาดแผลได้ มีการศึกษาพบว่าการสลายตัวของวัสดุห้ามเลือดชนิดคอลลาเจนจะเกิดขึ้นภายในระยะเวลา 14-56 วัน และไม่แนะนำให้ใช้วัสดุชนิดนี้กับบาดแผลที่สกปรก หรือมีการติดเชื้อ เนื่องจากเป็นวัสดุห้ามเลือดแบบมีรูพรุนที่สามารถดูดซึมเชื้อโรค หรือแบคทีเรียได้ง่าย จึงอาจทำให้เกิดฝีหนองในภายหลัง และมีข้อควรระวังในการใช้งานของวัสดุห้ามเลือดชนิดนี้กับบุคคลที่มีประวัติแพ้ผลิตภัณฑ์ที่มาจากวัว (21)

4. วัสดุห้ามเลือด Bone wax (Waxocare[®], Ethicon[®])

Bone wax เป็นวัสดุห้ามเลือดที่มีส่วนประกอบของซีผึ้ง พาราฟิน และไอโซพโรพิลพอลมิเตด (isopropyl palmitate) Bone wax ถูกนำมาใช้ห้ามเลือดบริเวณกระดูก โดยเฉพาะการผ่าตัดฟันคุดซี่ที่สามในศัลยกรรมช่องปาก จึงเรียกวัสดุห้ามเลือดชนิดนี้ในอีกชื่อหนึ่งว่า "bone bleeder" โดย Bone wax มีลักษณะคล้ายซีผึ้งที่มีความยืดหยุ่น สามารถถูกกดหรือบิด เพื่ออุดปิดช่องในกระดูกที่เกิดภาวะเลือดออก ซึ่งทำให้เกิดการห้ามเลือดแบบทันที (21) แต่ Bone wax ยังมีข้อเสียหลายประการ เช่น คุณสมบัติไม่ละลายน้ำ และไม่สลายตัวของวัสดุ ดังนั้นการฝังวัสดุชนิดนี้ในบาดแผลจึงขัดขวางกระบวนการหายของกระดูก และเกิดการติดเชื้อตามมา โดยมีการศึกษาพบว่า Bone wax ที่ใช้ในการห้ามเลือดภายหลังการผ่าตัดกระดูกสันหลัง ทำให้การติดเชื้อถึง 6 ราย จากทั้งหมด 42 ราย (14%) (26)

5. วัสดุห้ามเลือด Fibrin sealant (Evicel[®], Tisseel[®], Crosseal[®], Quixil[®])

Fibrin sealant เป็นวัสดุห้ามเลือดที่ผลิตจากวัตถุดิบทางธรรมชาติ หรือสารสังเคราะห์ต่าง ๆ วัสดุชนิดนี้เกิดจากการประกอบกันของสารสองส่วน คือ สารห้ามเลือด และสารยึดติดของเนื้อเยื่อ (tissue adhesive) ประกอบกลายเป็นวัสดุห้ามเลือดที่ให้ผลดีในการสร้างเส้นเลือดใหม่ (angiogenesis) และส่งเสริมการหายของบาดแผล โดยทั่วไป Fibrin sealant จะประกอบด้วยสารห้ามเลือดหลายชนิด เช่น fibrinogen, fibrin-stabilizing factor, thrombin และ aprotinin 2 เมื่อนำไปใช้งานบริเวณบาดแผลจะทำให้เกิดเป็นตะกอนไฟบริน (fibrin clot) วัสดุห้าม

เลือดชนิดนี้มีประสิทธิภาพอยู่ในรูปแบบเซมิคิตยา หรือรูปแบบสเปรย์ (27, 28) Fibrin sealant ถูกนำมาใช้ในการห้ามเลือดภายหลังการปลูกกระดูก โดยเฉพาะการปลูกกระดูกจากการผ่าตัดกระดูกไขสันหลัง และถูกใช้ในผู้ป่วยที่มีความผิดปกติในการแข็งตัวของเลือด (coagulopathy) เช่น ผู้ป่วยที่มีไฟบริโนเจนไม่เพียงพอ ผู้ป่วยที่ได้รับเฮพาริน (heparin) เป็นต้น แต่อย่างไรก็ตาม Fibrin sealant ไม่สามารถใช้ในการห้ามเลือดในภาวะเลือดออกแบบรุนแรงได้ และพบว่าเกิดอาการแพ้กับบุคคลที่มีประวัติแพ้ผลิตภัณฑ์ที่มาจากวัว อีกทั้งยังเป็นวัสดุมีราคาที่สูง (29)

6. อัลจีเนต (Alginate)

อัลจีเนตเป็นพอลิเมอร์ธรรมชาติที่ถูกสกัดมาจากสาหร่ายสีน้ำตาล มีโครงสร้างของพอลิเมอร์ที่ประกอบด้วย guluronic acid และ mannuronic acid ส่งผลให้อัลจีเนตเป็นสารที่เป็นประจุลบ (30) ซึ่งทำให้อัลจีเนตมีการแลกเปลี่ยนไอออนกับสารที่เป็นประจุบวกได้ง่าย เช่น แคลเซียมไอออน สตรอนเซียมไอออน และแบเรียมไอออน โดยสารที่เป็นประจุบวกจะตัวเชื่อมระหว่างสายพอลิเมอร์ของอัลจีเนตที่เรียกว่า G-block กันเป็นร่างแห (31) การเชื่อมต่อนี้ก่อให้เกิดคุณสมบัติการก่อตัวเป็นเจล (gelation) ของอัลจีเนตเป็นคุณสมบัติที่นำไปใช้เป็นวัสดุทางชีวภาพต่างๆ ต่อไป และพบว่าอัลจีเนตมีคุณสมบัติทางชีวภาพที่ดีหลายอย่างอีกด้วย เช่น มีความเข้ากันได้ดีกับเนื้อเยื่อ มีความสามารถสลายตัวได้ มีการดูดซึมน้ำ มีความสามารถในการแลกเปลี่ยนไอออน มีความสามารถในการก่อตัวเป็นเจล และมีราคาถูก (8, 32, 33)

วัสดุห้ามเลือดอัลจีเนตที่สร้างจากกระบวนการแลกเปลี่ยนไอออน (Ionic cross-linking) ระหว่างโซเดียมอัลจีเนตกับสารละลายแคลเซียมคลอไรด์จะกลายเป็นวัสดุห้ามเลือดแคลเซียมอัลจีเนต เป็นวัสดุที่มีฤทธิ์ในการห้ามเลือดด้วยการปลดปล่อยแคลเซียมไอออนออกมา (16) โดยแคลเซียมไอออน หรือที่เรียกว่า Factor IV ในระบบการแข็งตัวของเลือด จะเป็นตัวกระตุ้น thrombocytes ให้เกิดการหลั่งของสารสื่อกลางในการห้ามเลือดชนิดต่าง ๆ รวมถึงกระตุ้น Factor VII-IX และ X ทำให้เกิดกระบวนการห้ามเลือดในระยะ secondary hemostasis ได้ (34)

ตาราง 1 ชื่อทางการค้า และกระบวนการห้ามเลือดของวัสดุห้ามเลือดต่าง ๆ ในปัจจุบัน

วัสดุห้ามเลือด	ชื่อทางการค้า	กระบวนการห้ามเลือด
Oxidized regenerated cellulose	Surgicel Original [®] , Surgicel Nu-Knit [®] , Surgicel Fibrillar [®] , Interceed [®] , Gelitacel [®]	เป็นโครงข่ายให้เกิดการแข็งตัวของเลือด
Gelatin	Surgifoam [®] , Gelfoam [®] , Gelfilm [®] , Spongostan [®] , Gelita-spon [®] , Geli putty [®]	เป็นโครงข่ายให้เกิดการแข็งตัวของเลือด
Microfibrillar collagen	Instat [®] , Helitene [®] , Helistat [®] , Avitene [®] , Avitene flour [®] , Avitene Ultrafoam [®] , Endo Avitene [®] , Avitene Ultrawrap [®]	เป็นโครงข่ายให้เกิดการแข็งตัวของเลือด ร่วมกับการกระตุ้นการทำงานของเกล็ดเลือด และการยึดเกาะของเกล็ดเลือด
Fibrin sealant	Evicel [®] , Tisseel [®] , Crosseal [®] , Quixil [®]	เป็นวัสดุที่มีทรอมบิน และไฟบริโนเจนเป็นส่วนประกอบ มีหน้าที่กระตุ้นให้เกิดกระบวนการแข็งตัวของเลือดในระยะ secondary hemostasis
Bone wax	Waxocare [®] , Ethicon [®]	อุดปิดช่องบริเวณกระดูกเกิดการห้ามเลือดแบบทันที
Alginate	Algisite M [®] , Aquacel [®] , Kaltostat [®]	แคลเซียมไออนหรือ Factor IV จะกระตุ้น thrombocytes ให้เกิดการหลั่งของสารสื่อกลางในการห้ามเลือดชนิดต่าง ๆ รวมถึงกระตุ้น Factor VII- X ให้เกิดกระบวนการห้ามเลือดในระยะ secondary hemostasis

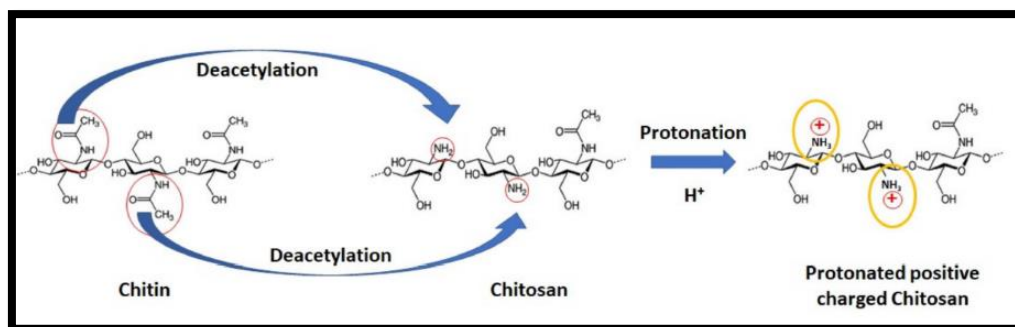
ไคติน ไคโตซาน และ HemCon® dental dressing

1. ไคติน

ไคตินเป็นพอลิแซ็กคาไรด์สายยาวที่มีโครงสร้างคล้ายกับเซลลูโลส สามารถพบไคตินได้ทั่วไปในเปลือกหอย เปลือกกุ้ง และผนังเซลล์ของเชื้อราบางชนิด ไคตินมีลักษณะสีขาว แข็งและไม่ยืดหยุ่น มีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำจึงทำให้ไคตินไม่ละลายในน้ำ และไม่ละลายในสารละลายอินทรีย์ ยกเว้น hexafluoroisopropanol, hexafluoroacetone และ chloroalcohols ซึ่งคุณสมบัติดังกล่าวถือว่าเป็นข้อจำกัดอย่างมากในการนำมาประยุกต์ใช้ (35, 36)

2. ไคโตซาน

ไคโตซานเป็นสารที่พบได้น้อยตามธรรมชาติ เป็นพอลิแซ็กคาไรด์สายยาว มีสูตรโครงสร้างเป็น β -(1 $\rightarrow$ 4)-2-acetamido-2-deoxy-b-D-glucan (n-acetyl D-glucosamine) and β -(1 $\rightarrow$ 4)-2-amino-2-deoxy-b-D-glucan (D-glucosamine) (37-39) มีมวลโมเลกุลอยู่ในช่วง 10 - 1,000 kDa หรือมากกว่า ซึ่งไคโตซานสามารถสังเคราะห์จากไคตินโดยการผ่านกระบวนการ deacetylation ซึ่งเป็นกระบวนการนำหมู่อะซิทิลออกจากโครงสร้าง จึงทำให้เกิดหมู่อะมิโนที่มีประจุเป็นบวกขึ้น (ภาพประกอบ 7) และค่าของ degree of deacetylation (DD) ของไคโตซานเป็นตัวบ่งบอกจำนวนหมู่อะมิโนที่เกิดภายในโครงสร้าง โดยสามารถคำนวณ DD จากสัดส่วนของ D-glucosamine ต่อผลรวมของ D-glucosamine และ n-acetyl D-glucosamine



ภาพประกอบ 2 ภาพแสดงโครงสร้างของไคติน ไคโตซานที่ไม่มีประจุ และไคโตซานที่มีประจุเป็นบวก โดยผ่านกระบวนการ deacetylation

ที่มา : Aguilar A, Zein N, Harmouch E, Hafdi B, Bornert F, Offner D, et al.

Application of Chitosan in Bone and Dental Engineering. Molecules. 2019;24(16):3009.

ซึ่งหมู่อะมิโน (D-glucosamine) ที่เกิดขึ้นทำให้ไคโตซานเป็นสารที่สามารถให้โปรตอนได้ และมีคุณสมบัติในการละลายน้ำมากขึ้น (38, 40) โดยเมื่อไคโตซานทำปฏิกิริยากับสารที่มีประจุเป็นลบต่าง ๆ จะเกิดเป็นสารไอออนิกเชิงซ้อน (ionic complexes) (38, 41, 42)

ไคโตซานไม่ก่อให้เกิดสารพิษตกค้าง และสามารถย่อยสลายได้ โดยการย่อยสลายของไคโตซานอาศัยการทำงานของเอนไซม์จากไลโซไซม์ หรือ Chitinase ที่สลายพันธะของ Glucosamine-glucosamine, glucosamine-n-acetyl-glucosamine และ n-acetyl-glucosamine-n-acetyl-glucosamine (43-45) ซึ่งอัตราเร็วในการย่อยสลายของไคโตซานมีความสัมพันธ์อย่างมากกับมวลโมเลกุลของพอลิเมอร์ และ DD (46, 47) โดยมีการศึกษาพบว่า DD ของไคโตซานส่งผลต่อความเข้ากันได้กับเนื้อเยื่อ ซึ่งการเพิ่มจำนวนของประจุบวกจะส่งเสริมให้เกิดปฏิกิริยาระหว่างไคโตซานกับเซลล์ได้ดี (48)

3. HemCon[®] dental dressing (HDD)

บริษัท HemCon medical technologies ได้สร้างวัสดุห้ามเลือดชนิดหนึ่งขึ้นมาโดยมีชื่อทางการค้าคือ HemCon[®] (HemCon medical technologies, Oregon, USA) เรียกวัสดุห้ามเลือดชนิดนี้ว่า “HemCon[®] dental dressing (HDD)” เป็นวัสดุห้ามเลือดที่พัฒนามาจาก HemCon[®] bandage ที่เป็นผ้าพันแผลที่เคยถูกใช้เพื่อรักษาบาดแผลของทหารในสนามรบ (3)

HDD ได้รับการรับรองจากองค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกา (FDA) (49) โดยเป็นวัสดุห้ามเลือดที่มีไคโตซานเป็นองค์ประกอบหลักสามารถส่งเสริมให้เกิดกระบวนการห้ามเลือดได้ มีการขึ้นรูปผลิตภัณฑ์ด้วยวิธีการ freezing และ lyophilization เกิดเป็นโครงข่าย (scaffold) ที่มีลักษณะเป็นรูพรุนคล้ายฟองน้ำ เหมาะต่อการใช้งานในการผ่าตัดในช่องปาก (29, 50) ซึ่ง HDD ที่ใช้ในการผ่าตัดในช่องปากจะมีขนาดเล็กกว่า HemCon[®] bandage (ภาพประกอบ 3)

กลไกห้ามเลือดของ HDD เกิดจากคุณสมบัติของไคโตซานที่เป็นสารประจุบวก ทำให้เกิดการดึงดูด และยึดเกาะกับเกล็ดเลือด และเม็ดเลือดแดงที่มีประจุเป็นลบ ก่อให้เกิดเป็นร่างแหขึ้นบนบาดแผล และส่งเสริมการแข็งตัวของเลือดมากขึ้น โดยกระบวนการห้ามเลือดที่เกิดขึ้นนั้นไม่ก่อให้เกิดปฏิกิริยาคายความร้อน ทั้งนี้พบว่ามวลโมเลกุล และ degree of acetylation (DD) ของไคโตซานมีผลต่อประสิทธิภาพในการห้ามเลือดอีกด้วย (51) และมีการศึกษาประสิทธิภาพการห้ามเลือดของ HDD ที่นำมาใช้ในผู้ป่วยที่มีจำเป็นต้องทานยาละลายลิ่มเลือด พบว่า HDD สามารถยับยั้งภาวะเลือดออกได้ภายในระยะเวลา 1 นาที และส่งเสริมการหายของแผลที่ดีขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (5)



ภาพประกอบ 3 ภาพแสดงขนาดของวัสดุห้ามเลือด HemCon[®] bandage (ซ้าย) และ HemCon[®] dental dressing (ขวา)

ที่มา : Malmquist JP, Clemens SC, Oien HJ, Wilson SL. Hemostasis of oral surgery wounds with the HemCon Dental Dressing. J Oral Maxillofac Surg. 2008;66(6):1177-83.

ในผู้ป่วยที่มีการรับประทานยาต้านการกลายเป็นลิ่มของเลือด (anti-thrombotic drugs) หรือมีการให้เฮพาริน (heparin) ผ่านการฉีดเข้าหลอดเลือดดำ หรือการฉีดเข้าชั้นใต้ผิวหนัง เมื่อมีการหยุดยาผู้ป่วยมีโอกาสเกิดภาวะลิ่มเลือดหลุดอุดหลอดเลือด (thromboembolic complications) (52) จึงมีการแนะนำให้งดการหยุดยาต้านการกลายเป็นลิ่มของเลือด และใช้วิธีการห้ามเลือดเฉพาะที่มาทดแทน โดยมีการศึกษาพบว่าวัสดุห้ามเลือดแบบเฉพาะที่สามารถห้ามเลือดได้อย่างมีประสิทธิภาพ เมื่อเปรียบเทียบในผู้ป่วยที่ได้รับประทานยาต้านการกลายเป็นลิ่มของเลือดกับผู้ป่วยที่ลดปริมาณยาก่อนการผ่าตัด (53) ฉะนั้น HDD จึงเป็นวัสดุห้ามเลือดทางเลือก ในกรณีการห้ามเลือดเฉพาะที่ในผู้ป่วยที่ได้รับยาต้านการกลายเป็นลิ่มของเลือด ทำให้ลดโอกาสการเกิดภาวะหัวใจขาดเลือด และภาวะหัวใจล้มเหลวได้ (5)

กลไกการห้ามเลือดของไคโตซาน (Hemostatic mechanisms of chitosan)

มีการศึกษาพบว่าไคโตซานสามารถกระตุ้นให้เกิดการแข็งตัวของเลือดได้จากหลายกระบวนการ โดยปัจจุบันยังไม่มีคำตอบกระบวนการห้ามเลือดที่เกิดขึ้นได้แต่อย่างไรก็ตามพบว่ามีกระบวนการที่เป็นไปได้อยู่ 4 กระบวนการ ได้แก่ (4)

1. การรวมตัวของเม็ดเลือดแดง (Aggregation of red blood cells)

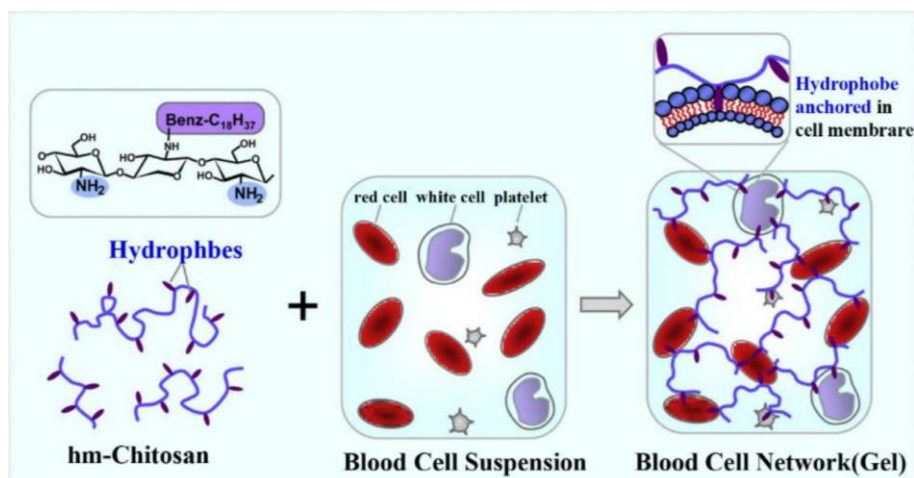
เม็ดเลือดแดงเป็นองค์ประกอบหลักของระบบเลือดในร่างกายมนุษย์ทำหน้าที่เพิ่มความหนืดของเลือด และส่งเสริมการลำเลียงเกล็ดเลือดไปยังบริเวณผนังหลอดเลือด ทำให้เกิดกระบวนการห้ามเลือดขึ้น ซึ่งเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์เม็ดเลือดแดงมีโปรตีนและไกลโคโปรตีนต่าง ๆ ที่มีประจุเป็นลบ ในขณะที่ไคโตซานเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ธรรมชาติที่มีประจุเป็นบวกจากหมู่อะมิโน (พันธะ $-NH_3^+$) ในโมเลกุล ทำให้ไคโตซานเกิดปฏิกิริยาแรงดึงดูดกับประจุลบบนผิวเซลล์ของเม็ดเลือดแดง กระตุ้นการรวมตัวของเม็ดเลือดมาสู่บริเวณบาดแผล และเกิดเป็นลิ่มเลือดที่บริเวณบาดแผลขึ้น ดังนั้นปริมาณของประจุบวกในโครงสร้างของไคโตซานจึงเป็นส่วนสำคัญในการดึงดูดเซลล์เม็ดเลือดแดง (54, 55) ซึ่งการเพิ่มปริมาณของประจุบวกเกิดจากกระบวนการ deacetylation ของไคโตซาน นอกจากนี้พบว่ามวลโมเลกุลของไคโตซานมีผลต่อการเกิดปฏิกิริยาระหว่างไคโตซานกับเซลล์เม็ดเลือดแดง เนื่องจากการมีมวลโมเลกุลมากทำให้มีพันธะไฮโดรเจนเพิ่มขึ้น ส่งผลให้เกิดปฏิกิริยาแรงดึงดูดกับเซลล์เม็ดเลือดแดงมากขึ้น (56, 57)

2. การกระตุ้นเกล็ดเลือด (Stimulation of platelets)

ในสภาวะปกติเกล็ดเลือดจะไม่ยึดติดกับเซลล์เยื่อบุหลอดเลือด (endothelial cell) ในทางตรงกันข้ามเมื่อมีการฉีกขาดของหลอดเลือด เกล็ดเลือดจะถูกกระตุ้นให้เกิดการยึดติดระหว่างเกล็ดเลือดกับเซลล์เยื่อบุหลอดเลือด และเกิดการรวมตัวของเกล็ดเลือดเพิ่มขึ้น ซึ่งมีความสำคัญต่อกระบวนการห้ามเลือด (58) โดยวัสดุห้ามเลือดที่เป็นพอลิเมอร์ชีวภาพ (ยกตัวอย่างเช่น ไคโตซาน) จะกระตุ้นให้เกิดกระบวนการดังกล่าวของเกล็ดเลือดได้อย่างรวดเร็ว โดยขึ้นอยู่กับคุณสมบัติต่าง ๆ ของวัสดุ เช่น องค์ประกอบทางเคมีที่พื้นผิวของวัสดุ (surface chemical composition), คุณสมบัติของพันธะไฮโดรเจน (hydrogen bonding properties), ความหนาแน่นของประจุ (charge density) และ ความไม่ชอบหรือชอบน้ำของวัสดุ (hydrophobicity-/hydrophilicity) (59) โดยมีหลายการศึกษาพบว่าการกระตุ้นการทำงานของเกล็ดเลือดมีความสัมพันธ์กับความเป็นประจุบวกภายในโมเลกุลของไคซานอีกด้วย (51, 59)

3. ระบบการกระตุ้นผ่านการสัมผัส (Contact system activation)

การสัมผัสของเลือดที่พื้นผิวของวัสดุชีวภาพส่งผลโดยตรงกับกระบวนการแข็งตัวของเลือด โดยเกิดการส่งเสริมการยึดติดของเกล็ดเลือด และการปรับเปลี่ยนการทำหน้าที่ของโปรตีนในเลือดให้มีการดูดซับบนพื้นผิว (60) ซึ่งระบบการกระตุ้นการสัมผัสประกอบด้วยปัจจัยการแข็งตัวของเลือดชนิดต่าง ๆ เช่น factors XII (FXII), factor XI (FXI), high-molecular-weight-kininogen (HMWK) และ pre-kallikrein (61) (ภาพประกอบ 4) สำหรับวัสดุไคโตซานนั้นกระบวนการแข็งตัวของเลือดที่ผ่านระบบการกระตุ้นผ่านการสัมผัสนี้ยังมีการรายงานผลที่ขัดแย้งกันอยู่ โดยมีการศึกษาพบว่าไคโตซานทำให้เกิดการแข็งตัวของเลือดในหลอดทดลองโดยไม่ได้อาศัย Factor VII (FVII) ซึ่งเป็นปัจจัยการแข็งตัวของเลือดใน extrinsic pathway แต่ผ่านทาง Factor XI (FXI) และ Factor XII (FXII) แทน (62) นอกจากนี้ Fischer et al. ได้ศึกษาจากการทดสอบในสัตว์ทดลอง (in vivo) พบว่าไคโตซานมีการกระตุ้นปฏิกิริยาทางชีวเคมี (biochemical reaction) แบบต่อเนื่องโดยอาศัยการทำงานของพลาสมาโปรตีน และปัจจัยการแข็งตัวของเลือดที่สำคัญต่าง ๆ เพื่อเสริมความแข็งแรงของลิ่มเลือด (blood clots) (63)



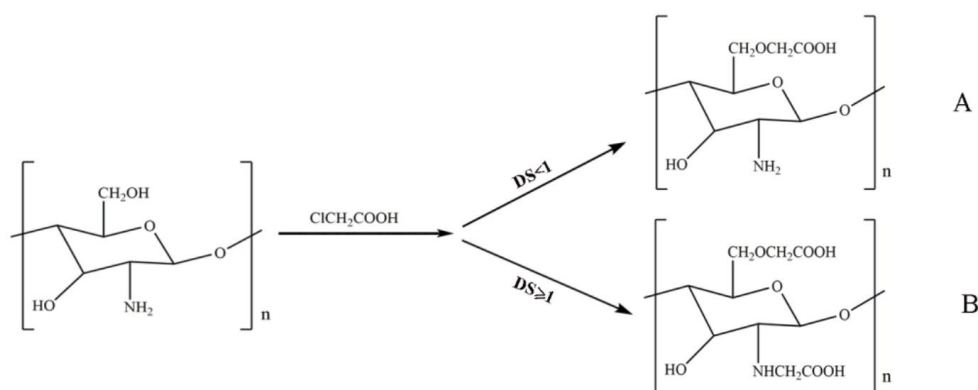
ภาพประกอบ 5 ภาพแสดงกระบวนการห้ามเลือดด้วยการก่อตัวเป็นเจล (gelling hemostatic mechanism) ของส่วนประกอบที่ไม่ชอบน้ำของไคโตซาน และเซลล์เม็ดเลือดแดงทำปฏิกิริยากันเป็นร่างแห

ที่มา : Hu Z, Zhang DY, Lu ST, Li PW, Li SD. Chitosan-Based Composite

Materials form Prospective Hemostatic Applications. Mar Drugs. 2018;16(8).

วัสดุห้ามเลือดจากอนุพันธ์ไคโตซาน N, O-carboxymethyl chitosan (NOCC)

NOCC เป็นวัสดุห้ามเลือดจากอนุพันธ์ไคโตซานชนิดหนึ่งที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาทางเคมี (chemical reaction) เนื่องจากพบว่าไคโตซานมีความสามารถในการละลายน้ำที่ต่ำ ทำให้นำไปประยุกต์ใช้งานได้ยาก การทำปฏิกิริยาทางเคมีนี้จึงเป็นการพัฒนาคุณสมบัติของอนุพันธ์ไคโตซานให้ละลายน้ำได้มากขึ้น โดยเป็นการเพิ่มการละลายของอนุพันธ์ไคโตซานในสารละลายที่เป็นกลาง และสารละลายที่เป็นด่าง NOCC จากการทำปฏิกิริยา carboxylation ของไคโตซาน ซึ่งเป็นการแทนที่ด้วยหมู่คาบอซิลในโครงสร้าง ปริมาณที่ถูกแทนที่จะบ่งบอกด้วยค่า degree of substitution (DS) โดย NOCC คืออนุพันธ์ไคโตซานที่มีค่า $DS \geq 1$ (65) (ภาพประกอบ 6) นอกจากนี้พบว่า NOCC มีความเข้ากันได้กับเซลล์เคราตินบนผิวหนังของมนุษย์ (6) และมีคุณสมบัติของวัสดุทางการแพทย์ (biomedical properties) ที่ดี เช่น มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย เข้ากันได้ดีกับเนื้อเยื่อในร่างกาย และส่งเสริมกระบวนการห้ามเลือด (1, 8, 65)



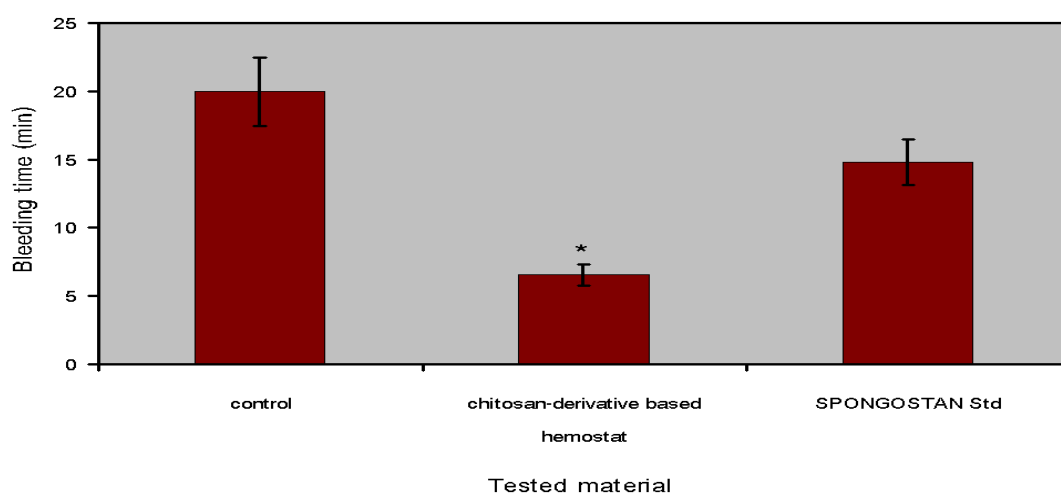
ภาพประกอบ 6 ภาพแสดงอนุพันธ์ของไคโตซานตามค่า DS จากการเกิด carboxylation โดยมีค่า DS น้อยกว่า 1 ได้เป็นสาร O-carboxymethyl chitosan (A) และมีค่า DS มากกว่าหรือเท่ากับ 1 ได้เป็นสาร N, O-carboxymethyl chitosan (B)

ที่มา : Wang W, Meng Q, Li Q, Liu J, Zhou M, Jin Z, et al. Chitosan Derivatives and Their Application in Biomedicine. Int J Mol Sci. 2020;21(2).

NOCC ถูกนำมาศึกษาค้นคว้า ทดลอง และพัฒนา เพื่อสร้างเป็นวัสดุห้ามเลือดที่ดีต่อมา โดยมีการศึกษาถึงความสามารถในการห้ามเลือดของวัสดุห้ามเลือดจากอนุพันธ์ไคโตซานชนิดต่าง ๆ ในหลอดทดลองพบว่า NOCC สามารถช่วยเร่งให้เกิดปฏิกิริยาการแข็งตัวของเลือดได้ดีกว่ากระบวนการแข็งตัวของเลือดตามธรรมชาติ กระบวนการห้ามเลือดของ NOCC เกิดจากการกระตุ้นการทำงานของ Factor XII ที่เป็นปัจจัยการแข็งตัวของเลือดใน intrinsic pathway หรือ contact activation pathway และดึงดูดเกล็ดเลือดจากการมีหมู่คาบอซิดภายในโมเลกุลที่แสดงเป็นประจุลบคล้ายกับผิวของ subendothelial collagen (66, 67) และเมื่อเปรียบเทียบกับค่า Water contact angle พบว่าค่า Water contact angle ของวัสดุห้ามเลือด NOCC จะมีค่าน้อย ซึ่งเป็นการบ่งบอกถึงความชอบน้ำมาก (68) เป็นคุณสมบัติที่ส่งเสริมให้เกล็ดเลือดเกิดการดึงดูดไฟบริโนเจนเข้ามาทำให้เพิ่มการยึดเกาะของเกล็ดเลือด และเกิดการสร้างก้อนลิ่มเลือดขึ้น (thrombus formation)(4, 69)

ศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ (National Metal and Materials Technology Center หรือ MTEC) เป็นสถาบันเพื่อการพัฒนาและสร้างขีดความสามารถทางด้านเทคโนโลยีวัสดุ ได้ดำเนินการวิจัยพัฒนาวัสดุห้ามเลือดจากอนุพันธ์ไคโตซานในรูปแบบฟองน้ำ ได้แก่ calcium alginate/ N, O-carboxymethyl chitosan (CA/NOCC) โดยวัสดุชนิดนี้เกิดจากการนำสารละลาย

หนืดที่ได้จากการผสม sodium alginate และ NOCC ในสัดส่วนต่อน้ำหนัก เทลงแบบพิมพ์ และทำให้แห้งจนเกิดชิ้นงานที่มีลักษณะแบบฟองน้ำ ซึ่งจะถูกนำไปจุ่มในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ทำให้เกิดการแลกเปลี่ยนไอออนระหว่างโซเดียมไอออนกับแคลเซียมไอออน เกิดเป็นสารห้ามเลือด CA/NOCC ขึ้นมา (7) โดยมีการทดสอบวัสดุห้ามเลือด CA/NOCC พบว่ามีความเข้ากันได้ดีกับ เซลล์ไฟโบรบลาสต์หนูชนิด L929 และเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของมนุษย์ (6-8) ผ่านการดูลักษณะทาง สัณฐานวิทยาของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) และมีการทดสอบ การสลายตัวของวัสดุห้ามเลือด CA/NOCC ในสัดส่วนของโซเดียมอัลจินเตตต่อสารอนุพันธ์ไคโตซานในสัดส่วนต่อน้ำหนักต่าง ๆ ได้แก่ 90:10 80:20 70:30 60:40 50:50 40:60 และ 30:70 พบว่า มีอัตราการสลายตัวของวัสดุเร็วขึ้นเมื่อมีสัดส่วนของ NOCC มากขึ้น ซึ่งมีการสลายตัวทั้งหมดของ วัสดุที่มีสัดส่วน 30:70 ภายใน 4 สัปดาห์ และสัดส่วน 40:60 ภายใน 10 สัปดาห์ โดยการสลายตัว ของ NOCC เกิดจากปฏิกิริยาเอนไซม์ของสารละลายไลโซไซม์ (lysozyme solution) ส่วนการ สลายตัวของแคลเซียมอัลจินเตตเกิดปฏิกิริยาแลกเปลี่ยนไอออนระหว่างแคลเซียมไอออนของอัล จิเนตกับโซเดียมไอออนของสารละลาย phosphate-buffered saline (PBS) (7) และเมื่อทดสอบ ประสิทธิภาพของวัสดุห้ามเลือดที่ใช้ในหนูทดลองที่ถูกตัดหาง พบว่าวัสดุห้ามเลือด CA/NOCC มี ฤทธิ์ห้ามเลือดได้ดีกว่าวัสดุห้ามเลือด Spongostan® (ภาพประกอบ 7) (9)

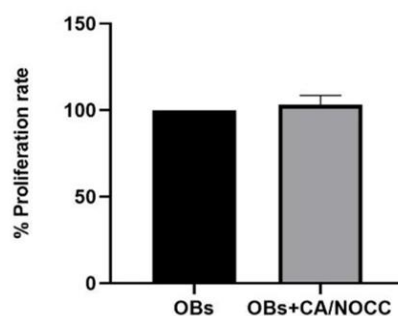
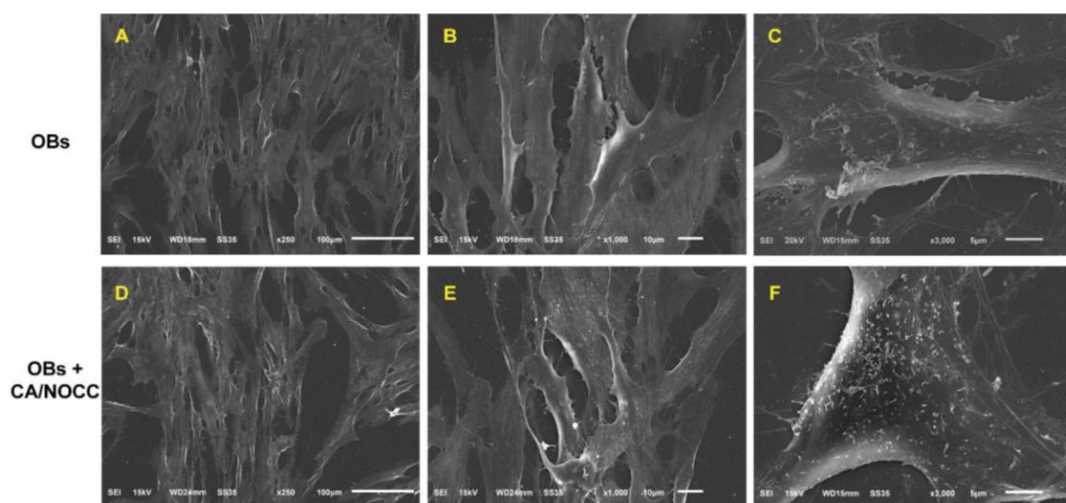


ภาพประกอบ 7 ภาพแสดงผลการทดลองของระยะเวลาในการห้ามเลือด (bleeding time)

ที่มา : Janvikul W, Uppanan P, Kosorn W, editors. Evaluation of Efficacy of Chitosan Derivative Based Hemostat: In Vitro and In Vivo Studies. Proceedings of 2nd International Symposium on Biomedical Engineering; 2006; Bangkok, Thailand.

ต่อมาศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ (MTEC) ได้นำวัสดุห้ามเลือดชนิดนี้ มาทำการศึกษาทดลองในมนุษย์ โดยการประเมินการระคายเคืองและอาการแพ้วัสดุห้ามเลือดจากอนุพันธ์ไคโตซาน CA/NOCC ซึ่งอยู่ในรูปแบบที่ใช้ภายในร่างกายและรูปแบบที่ใช้ภายนอกในร่างกาย พบว่าไม่เกิดอาการแพ้ และการระคายเคืองจากวัสดุห้ามเลือดจากอนุพันธ์ไคโตซาน CA/NOCC วัสดุห้ามเลือดทั้งสองรูปจึงมีความปลอดภัย และสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในมนุษย์ได้ (11) จากนั้นจึงมีการทดสอบความสามารถในการสลายตัวของวัสดุห้ามเลือดจากอนุพันธ์ไคโตซาน CA/NOCC ที่ใช้ภายในร่างกายมนุษย์ โดยการฝังวัสดุห้ามเลือดในบริเวณแผลผ่าตัดในร่างกายมนุษย์ พบว่าวัสดุห้ามเลือดสามารถสลายตัวได้อย่างสมบูรณ์ภายในระยะเวลา 3 เดือน โดยไม่พบสิ่งตกค้างของวัสดุ และไม่พบปฏิกิริยาการอักเสบหรือการต่อต้านของเนื้อเยื่อต่อวัสดุห้ามเลือด (12) นอกจากนี้ประสิทธิภาพในการห้ามเลือดของอนุพันธ์ไคโตซาน CA/NOCC ที่นำมาใช้บนแผลผ่าตัดบริเวณผิวหนังของมนุษย์นั้น พบว่าสามารถห้ามเลือดได้ดีที่สุดภายหลังจากใช้งานเป็นระยะเวลา 8 นาที เมื่อเทียบกับ Spongostan® และ Algisite-M® (10)

ด้วยความร่วมมือจากคณะผู้วิจัยจากศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ(MTEC) วัสดุห้ามเลือด CA/NOCC ที่มีสัดส่วนน้ำหนัก 80 : 20 (Sodium alginate กับ NOCC) ได้ถูกนำมาทดสอบกับเซลล์สร้างกระดูกที่ผ่านการคัดแยกจากกระดูกขากรรไกรของมนุษย์ โดยการประเมินลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์จากการวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) พบว่าเซลล์สร้างกระดูกมีลักษณะผิวเซลล์ที่แบน และเรียบเป็นรูปทรงกระสวย (fusiform) คล้ายคลึงกับกลุ่มควบคุมที่เลี้ยงเซลล์ด้วย DMEM++ และอัตราการเพิ่มจำนวนของเซลล์ที่ใช้การทดสอบเอ็มทีที (MTT assay) โดยการวัดการดูดกลืนแสง ณ วันที่ 1, 3 และ 6 แล้วนำมาคำนวณหาอัตราการเพิ่มจำนวนของเซลล์ ในงานวิจัยนี้พบว่ากลุ่มที่เลี้ยงเซลล์สร้างกระดูกกับวัสดุห้ามเลือด CA/NOCC มีอัตราการเพิ่มจำนวนไม่แตกต่างกับกลุ่มควบคุม (13) (ภาพประกอบ 8)

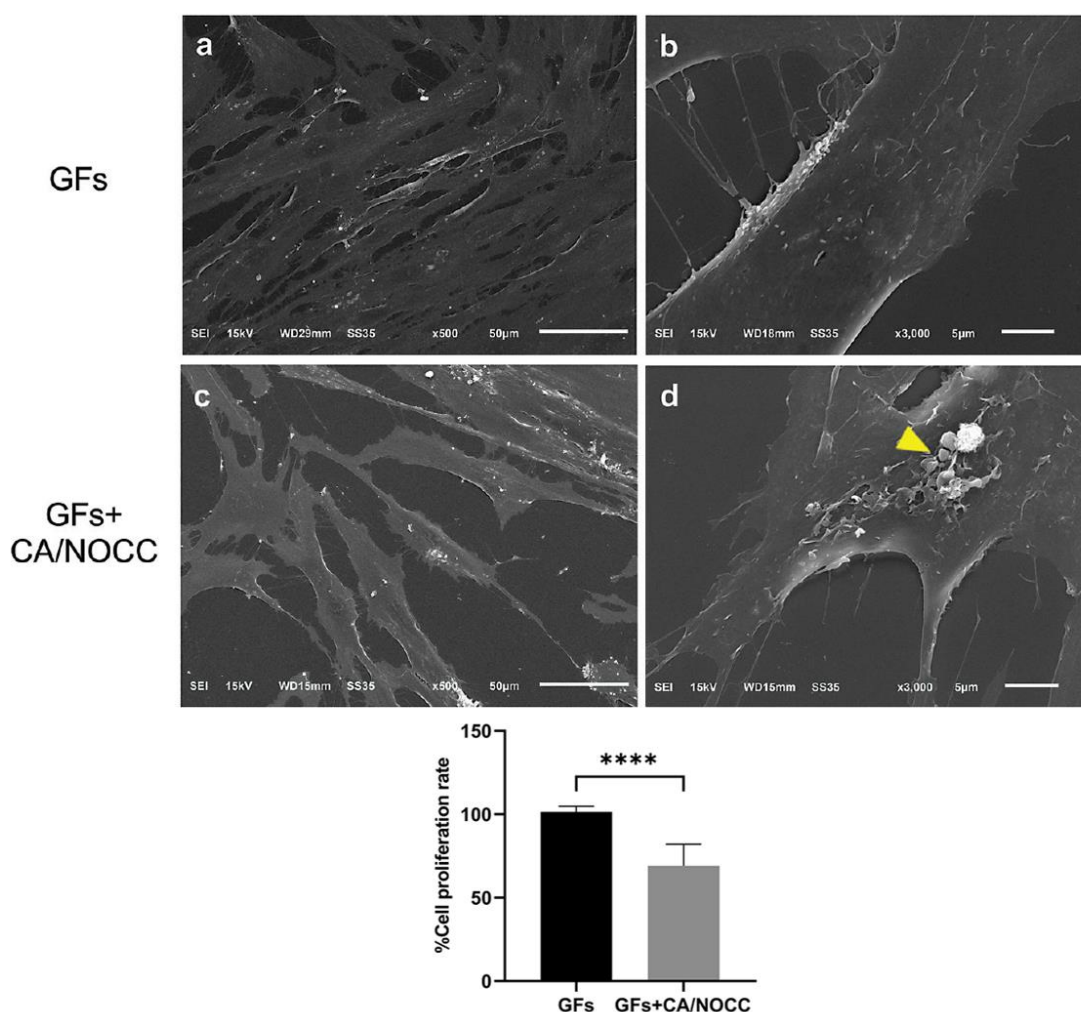


ภาพประกอบ 8 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์สร้างกระดูกที่เลี้ยงมาเป็นระยะเวลา 3 วัน บนแผ่นกระจกกันใส โดยเซลล์สร้างกระดูกที่ปราศจาก CA/NOCC เป็นกลุ่มควบคุม (OBs) และเซลล์สร้างกระดูกที่มี CA/NOCC เป็นกลุ่มทดสอบ (OBs+CA/NOCC) กำลังขยาย 250X 1000X และ 3000X และกราฟแท่งแสดงอัตราการเพิ่มจำนวนของเซลล์ที่พบว่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ที่มา : Phaewphala K, Kosorn W, Janvikul W, Kitruangphatchara K, Sricholpech M. Biocompatibility of a Chitosan-derived Hemostatic Agent with Human Alveolar Osteoblasts. [M Dent J 2020; 40 (3) : 277-288]. 2020.

ในทางตรงกันข้ามเมื่อนำวัสดุ CA/NOCC สัดส่วน 80:20 มาทดสอบกับเซลล์ไฟโบรบลาสต์ เนื้อเยื่อเหงือก จากการรายงานของ Mahatchariyapong et al. พบว่ามีการลดลงของอัตราการเพิ่มจำนวนของเซลล์ถึงร้อยละ 30 และมีการเปลี่ยนแปลงของรูปร่างเซลล์ โดยมีการสร้างส่วนยื่น

ขนาดใหญ่ (large fibrils) และตุ่มพองใส (cellular blebbing) (ภาพประกอบ 9) โดยคาดว่าผลเสียของลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่เปลี่ยนแปลง และอัตราการเพิ่มจำนวนของเซลล์ที่ลดลง อาจเกิดจากปริมาณแคลเซียมไอออนที่ปลดปล่อยออกมาจากวัสดุ ซึ่งจากการวัดระดับแคลเซียมไอออนในกลุ่มที่เลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์เนื้อเยื่อเหงือก ร่วมกับวัสดุ CA/NOCC สัดส่วน 80:20 พบว่าปริมาณแคลเซียมไอออนที่สัมผัสกับเซลล์มีระดับสูงถึง 2.96 ± 0.24 มิลลิโมลาร์ (mM) ในขณะที่กลุ่มควบคุมที่เลี้ยงไฟโบรบลาสต์เนื้อเยื่อเหงือกอย่างเดียววัดปริมาณแคลเซียมไอออนได้อยู่ในช่วง 1.53-1.68 mM เท่านั้น (14)



ภาพประกอบ 9 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เนื้อเยื่อเหงือกที่เลี้ยงมาเป็นระยะเวลา 3 วัน บนแผ่นกระจกกันใส โดยเซลล์ไฟโบรบลาสต์เนื้อเยื่อเหงือกที่ปราศจาก CA/NOCC เป็นกลุ่มควบคุม (GFs) และเซลล์ไฟโบรบลาสต์เนื้อเยื่อเหงือกที่มี CA/NOCC เป็นกลุ่มทดสอบ (GFs+CA/NOCC) กำลังขยาย 500X และ 3000X ตามลำดับ ลูกศรชี้เหลืองชี้บริเวณ

ตุ่มพองใส (cellular blebbing) ที่เกิดขึ้นบนผิวเซลล์ และกราฟแท่งแสดงอัตราการเพิ่มจำนวนของเซลล์ของกลุ่ม GFs+CA/NOCC ที่น้อยกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p - value <0.0001)

ที่มา : Mahatchariyapong T, Phaewphala K, Kosorn W, Kittrueangphatchara K, Sricholpech M. Cytotoxicity of the Calcium Alginate/N, O-carboxymethylchitosan Hemostatic Sponge on Primary Human Gingival Fibroblasts. CM Dent J. 2022; 43(1):19-28.

เอ็นยึดปริทันต์ (Periodontal ligament หรือ PDL)

เอ็นยึดปริทันต์เป็นเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue) ที่ยึดเกาะระหว่างเคลือบรากฟัน (cementum) และกระดูกเบ้าฟัน (alveolar bone) มีขนาดตั้งแต่ 0.15 ถึง 0.38 มิลลิเมตร โดยส่วนที่บางที่สุดอยู่บริเวณกึ่งกลางของความยาวราก เมื่อมีอายุมากขึ้นเอ็นยึดปริทันต์จะมีขนาดเล็กลงเรื่อย ๆ เอ็นยึดปริทันต์นั้นเป็นส่วนหนึ่งของอวัยวะปริทันต์ (periodontium) ที่มีความสำคัญในการเป็นเนื้อเยื่อที่ตอบสนองต่อแรงทางกล (mechano-responsive tissue) โดยยึดอยู่ระหว่างรากฟัน และกระดูกเบ้าฟัน คอยรับแรงที่เกิดจากแรงบดเคี้ยว สามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาวะแวดล้อมได้โดยการลดขนาดของเอ็นยึดปริทันต์ตามแรงบดเคี้ยวที่ลดลง หรือเพิ่มขนาดของเอ็นยึดปริทันต์ตามแรงบดเคี้ยวที่เพิ่มขึ้นได้ แสดงถึงความสัมพันธ์ระหว่างเอ็นยึดปริทันต์กับกระดูกเบ้าฟันต่อกันและกัน (70) นอกจากนี้เอ็นยึดปริทันต์มีหน้าที่ในการสะสมแร่ธาตุของกระดูก การสร้างกระดูกในแผลถอนฟัน และการเหนี่ยวนำในการสร้างกระดูก ซึ่งช่วยทำให้เกิดการเชื่อมติดของกระดูกที่สร้างใหม่กับพื้นผิวรากเทียม (osteointegration) ได้อีกด้วย (71)

เซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นยึดปริทันต์มีลักษณะพิเศษในการสร้าง Extracellular compartment อย่างรวดเร็ว โดยเฉพาะเส้นใยคอลลาเจน เกิดจากการมีไฮโดรพลาสซึมขนาดใหญ่ และบรจุออร์แกเนลล์มากมายอยู่ในของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นยึดปริทันต์ ทำให้สามารถสังเคราะห์และหลั่งโปรตีนออกมานอกเซลล์ สร้างเป็นโครงร่างค้ำจุน (cytoskeleton) ให้เป็นจุดยึดเกาะ (adherens) และช่องว่าง (gap junction) ในการเรียงตัวของคอลลาเจนขึ้นมา โดยเส้นใยคอลลาเจนจะมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง (remodeling) อยู่ตลอดเวลา (70)

เอ็นยึดปริทันต์ประกอบด้วยคอลลาเจนที่เป็นเส้นใย (Fibrillar collagen) ชนิดที่ I, III และ V ปริมาณ 75%, 20% และ 5% ตามลำดับ (72, 73) ส่วนคอลลาเจนที่ไม่เป็นเส้นใย (Non-fibrillar collagen) ชนิด IV, VI, XII และ XIV เป็นองค์ประกอบส่วนน้อยในเอ็นยึดปริทันต์

(74, 75) ซึ่งคอลลาเจนที่เป็นเส้นใยจะทำหน้าที่เป็นโครงข่าย (scaffold) ที่เป็นตัวกำหนดรูปร่าง (form) การเชื่อมต่อ (connectivity) และความต้านทานแรงดึงของเอ็นยึดปริทันต์ (tensile strength) (76) ในขณะที่ความต้านทานแรงอัด (compressive force) นั้นมาจากส่วนที่เป็นน้ำกรดไฮยาลูโรนิก (hyaluronic acid) และโปรตีโอไกลแคน (proteoglycans) ชนิดต่าง ๆ (70) มีการศึกษาพบว่าเส้นผ่านศูนย์กลางของคอลลาเจนที่เป็นเส้นใยในเอ็นยึดปริทันต์จะมีขนาดเล็กกว่าของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันชนิดอื่น ๆ เนื่องจากอัตราการทดแทนของคอลลาเจน (collagen turnover) เกิดขึ้นอย่างรวดเร็วในเอ็นยึดปริทันต์ (77) และพบว่าส่วนที่ไม่ใช่คอลลาเจนของเอ็นยึดปริทันต์ (non-collagenous components) มีหน้าที่ควบคุมการสร้างคอลลาเจนที่เป็นเส้นใยชนิดต่าง ๆ

วิธีการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cell viability assays)

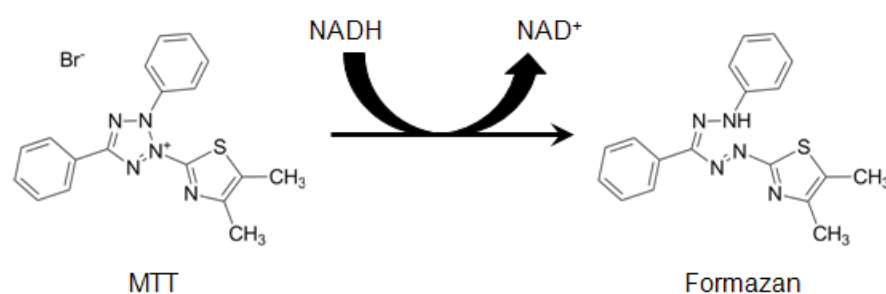
Cell viability assays เป็นวิธีการทดสอบความมีชีวิตของเซลล์ที่ทำการวิเคราะห์ในจานเลี้ยงเซลล์แบบหลายหลุม วิธีการดังกล่าวถูกใช้เพื่อทดสอบผลกระทบของสารประกอบต่าง ๆ ต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ (cell proliferation) หรือมีความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity) ชุดทดสอบต่าง ๆ ที่พัฒนาขึ้นมาอาศัยวิธีการตรวจจับสัญญาณระหว่างตัวรับสัญญาณ และตัวส่งสัญญาณภายในเซลล์โดยสัญญาณที่ได้นั้น แสดงถึงการแสดงออกของยีน การติดต่อน้ำของเซลล์ หรือ การควบคุมการทำงานของออร์แกเนลล์ต่าง ๆ แต่ไม่ว่าจะเป็นชุดทดสอบชนิดใดก็ตาม สิ่งสำคัญที่ต้องการทราบคือจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเมื่อเสร็จสิ้นการทดลอง

การทดสอบความมีชีวิตของเซลล์ที่นิยมใช้มีหลายประเภท ยกตัวอย่างเช่น วิธีที่อาศัยกลไก tetrazolium reduction, resazurin reduction และ protease activity assays เป็นการทดสอบด้วยวัดการเมตาบอลิซึมของเซลล์ หรือการทำงานของเอนไซม์ โดยเป็นการบ่งบอกถึงความมีชีวิตของเซลล์ ซึ่งเป็นการนำสารเคมี (reagent) เข้าไปปฏิกิริยากับเซลล์ที่ต้องการทำการทดสอบ เพื่อเปลี่ยนสีของสารตั้งต้นให้เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีสี หรือสารฟลูออเรสเซนต์ที่สามารถนำไปนับเซลล์ได้ในภายหลัง การเปลี่ยนสีของสารตั้งต้นให้เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีสี หรือสารฟลูออเรสเซนต์จะลดลงเมื่อมีเซลล์ตาย โดยการทดสอบแต่ละรูปแบบจะมีพื้นฐานในการตรวจสอบที่แตกต่างกันไป (78)

1. Tetrazolium Reduction Assays

ที่ผ่านมาได้มีการพัฒนาสารประกอบ Tetrazolium ที่มีความหลากหลายซึ่งเกิดจากการเปลี่ยนแปลงส่วนประกอบต่าง ๆ ภายในโมเลกุล เพื่อนำมาใช้วัดจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต โดยชนิดของสารประกอบ Tetrazolium ที่นิยมใช้ ได้แก่ MTT MTS XTT และ WST-1 เป็นต้น

MTT (3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium bromide) assays เป็นการทดสอบปฏิกิริยารีดอกซ์ของ tetrazolium ได้ผลิตภัณฑ์เป็นฟอร์มazan (Formazan) (ภาพประกอบ 10) ซึ่งเป็นการทดสอบกับเซลล์ที่มีลักษณะเป็น homogenous cell และถูกพัฒนาขึ้นจนสามารถทดสอบในรูปแบบ 96 หลุมได้ (79) MTT ได้รับการยอมรับอย่างกว้างขวาง และได้รับความนิยมในห้องปฏิบัติการ มีวิธีการทดลองโดยการเติม MTT เข้าไปเซลล์ที่ทำการเพาะเลี้ยง และทำการบ่มเพาะ (incubation) เป็นเวลา 1 ถึง 4 ชั่วโมง ปริมาณของ formazan ที่เกิดขึ้นจะเปลี่ยนสารละลายสีเหลืองของ MTT ให้กลายเป็นสารละลายสีม่วงของ formazan และถูกบันทึกด้วยการวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นขนาด 570 นาโนเมตร ผ่านเครื่องอ่านค่าสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) โดยกระบวนการเปลี่ยนแปลงของโมเลกุลที่เกิดขึ้นนั้นหลายการศึกษารายงานว่าเป็นการเกิดปฏิกิริยารับอิเล็กตรอนที่มาจาก NADH หรือสารที่ให้อิเล็กตรอนอื่น ๆ ซึ่งบ่งบอกถึงการทำงานของไมโทคอนเดรีย (mitochondrial activity) (80) นอกจากนี้ปริมาณค่าดูดกลืนแสงที่เกิดขึ้น มีความเกี่ยวข้องกับปัจจัยอื่น ๆ อีกด้วย เช่น ความเข้มข้นของ MTT ระยะเวลาในการบ่มเพาะสาร ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตที่ทำการทดสอบ และกระบวนการเมตาบอลิซึมที่เกิดขึ้น



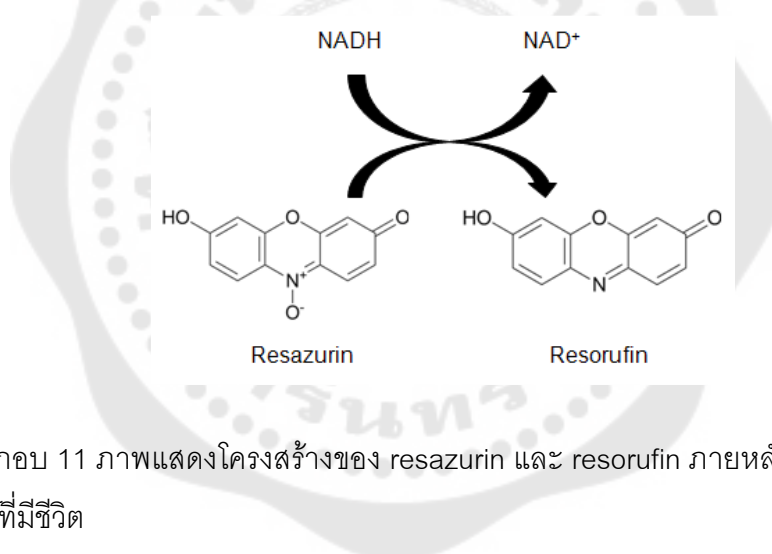
ภาพประกอบ 10 ภาพแสดงโครงสร้างของ MTT ที่ทำปฏิกิริยากับ NADH ได้เป็นสาร formazan

ที่มา : Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Duellman S. Cell Viability Assays. 2013 May 1 [Updated 2016 Jul 1] ed. Sittampalam GS GA, Brimacombe K, et al, editor. Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences 2004

MTT assays มีข้อดีในการทดสอบคือ เป็นการทดสอบที่ไม่ใช้สารกัมมันตภาพรังสี สามารถทำการทดลองได้ง่าย ประหยัดเวลา และสามารถทำการทดลองแบบหลายหลุม (multi-well plates) ได้ แต่อย่างไรก็ตามพบว่ามีความข้อเสียในด้านการแปลผล เนื่องจากผลที่ได้จากการทดลองเป็นการบ่งบอกกระบวนการเมตาบอลิซึมที่เกิดขึ้น ไม่สามารถวัดการเพิ่มจำนวนของเซลล์ที่แท้จริงได้ รวมถึงความเป็นพิษของผลิตภัณฑ์ฟอร์มazan ที่ได้เป็นผลเสียต่อเยื่อหุ้มเซลล์

2. Resazurin Reduction Assay Concept

resazurin เป็นสารทดสอบความมีชีวิตของเซลล์ที่มีวิธีการคล้ายกับการทดสอบด้วยสารประกอบ tetrazolium (81) resazurin สามารถละลายได้ในสารละลายบัฟเฟอร์เกิดเป็นสารละลายสีน้ำเงินเข้ม และเมื่อทำการเติมลงไปในงานเลี้ยง เซลล์ที่มีชีวิตจะทำปฏิกิริยารีดอกซ์กับ resazurin เกิดเป็นผลิตภัณฑ์ resorufin ที่เป็นสีชมพูและเรืองแสงได้ (ภาพประกอบ 11)



ภาพประกอบ 11 ภาพแสดงโครงสร้างของ resazurin และ resorufin ภายหลังการรับอิเล็กตรอนจากเซลล์ที่มีชีวิต

ที่มา : Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Duellman S. Cell Viability Assays. 2013 May 1 [Updated 2016 Jul 1] ed. Sittampalam GS GA, Brimacombe K, et al, editor. Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences 2004

ปริมาณของ resorufin ที่วัดได้เป็นสัดส่วนโดยตรงกับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต ซึ่งสามารถวัดได้โดยใช้เครื่อง microplate fluorometer วัดแสงจากสารเรืองแสงสีชมพู มีความแม่นยำมากกว่าการดูกลิ่นแสงปกติ จึงเป็นข้อได้เปรียบของการทดสอบ resazurin เมื่อเปรียบเทียบกับ การทดสอบ tetrazolium อย่างไรก็ตามมีการศึกษาพบข้อเสียของ resazurin ที่เกิด

ภายหลังการบ่มเพาะสารกับเซลล์เป็นระยะเวลาสั้น โดยพบการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ รวมถึงการทำงานของเซลล์ต่อการผลิต ATP ที่ลดลง ซึ่งเป็นผลมาจาก resazurin มีผลทำลายนิวคลีโอไทด์ภายในเซลล์

แคลเซียมไอออน (calcium ion)

แคลเซียมไอออนเป็นสารที่สำคัญต่อร่างกายมีหน้าที่สำคัญเกี่ยวข้องเป็นปัจจัยการแข็งตัวของเลือดในระยะเริ่มต้นของกระบวนการหายของแผล (healing process) (82) ซึ่งแคลเซียมไอออนนั้นมียูอยู่ทั้งภายในเซลล์ (intracellular calcium ion) และภายนอกเซลล์ (extracellular calcium ion) ปริมาณแคลเซียมไอออนภายในเซลล์เมื่ออยู่ในสภาวะพัก (resting) มีปริมาณประมาณ 100 nM หรือน้อยกว่า โดยแคลเซียมไอออนที่อยู่ภายในเซลล์จะทำหน้าที่ในการส่งสัญญาณภายในเซลล์ (intracellular signaling) เพื่อก่อให้เกิดการทำหน้าที่ของเซลล์ (cell function) (42) โดยปกติเซลล์จะมีการสมดุลระหว่างแคลเซียมไอออนภายในเซลล์ และภายนอกเซลล์ด้วยระบบขนส่ง (Ca^{2+} -transport) และ Ca^{2+} -Compartmentalization เมื่อเกิดความผิดปกติ หรือเกิดการบาดเจ็บของเซลล์ขึ้น แคลเซียมไอออนภายนอกเซลล์จะไหลเข้าสู่ภายในเซลล์ และเกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ได้(15) มีการศึกษาหลายการศึกษาที่พบว่าปริมาณแคลเซียมไอออนมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ (morphology) การควบคุมการเพิ่มจำนวนของเซลล์ (proliferation) และการเคลื่อนที่ของเซลล์ (migration) (15, 82, 83)

จากการศึกษาของ Orrenius et al. พบว่าปริมาณแคลเซียมไอออนมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์เมื่อมีปริมาณแคลเซียมไอออนภายนอกเซลล์มากผิดปกติ จะเกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ขึ้น โดยปรากฏการยื่นออกของผิวเซลล์ (protrusion) หรือเกิดการสร้างตุ่มพองใส (bleb formation) และเกิดการทำลายผนังเซลล์ของไมโทคอนเดรีย (mitochondria) ทำให้สามารถสร้าง ATP ได้น้อยลง (15) และในการศึกษาของ Magee et al. ที่เปรียบเทียบปริมาณแคลเซียมไอออนภายนอกเซลล์ระหว่างปริมาณ 0.1 mM และ 2.0 mM กับเซลล์เคราตินของมนุษย์ พบว่าเซลล์เคราตินมีการแสดงออกของลักษณะทางสัณฐานวิทยาดีกว่าเมื่ออยู่ในสภาวะที่มีแคลเซียมไอออนภายนอกเซลล์ที่น้อยกว่า ซึ่งลักษณะที่เปลี่ยนแปลงไปของเซลล์เมื่อเซลล์สัมผัสกับแคลเซียมไอออนที่มาก จะปรากฏลักษณะของเซลล์ที่แบนราบ (flatten) มากขึ้น และmicrovilli บนผิวเซลล์ที่น้อยลง (84)

ในส่วนของการทำหน้าที่เพิ่มจำนวนของเซลล์แต่ละชนิดที่สัมผัสกับแคลเซียมไอออนภายนอกเซลล์นั้น จะมีการตอบสนองที่แตกต่างกัน โดยพบว่าเซลล์เคราตินของหนูจะมีการเพิ่มจำนวนของ

เซลล์มากที่สุด เมื่อค่าความเข้มข้นของแคลเซียมไอออนภายนอกเซลล์มีระดับต่ำกว่า 0.1 mM ในขณะที่เซลล์ไฟโบรบลาสต์ผิวหนังมนุษย์มีการเพิ่มจำนวนของเซลล์มากที่สุด เมื่อค่าความเข้มข้นของแคลเซียมไอออนภายนอกเซลล์มีค่าประมาณ 1.4 mM บ่งบอกได้ว่าเซลล์ที่มีต้นกำเนิดจาก mesoderm จะมีความเข้มข้นของปริมาณแคลเซียมไอออนที่เหมาะสมที่สุดในการเจริญเติบโตของเซลล์มากกว่าเซลล์ที่มีต้นกำเนิดจาก ectoderm ถึง 100 เท่า (83) ดังนั้นเซลล์แต่ละชนิดมีการตอบสนองของอัตราการเพิ่มจำนวนของเซลล์ที่แตกต่างกัน และมีการศึกษาที่ทดสอบวัสดุห้ามเลือดที่มีส่วนประกอบของแคลเซียมไอออน เช่น Kaltostat ,Algisite M และ SeaSorb Soft (16, 17) พบว่ามีผลทำให้อัตราการเพิ่มจำนวนของเซลล์เคราตินของมนุษย์ลดลง

การศึกษาการเคลื่อนที่ของเซลล์ที่ทดสอบแคลเซียมไอออนภายนอกเซลล์ของไฟโบรบลาสต์ผิวหนังของหนูในปริมาณ 0.1 -3.5 mM พบว่ามีการเคลื่อนที่ของเซลล์เข้าสู่ช่องว่างมากที่สุด ในระดับแคลเซียมไอออนภายนอกเซลล์เท่ากับ 2.5 mM ซึ่งเป็นผลมาจากปริมาณแคลเซียมไอออนที่ไปกระตุ้นการทำงานของ calcium-dependent protein ที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่ของเซลล์ (85)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

ในการวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยได้ดำเนินงานตามขั้นตอนดังนี้

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

การกำหนดกลุ่มประชากรและการเลือกกลุ่มตัวอย่าง

ประชากร

เซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นไคดปริพันธ์ที่ผ่านการคัดแยกมาจากเนื้อเยื่อเอ็นไคดปริพันธ์ที่อยู่บริเวณผิวหนังของผู้ที่ให้ความยินยอม เก็บไว้ในคลังเก็บเซลล์ และได้รับการรับรองจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ (SWUEC-022/2563X)

การเลือกกลุ่มตัวอย่าง

เซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นไคดปริพันธ์ที่ทำการสุม 3-5 เซลล์ไลน์ (cell line) และเลือกเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในรุ่นที่ 3-8 มาทำการทดลอง

ขั้นตอนการทดลอง

1. การเตรียมวัสดุห้ามเลือด CA/NOCC ในแบบสัดส่วนต่างๆ

วัสดุห้ามเลือด CA/NOCC ถูกเตรียมโดยใช้สารองค์ประกอบของ โซเดียมอัลจิเนต (sodium alginate: SA) กับ N, O-carboxymethyl chitosan (NOCC) โดย SA และ NOCC ที่สัดส่วนน้ำหนักร่างต่าง ๆ ได้แก่ 100%CA, CN80/20, CN25/75 และ 100%NOCC จะถูกละลายด้วยน้ำที่ขจัดไอออนแล้ว (deionized water) สารละลายหนืดที่ได้จากการละลายและผสมสารองค์ประกอบดังกล่าวจะถูกเทลงในแม่แบบเพื่อทำเป็นแผ่นที่มีขนาดความหนาประมาณ 1 มิลลิเมตร ตามด้วยการนำไปทำให้แห้งด้วยวิธีฟรีซ-ดรายเพื่อผลิตเป็นรูปแบบฟองน้ำ นำชิ้นงานวัสดุที่ได้จุ่มลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์เป็นเวลา 10 นาที กระบวนการแลกเปลี่ยน Na^+

Ca^{2+} ระหว่าง Na^+ ในสารละลายโซเดียมอัลจิเนต (sodium alginate: SA) กับ Ca^{2+} ในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ (CaCl_2) เกิดเป็นวัสดุห้ามเลือด CA/NOCC ที่ต้องผ่านการล้างด้วยน้ำและทำให้วัสดุแห้งด้วยวิธีฟรีซ-ดรายอีกครั้งหนึ่ง วัสดุที่ได้จะอยู่ในรูปของแผ่นฟองน้ำบางๆ และตัดเป็นรูปร่างตามลักษณะการใช้งาน (วงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร และ 10 มิลลิเมตรหนา 1 มิลลิเมตร) (7) โดยวัสดุห้ามเลือด 100%CA, CN80/20, CN25/75 และ 100%NOCC จะถูกทำให้ปลดเชื้อโดยการฉายรังสีแกมมาหรือผ่านการอบฆ่าเชื้อด้วยแก๊สเอทิลีนออกไซด์ ส่วนวัสดุ CN80/20X, CN25/75X และ NOCC จะเป็นการนำวัสดุที่ขึ้นรูปเป็นฟองน้ำแล้ว ไปทำการนึ่งด้วยเครื่องอบแรงดันไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ทำให้เกิด cross-link ในองค์ประกอบ NOCC ของวัสดุ(86)

2. การเพาะเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นดอทีเลียล

เนื้อเยื่อบริเวณผิวหนังของผู้ให้ขออนุญาต จะถูกนำมาล้างด้วย Phosphate buffered saline (PBS) 2 ครั้ง นำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็ม (DMEM; Dulbecco Modified Eagle's Medium high glucose) ที่มีฟีทาลคลาฟซีรัม ร้อยละ 10 (10% Fetal calf serum; FCS) กลูตามีน 2 มิลลิโมลาร์ (2 mM L-Glutamine) เพนนิซิลลิน 100 IU ต่อ มิลลิลิตร (100IU Penicillin) สเตรปโตมัยซิน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Streptomycin) และแอมโฟเทอริซินบี 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Amphotericin B) ภายใต้ตู้บัพที่มีความชื้นและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ร้อยละ 5 (5% CO_2) ณ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เมื่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นดอทีเลียลที่เพาะเลี้ยงมีการเพิ่มจำนวนเพียงพอจะทำการถ่ายโอนเซลล์ (Subculture) สู่อานเลี้ยงเซลล์ใหม่ จากนั้นทำการเพาะเลี้ยงจนได้เซลล์ในรุ่นที่ 3-8 และทำการเก็บเซลล์ไว้ในคลังเก็บเซลล์ (87)

3. การวัดระดับแคลเซียมไอออน

นำอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ดูดออกจากหลุมทดสอบของการทดลอง cell proliferation assay ทั้งที่อยู่ในหลุมที่มีวัสดุทดสอบ และไม่มีวัสดุทดสอบ แล้วทำการวัดปริมาณแคลเซียมไอออนที่ปลดปล่อยออกมาในอาหารเลี้ยงเซลล์ด้วยชุดทดสอบ Quantichrom Calcium Assay Kit (BioAssay Systems, Hayward, USA) โดยการดูดอาหารเลี้ยงเซลล์แต่ละหลุมออกมาเป็นปริมาตร 5 ไมโครลิตร ลงในหลุมของจานเลี้ยงชนิด 96 หลุม จากนั้นเติมสารทดสอบที่ผสมจากชุดทดสอบอีก 200 ไมโครลิตร นำไปแกว่งให้สารผสมกันเป็นระยะเวลา 3 นาที ณ อุณหภูมิห้อง แล้ว

วัดปริมาณการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 612 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง Microplate reader (Asys UVM340; Biochrom, Cambridge, UK)

4. การทดสอบการเพิ่มจำนวนเซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นอีคปริทันต์ (cell proliferation assay)

วางวัสดุห้ามเลือด CA/NOCC ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร หน้า 1 มิลลิเมตร ลงบนจานเลี้ยงเซลล์ชนิด 24 หลุม จากนั้นทำการแยกเซลล์จากจานเลี้ยงโดยใช้ 0.5% Trypsin-EDTA และหว่านเซลล์ลงบนวัสดุห้ามเลือด CA/NOCC จำนวน 2×10^4 เซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM 1,000 ไมโครลิตร ต่อหลุมการทดลอง (โดยกำหนดให้หลุมที่มีเฉพาะเซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นอีคปริทันต์เป็นกลุ่มควบคุม) และแต่ละกลุ่มทดลองจะมีการทำซ้ำ 3 หลุมต่อกลุ่ม โดยทำการเตรียมเป็น 3 ชุดการทดลอง และนำจานเลี้ยงเซลล์ทั้งหมดเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เพื่อวัดความมีชีวิตของเซลล์ที่ 1, 3 และ 6 วัน ซึ่งเริ่มการทดสอบด้วยการดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ และวัสดุห้ามเลือดออกให้หมด แล้วล้างด้วย PBS หลุมละ 1,000 ไมโครลิตร ทำการวัดความมีชีวิตของเซลล์ด้วยการทดสอบเอ็มทีที (MTT assay, [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5 Diphenyltetrazoliumbromide]) ตามวิธีจากการศึกษาที่ผ่านมา (13) และทำการทดสอบเช่นเดียวกันในชุดการทดลองของวันที่ 3 และ 6 และคำนวณอัตราการเพิ่มขึ้นของจำนวนเซลล์จากวันที่ 1-6 เป็นร้อยละโดยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

5. การศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope/SEM)

มีการทดสอบด้วยการวางวัสดุห้ามเลือด CA/NOCC ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 10 มิลลิเมตร หน้า 1 มิลลิเมตร บนแผ่นกระจกใส (Cover glass) ในจานเลี้ยงชนิด 24 หลุม จากนั้นทำการแยกเซลล์จากจานเลี้ยงโดยใช้ 0.5% Trypsin-EDTA และหว่านเซลล์ลงบนวัสดุห้ามเลือด CA/NOCC จำนวน 6×10^4 เซลล์ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM 1,000 ไมโครลิตร ต่อหลุมการทดลอง นำจานเลี้ยงเซลล์เข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 7 วัน (กำหนดให้จานเลี้ยงเซลล์ที่มีเฉพาะเซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นอีคปริทันต์เป็นกลุ่มควบคุม) จากนั้นนำไปเข้าสู่กระบวนการเตรียมเพื่อทำการวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดตามขั้นตอนในการศึกษาก่อนหน้า (13) และทำการบันทึกข้อมูลความหนาแน่นและลักษณะพื้นผิวของเซลล์

การเก็บรวบรวมข้อมูล

1. ประเมินปริมาณของแคลเซียมไอออนที่ถูกปลดปล่อยลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ จากปริมาณการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 612 นาโนเมตร ในการทดสอบ Quanticrom Calcium Assay Kit
2. ประเมินการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นไคดปริทันต์ จากปริมาณการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร ในการทดสอบเอ็มทีที (MTT assay)
3. ประเมินรูปร่างของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นไคดปริทันต์ จากการวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)

สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

ลักษณะทางสถิติพื้นฐานวิทยาของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นไคดปริทันต์ ทำการรายงานความเปลี่ยนแปลงลักษณะของเซลล์เชิงพรรณนา ส่วนอัตราการเพิ่มจำนวนของ และปริมาณแคลเซียมไอออนที่ปลดปล่อยนั้นเป็นการศึกษาเชิงทดลอง ซึ่งทำการรายงานผลเป็นค่าเฉลี่ย และค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และทำการวิเคราะห์ทางสถิติ ด้วยการใช้ Shapiro-Wilk Test เพื่อทดสอบการแจกแจงแบบปกติของข้อมูล มีการใช้ one-way ANOVA ในการทดสอบความแปรปรวนของข้อมูล อัตราการเพิ่มจำนวนของเซลล์ และปริมาณแคลเซียมไอออนที่ปลดปล่อย ทำการเปรียบเทียบพหุคูณด้วย Tukey's multiple comparison test โดยกำหนดระดับนัยสำคัญที่ 0.05 การวิเคราะห์ทางสถิติทำโดยใช้โปรแกรม GraphPad Prism version 8.0.1 สำหรับ Windows

บทที่ 4

ผลการดำเนินงานวิจัย

ผลการวิจัยได้ดำเนินการทดสอบตามขั้นตอนต่างๆ และได้ผลการดำเนินงานวิจัยตามหัวข้อดังต่อไปนี้

1. ปริมาณของแคลเซียมไอออน
2. การเพิ่มจำนวนของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นดีบริตันต์
3. ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นดีบริตันต์

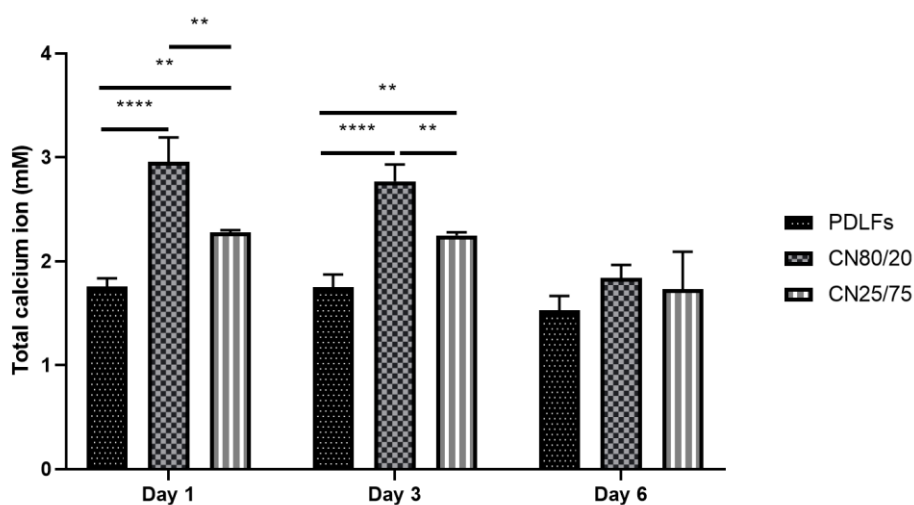
ปริมาณของแคลเซียมไอออน

จากเอกสารประกอบของอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM แสดงปริมาณแคลเซียมไอออนอยู่ประมาณ 1.36 mM เมื่อทำการผสมองค์ประกอบต่างๆ ที่จำเป็นสำหรับการเลี้ยงเซลล์(DMEM +/+) แล้วนำไปตรวจวัดระดับของแคลเซียมไอออนมีค่าประมาณ 1.42 mM ดังนั้นปริมาณของแคลเซียมไอออนที่วัดได้จากการเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ของการทดลองการเพิ่มจำนวนของเซลล์นี้ จะรวมปริมาณแคลเซียมไอออนที่พบใน DMEM+/+ อยู่ด้วย

เบื้องต้นผู้วิจัยได้ทำการแช่วัสดุทดสอบ CN80/20 และ CN25/75 ไว้ในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM+/+ (DMEM+CN80/20 และ DMEM+CN25/75) เป็นระยะเวลา 3 วัน แล้วนำอาหารเลี้ยงเซลล์ในจานเลี้ยงไปวัดปริมาณแคลเซียมไอออน พบว่าระดับของแคลเซียมไอออนที่วัดได้ในวันที่ 1 และ 3 ใกล้เคียงกัน โดยมีค่าเฉลี่ยปริมาณแคลเซียมไอออนของกลุ่ม DMEM+CN80/20 เท่ากับ 2.35 ± 0.23 และ 2.43 ± 0.31 mM ในวันที่ 1 และ 3 ตามลำดับ ส่วนกลุ่ม DMEM+CN25/75 พบค่าเฉลี่ยปริมาณแคลเซียมไอออนเท่ากับ 2.66 ± 0.25 และ 2.48 ± 0.25 mM ในวันที่ 1 และ 3 ตามลำดับ สามารถสังเกตได้ว่าปริมาณแคลเซียมที่ปลดปล่อยจากวัสดุหุ้มเลือด CA/NOCC จะคงที่เมื่อเทียบระหว่างวันที่ 1 และ 3 ซึ่งเป็นการบ่งบอกว่าวัสดุมีการปลดปล่อยแคลเซียมออกมาในปริมาณสูง (burst release) ตั้งแต่วันที่ 1 ของการแช่วัสดุในอาหารเลี้ยงเซลล์

เมื่อทำการเลี้ยงเซลล์ PDLFs ร่วมกับวัสดุ CN80/20 และ CN25/75 ที่ระยะเวลา 1, 3 และ 6 วัน เพื่อวัดอัตราการเพิ่มจำนวนของเซลล์ เราจะเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ในแต่ละวันมาและทำการวัดระดับแคลเซียมไอออนทั้ง 3 กลุ่ม ได้แก่ PDLFs (กลุ่มควบคุม) CN80/20 และ CN25/75 โดยพบว่าแต่ละกลุ่มจะมีระดับแคลเซียมไอออนในอาหารเลี้ยงเซลล์ในระดับใกล้เคียงกันเมื่อ

เปรียบเทียบวันที่ 1 และ 3 ซึ่งผลการทดลองของกลุ่มควบคุมมีปริมาณแคลเซียมไอออนในอาหารเลี้ยงเซลล์ เท่ากับ 1.76 ± 0.08 mM และ 1.75 ± 0.12 mM ในวันที่ 1 และ 3 ตามลำดับ ในกลุ่มทดสอบ CN80/20 พบค่าเฉลี่ยปริมาณแคลเซียมไอออนในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่สูงกว่าในกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ได้แก่ 2.96 ± 0.24 mM (p - value < 0.0001) และ 2.77 ± 0.16 mM (p - value < 0.0001) ในวันที่ 1 และ 3 ตามลำดับ ส่วนในกลุ่ม CN 25/75 พบค่าเฉลี่ยปริมาณแคลเซียมไอออนที่สูงกว่าในกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ได้แก่ 2.27 ± 0.023 mM (p - value < 0.01) และ 2.25 ± 0.03 mM (p - value < 0.01) ในวันที่ 1 และ 3 ตามลำดับ เช่นเดียวกัน และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณแคลเซียมไอออนระหว่างกลุ่ม CN80/20 และ CN25/75 จะพบว่ากลุ่ม CN80/20 มีปริมาณแคลเซียมไอออนในอาหารเลี้ยงเซลล์มากกว่ากลุ่ม CN25/75 ทั้งในวันที่ 1 และวันที่ 3 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p - value < 0.01) แต่เมื่อวัดปริมาณแคลเซียมไอออนในอาหารเลี้ยงเซลล์ในวันที่ 6 จะเห็นได้ว่าปริมาณแคลเซียมมีระดับใกล้เคียงกัน ทั้ง 3 กลุ่ม คือมีค่าเฉลี่ยปริมาณแคลเซียมไอออนประมาณ 1.53 ± 0.14 , 1.84 ± 0.13 และ 1.73 ± 0.36 mM ในกลุ่ม PDLFs, CN80/20 และ CN25/75 ตามลำดับ ซึ่งเป็นผลมาจากการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM++ ในวันที่ 3 สำหรับงานเลี้ยงที่จะทำการทดสอบความมีชีวิตของเซลล์ ในวันที่ 6 จึงทำให้ปริมาณแคลเซียมไอออนในกลุ่มที่มีการเลี้ยงร่วมกับวัสดุทดสอบ (CN80/20 และ CN2575) ในสามวันแรกถูกกำจัดออกไป (ภาพประกอบ 12)



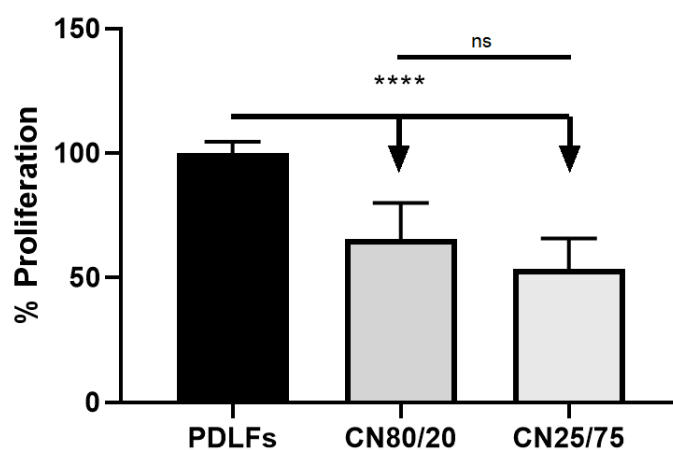
ภาพประกอบ 12 รูปแสดงปริมาณแคลเซียมไอออนในอาหารเลี้ยงเซลล์ใน วันที่ 1, 3 และ 6 ตามลำดับ โดยเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของปริมาณแคลเซียมไอออนเป็นมิลลิโมลาร์ (mM) ระหว่าง 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ หรือกลุ่มควบคุม (PDLFs) กลุ่มที่เลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์ร่วมกับวัสดุห้ามเลือดสัดส่วน 80:20 และ 25:75 (CN80/20 และ CN25/75 ตามลำดับ) (**** มีนัยสำคัญทางสถิติ p - value < 0.0001, ** มีนัยสำคัญทางสถิติ p - value < 0.01 และ ns ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ) ($n = 2 \times 2$ กลุ่ม)

การเพิ่มจำนวนของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นยิดปริทันต์

การทดลองชุดที่ 1

เป็นทดสอบการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นยิดปริทันต์กับวัสดุห้ามเลือด CANOCC ในสัดส่วนต่างๆ โดยวัดการมีชีวิตของเซลล์ด้วยการทดสอบเอ็มทีที (MTT assay) เป็นการวัดการดูดกลืนแสง ณ วันที่ 1, 3 และ 6 แล้วนำมาคำนวณหาอัตราการเพิ่มจำนวนของเซลล์ เบื้องต้นผู้วิจัยได้ทำการทดสอบกลุ่ม PDLFs (กลุ่มควบคุม), CN80/20 และ CN25/75 พบว่าอัตราการเพิ่มจำนวนของเซลล์ของกลุ่ม CN80/20 ($65.56 \pm 14.52\%$) และ CN25/75 ($53.51 \pm 12.36\%$) ลดลงประมาณร้อยละ 35 และ 50 ตามลำดับ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($100.04 \pm 4.53\%$) (p - value < 0.0001) และเมื่อประเมินความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเพิ่มจำนวนของเซลล์กับปริมาณแคลเซียมไอออนในอาหารเลี้ยงเซลล์แต่ละกลุ่ม (ตาราง 2) จะเห็นได้ว่าระดับของแคลเซียมไอออนที่วัดได้ในกลุ่ม CN25/75 มีปริมาณน้อยกว่าในกลุ่ม CN80/20 แต่อัตราการเพิ่มจำนวนของเซลล์

ในกลุ่ม CN25/75 กลับมีแนวโน้มโดยเฉลี่ยลดลงแต่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับกลุ่ม CN80/20 ที่มีระดับแคลเซียมไอออนที่สูงกว่า ในภาพประกอบ 13 และตาราง 2



ภาพประกอบ 13 กราฟแท่งแสดงอัตราการเพิ่มจำนวนของเซลล์ในกลุ่ม PDLFs (กลุ่มควบคุม), CN80/20 และ CN25/75 พบว่ากลุ่ม CN80/20 และ CN25/75 มีอัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์น้อยกว่ากลุ่ม PDLFs อย่างมีนัยสำคัญ (**** มีนัยสำคัญทางสถิติ p -value < 0.0001 และ ns ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ) ($n = 4 \times 2$ หลุม)

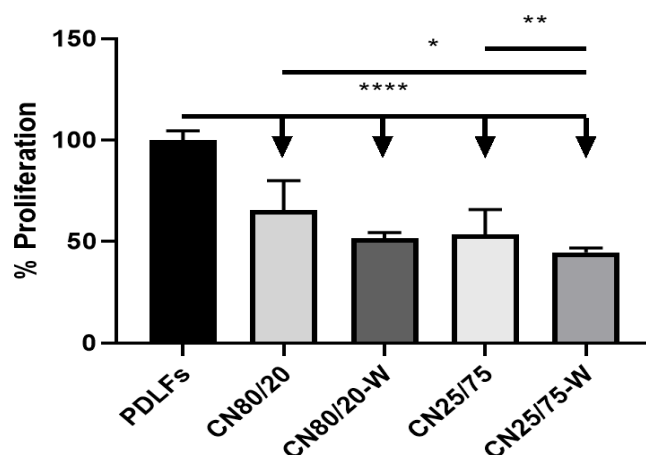
ตาราง 2 แสดงค่าเฉลี่ย (mean) ของปริมาณแคลเซียมไอออน (มิลลิโมลาร์ หรือ mM) และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ที่วัดได้ ณ วันที่ 1 3 และ 6 ของกลุ่ม PDLFs (กลุ่มควบคุม) CN80/20 และ CN25/75

	วันที่ 1	วันที่ 3	วันที่ 6
PDLFs	1.75±0.08	1.75±0.12	1.53±0.14
CN80/20	2.96±0.24	2.77±0.16	1.84±0.13
CN25/75	2.28±0.02	2.25±0.03	1.73±0.36

การทดลองชุดที่ 2

จากผลการทดลองชุดที่ 1 ที่ได้ทำการปรับสัดส่วนองค์ประกอบของวัสดุ CA/NOCC จาก CN80/20 มาเป็น CN25/75 ซึ่งเป็นการลดสัดส่วนของแคลเซียมอัลจิเนต และส่งผลให้มีการ

ปลดปล่อยแคลเซียมไอออนที่ลดลง แต่ยังพบว่าอัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์กลับมีแนวโน้มลดลง ดังนั้นเพื่อเป็นการพิสูจน์ว่าผลในเชิงลบต่อเซลล์ไม่ได้มาจากแคลเซียมไอออน เราจึงทำการทดสอบผลของวัสดุทั้ง CN80/20 และ CN25/75 ที่ได้ทำการขจัดแคลเซียมไอออนออก โดยการแช่วัสดุ CA/NOCC ในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM++ เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง แล้วดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออก (pre-washed) ก่อนทำการหว่านเซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นดोทีรียัลเพื่อทดสอบการเพิ่มจำนวนเซลล์ในวันที่ 1, 3 และ 6 ต่อไป โดยเปรียบเทียบกับเซลล์เลี้ยงร่วมกับวัสดุแบบปกติ ซึ่งจากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าอัตราการเพิ่มจำนวนของเซลล์ในกลุ่ม CN80/20-W ($51.60 \pm 2.90\%$) และ CN25/75-W ($44.72 \pm 2.06\%$) น้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญ (p -value < 0.0001) เมื่อเทียบกับกลุ่ม PDLFs ($100.04 \pm 4.53\%$) นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบระหว่างวัสดุในสัดส่วนเดียวกันระหว่างการทดสอบแบบปกติกับการทดสอบแบบ pre-washed พบว่า โดยเฉลี่ยแล้วการ pre-wash วัสดุส่งผลให้อัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์มีแนวโน้มลดลงกว่าการทดสอบแบบปกติ แต่มีเฉพาะในกลุ่ม CN25/75-W ที่มีอัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์ที่น้อยกว่ากลุ่ม CN25/75 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p -value < 0.01) และยังพบว่ากลุ่ม CN80/20 มีอัตราการเพิ่มจำนวนมากกว่ากลุ่ม CN25/75-W อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p -value < 0.05) (ภาพประกอบ 14) จะเห็นได้ว่าการ pre-wash วัสดุ CA/NOCC เพื่อกำจัดปริมาณของแคลเซียมไอออนที่ปลดปล่อยออกมาในระดับสูงตั้งแต่วันแรก (ประมาณ 2.35-2.66 mM) กลับส่งผลให้อัตราการเพิ่มจำนวนของเซลล์ลดลงไปอีก แสดงให้เห็นว่าปริมาณแคลเซียมไอออนที่สูงกว่าปกติ อาจจะไม่ใช่ว่าปัจจัยหลักที่ส่งผลให้อัตราการเพิ่มจำนวนของเซลล์ลดลง ดังนั้นผลในเชิงลบต่อเซลล์อาจมาจากองค์ประกอบอื่นในวัสดุห้ามเลือด CA/NOCC นี้ เช่น NOCC

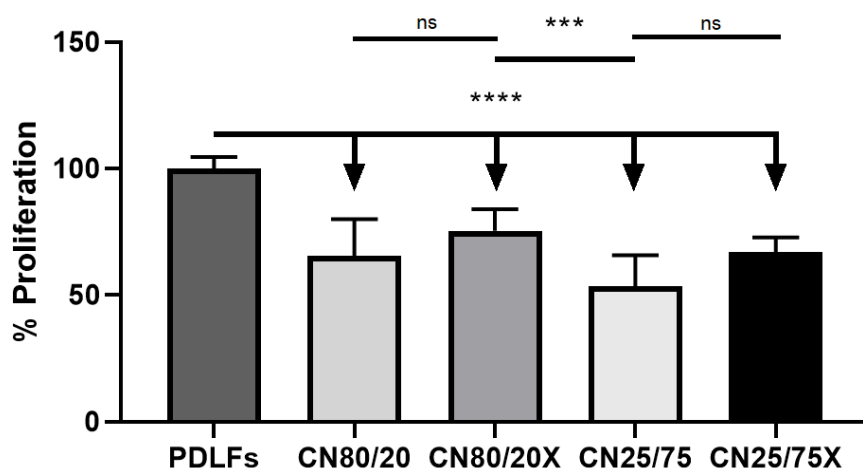


ภาพประกอบ 14 กราฟแท่งแสดงอัตราการเพิ่มจำนวนของเซลล์เปรียบเทียบการทดสอบแบบปกติกับแบบ pre-washed โดยพบกลุ่ม CN25/75-W มีอัตราการเพิ่มจำนวนของเซลล์น้อยกว่า CN25/75 และ CN80/20 (**** มีนัยสำคัญทางสถิติ p - value < 0.0001, ** มีนัยสำคัญทางสถิติ p - value < 0.01 และ * มีนัยสำคัญทางสถิติ p - value < 0.05) ($n = 2 \times 2$ หลุม)

การทดลองชุดที่ 3

จากนั้นทาง MTEC ได้ผลิตวัสดุห้ามเลือด CA/NOCC ที่ทำการ cross-link เพื่อทำให้วัสดุมีความแข็งแรงขึ้น ส่งผลให้มีการสลายตัวในองค์ประกอบของ NOCC น้อยลงในทั้ง 2 สัดส่วนคือ CN80/20X และ CN25/75X และเราได้นำมาทดสอบผลต่ออัตราการเพิ่มขึ้นของจำนวนเซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นดอทีรียัลจากวันที่ 1-6 โดยเปรียบเทียบกับวัสดุห้ามเลือด CA/NOCC ที่เตรียมแบบปกติ และกลุ่มควบคุม (PDLFs) พบว่ากลุ่มทดลองทุกกลุ่มมีอัตราการเพิ่มจำนวนของเซลล์ที่น้อยกว่ากลุ่มควบคุม ($100.04 \pm 4.53\%$) อย่างมีนัยสำคัญ (p - value < 0.0001) ซึ่งในการทดลองชุดนี้เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มวัสดุห้ามเลือด CA/NOCC ที่เตรียมแบบปกติ และแบบ cross-link จะพบว่าวัสดุห้ามเลือด CA/NOCC ที่เตรียมแบบปกติมีผลทำให้อัตราการเพิ่มจำนวนของเซลล์ที่แน่นน้อยกว่าแบบ cross-link โดยเฉลี่ยประมาณร้อยละ 10-15 เมื่อเทียบในกลุ่มที่มีสัดส่วนเดียวกัน และพบว่ากลุ่ม CN25/75 ($53.51 \pm 12.36\%$) มีอัตราการเพิ่มจำนวนของเซลล์น้อยกว่ากลุ่ม CN80/20X ($75.45 \pm 8.46\%$) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p - value < 0.001) (ภาพประกอบ 15) จากผลการทดลองชุดนี้ แสดงให้เห็นว่าเมื่อมีการสลายตัวในองค์ประกอบของ NOCC ที่น้อยลงจากกระบวนการ cross-link จะส่งผลให้เซลล์มีแนวโน้มการเพิ่มจำนวนมากขึ้น

ดังนั้นเราจึงตั้งสมมติฐานว่าผลในเชิงลบต่อเซลล์น่าจะมาจากส่วนของ NOCC ที่สลายออกมาจากวัสดุ

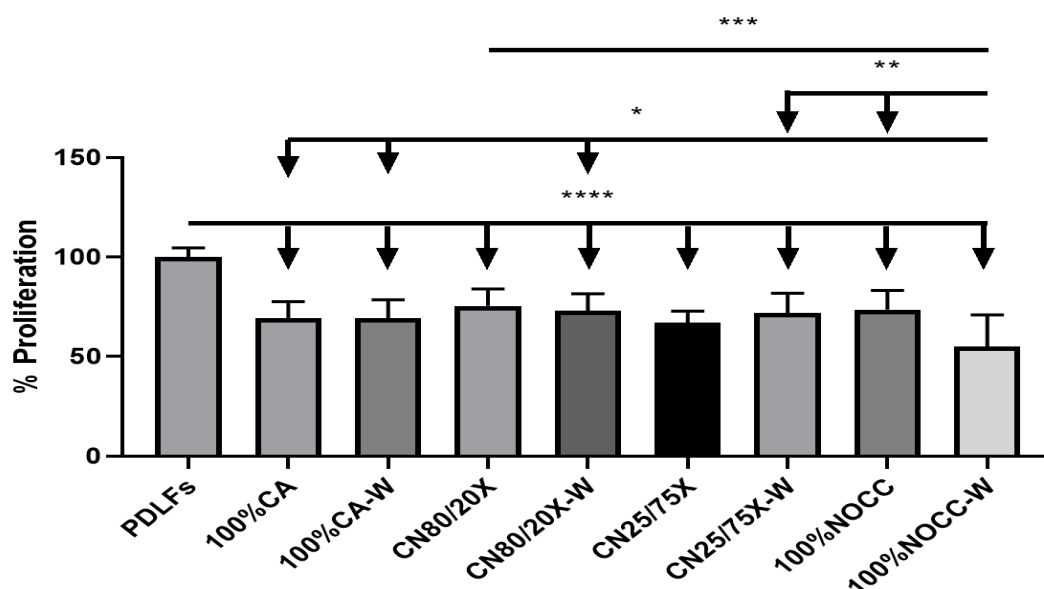


ภาพประกอบ 15 กราฟแท่งแสดงอัตราการเพิ่มจำนวนของเซลล์เปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม PDLFs (กลุ่มควบคุม) และวัสดุหุ้ม CA/NOCC ที่เตรียมแบบปกติ และแบบ cross-link (กลุ่มทดสอบ) ในสัดส่วน 80:20 และ 25:75 (**** มีนัยสำคัญทางสถิติ p - value < 0.0001, *** มีนัยสำคัญทางสถิติ p - value < 0.001 และ ns ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ) ($n = 4 \times 2$ กลุ่ม)

การทดลองชุดที่ 4

เพื่อเป็นการพิสูจน์ให้แน่ชัดถึงปัจจัยเชิงลบต่อเซลล์ที่อาจมาจาก NOCC ทาง MTEC จึงผลิตวัสดุเพิ่ม ได้แก่ 100%CA และ 100%NOCC เพื่อนำมาประเมินผลต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นดอทีรียัล และเปรียบเทียบกับวัสดุ CA/NOCC ทั้งสองสัดส่วนที่ผ่านการ cross-link ในองค์ประกอบของ NOCC โดยทำการเปรียบเทียบระหว่างการทดสอบแบบปกติ และแบบ pre-washed กลุ่มทดลองทั้งหมดประกอบด้วย PDLFs (กลุ่มควบคุม), 100%CA, 100%CA-W, CN80/20X, CN80/20X-W, CN25/75X, CN25/75X-W, 100%NOCC และ 100%NOCC-W จากผลการทดลองพบว่ากลุ่มทดสอบทุกกลุ่มมีอัตราการเพิ่มจำนวนของเซลล์น้อยกว่ากลุ่มควบคุม (100 ± 4.53 %) อย่างมีนัยสำคัญ (p - value < 0.0001) และพบว่ากลุ่ม NOCC-W (54.96 ± 15.96 %) มีอัตราการเพิ่มจำนวนที่น้อยกว่ากลุ่มอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้น มีค่า p - value < 0.05 เมื่อเทียบกับกลุ่ม 100%CA (69.18 ± 8.36 %), 100%CA-W (69.32 ± 9.30 %) และ CN80/20X-W (73.06 ± 8.45 %) มีค่า p - value < 0.01 เมื่อเทียบกับกลุ่ม

CN25/75-W ($71.78 \pm 10.02\%$) และ NOCC ($73.57 \pm 9.70\%$) และมีค่า p - value < 0.001 เมื่อเทียบกับกลุ่ม CN80/20X ($75.45 \pm 8.46\%$) (ภาพประกอบ 16)

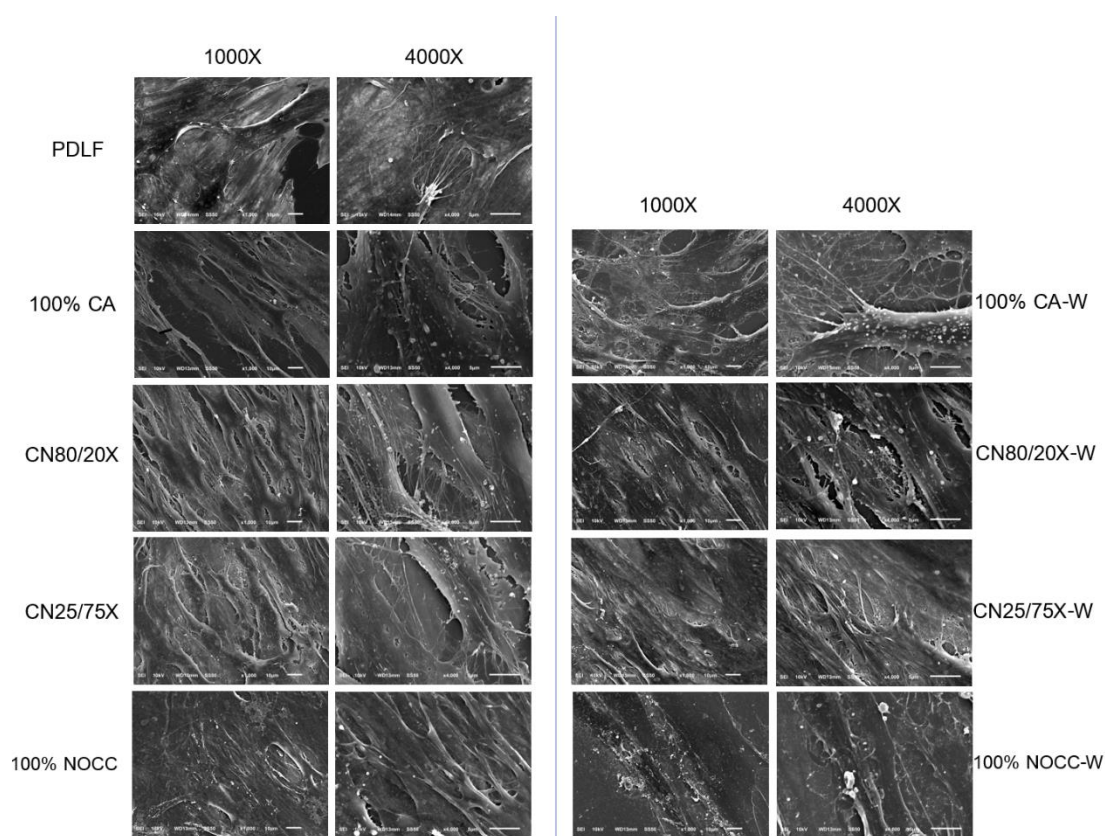


ภาพประกอบ 16 กราฟแท่งแสดงอัตราการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นยิดปริทันต์ที่เลี้ยงร่วมกับวัสดุห้ามเลือด CA/NOCC ที่ผ่านการ cross-link สัดส่วนต่างๆ โดยการทดสอบแบบปกติ และแบบ pre-washed (**** มีนัยสำคัญทางสถิติ p - value < 0.0001 , *** มีนัยสำคัญทางสถิติ p - value < 0.001 , ** มีนัยสำคัญทางสถิติ p - value < 0.01 และ * มีนัยสำคัญทางสถิติ p - value < 0.05) ($n = 4 \times 2$ กลุ่ม)

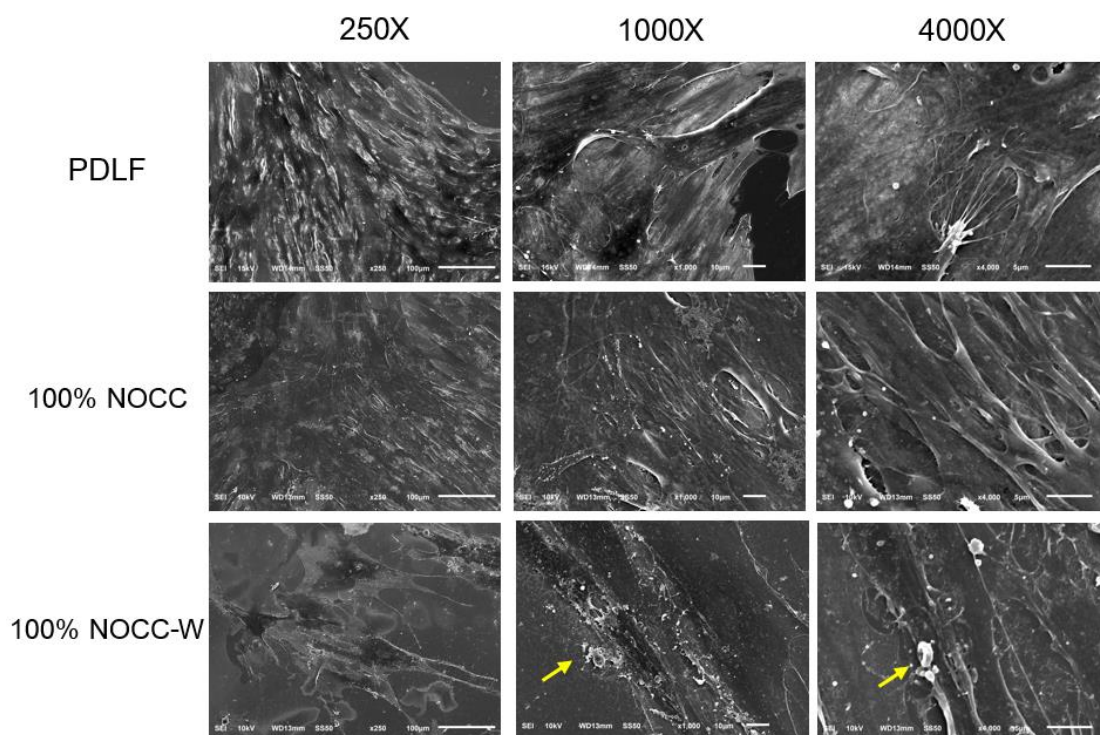
ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นยิดปริทันต์

จากการใช้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด (Scanning electron microscope) ในการประเมินลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นยิดปริทันต์ที่เลี้ยงร่วมกับวัสดุห้ามเลือด CA/NOCC สัดส่วนต่างๆ เป็นระยะเวลา 7 วัน พบว่าในกลุ่ม PDLF (กลุ่มควบคุม) รูปร่างของเซลล์เป็นรูปกระสวย เซลล์มีการแผ่ตัวยึดเกาะกับแผ่นกระจกกันใสด้วยฟิโลโปเดีย (filopodia) และพื้นผิวของเซลล์ค่อนข้างเรียบ ส่วนเซลล์ที่เลี้ยงกับวัสดุห้ามเลือด CA/NOCC สัดส่วนต่างๆ ที่ผ่านการ cross-link และทดสอบด้วยวิธีปกติ จะพบว่ากลุ่มที่มีสัดส่วนองค์ประกอบของ NOCC ที่มากขึ้นนั้น จะมีการเปลี่ยนแปลงของเซลล์โดยมีลักษณะผิวเซลล์ที่มีความขรุขระมากขึ้น โดยมีการสร้างเส้นใย (fibril) และตุ่มพองใส (blebs) ออกมาเพิ่มขึ้น (ภาพประกอบ 17 ชุดด้านซ้าย) ส่วนในกลุ่มทดสอบแบบ pre-washed เมื่อทำการเปรียบเทียบกับ การทดสอบแบบปกติ จะพบว่าเซลล์มี

ลักษณะของผิวเซลล์ที่ขรุขระมากขึ้นจากการปรากฏเส้นใย (fibrils) และตุ่มพองใส (blebs) (ภาพประกอบ 17 ชุดด้านขวา) โดยเฉพาะในกลุ่ม 100%NOCC เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม 100%NOCC-W พบว่า 100%NOCC-W จะมีลักษณะพื้นผิวที่ผิดปกติ โดยมีการปรากฏเส้นใย (fibrils) และตุ่มพองใส (blebs) มากกว่า ดังลูกศรชี้เหลืองในภาพ และพบความหนาแน่นของเซลล์ที่น้อยลง เมื่อสังเกตผ่านกำลังขยาย 250 เท่า (ภาพประกอบ 18)



ภาพประกอบ 17 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นดอทีเลียลที่เลี้ยงมาเป็นระยะเวลา 7 วัน บนแผ่นกระจกกันใส โดยมีกลุ่มควบคุม (PDLFs) และกลุ่มทดสอบที่ทำการเลี้ยงเซลล์ร่วมกับวัสดุห้ามเลือด CA/NOCC สัดส่วนต่างๆ ที่ผ่านการ cross-link โดยทำการทดสอบแบบปกติ (ด้านซ้าย) และแบบ pre-washed (ด้านขวา) ที่กำลังขยาย 1000X และ 4000X ตามลำดับ

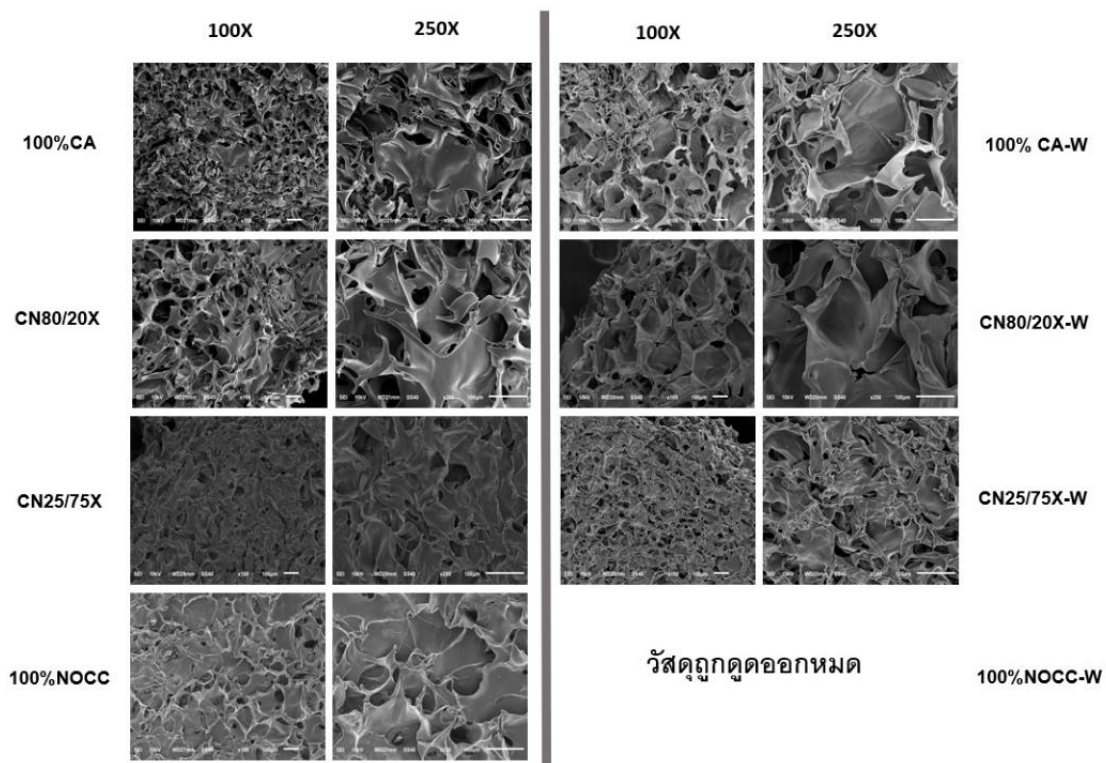


ภาพประกอบ 18 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เอนดอทีเลียลที่เลี้ยงมาเป็นระยะเวลา 7 วัน บนแผ่นกระจกใส โดยเป็นภาพของเซลล์ในกลุ่ม PDLF 100%NOCC และ 100%NOCC-W ที่กำลังขยาย 250X, 1000X และ 4000X ตามลำดับ ลูกศรชี้เหลืองแสดงตุ่มพองใส (blebs) ที่พบบนผิวของเซลล์

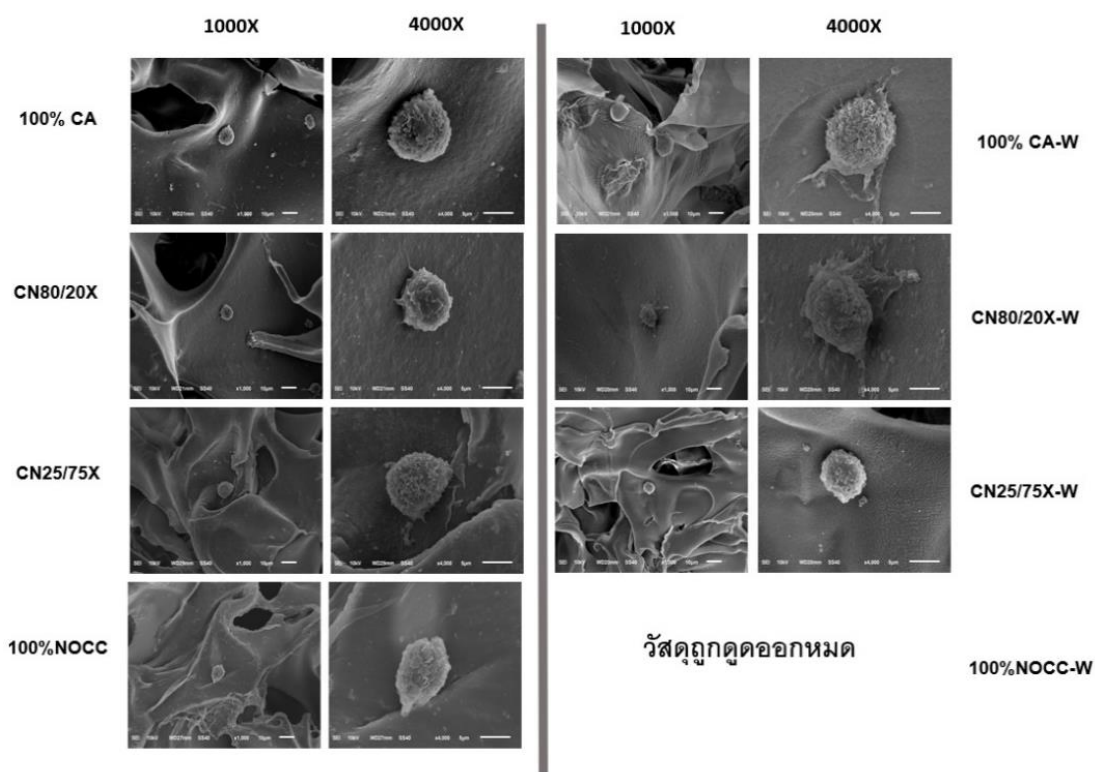
เมื่อสังเกตลักษณะของวัสดุหุ้มเลือดที่เปลี่ยนแปลงไปด้วยภาพ SEM ที่กำลังขยาย 100X และ 250X ภายหลังจากเลี้ยงร่วมกับเซลล์มาเป็นเวลา 7 วัน พบว่าวัสดุที่ทดสอบแบบ pre-washed มีขนาดของรูพรุนใหญ่ (large porosity) เกิดการคลายตัว และเปื่อยยุ่ยขึ้นบนผิววัสดุ เมื่อเปรียบเทียบกับวัสดุที่ไม่ได้ผ่านการ pre-washed โดยที่กลุ่ม 100%NOCC-W ไม่สามารถเก็บตัวอย่างมาได้ เนื่องจากวัสดุเกิดการสลายตัวปะปนกับอาหารเลี้ยงเซลล์จนไม่สามารถแยกออกได้ (ภาพประกอบ 19) แสดงให้เห็นว่าการ pre-wash วัสดุเป็นเวลา 24 ชั่วโมงก่อนการหว่านเซลล์ มีผลทำให้วัสดุอาจเริ่มมีการสลายตัวบ้าง ซึ่งส่งผลให้เห็นลักษณะของวัสดุที่แตกต่างจากกลุ่มวัสดุที่ไม่ผ่านการ pre-wash อย่างชัดเจน

จากการใช้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด เพื่อประเมินการยึดติดและรูปร่างของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เอนดอทีเลียลที่พื้นผิวของวัสดุในทุกกลุ่ม พบว่ามีการยึดติดของเซลล์บนผิววัสดุน้อยมาก และเมื่อสังเกตลักษณะของเซลล์ที่พบบนวัสดุหุ้มเลือดด้วยภาพ SEM ที่กำลังขยาย 1000X และ

4000X พบว่าเซลล์มีลักษณะเป็นรูปทรงกลม ไม่พบการยื่นออกของพิลิโปเดียของเซลล์มายึดเกาะกับพื้นผิววัสดุในกลุ่มทดสอบส่วนใหญ่ ยกเว้น กลุ่ม 100%CA-W และ CN80/20X-W ที่พบการยื่นออกของพิลิโปเดียของเซลล์ไปยังผิวของวัสดุหุ้มเลือดเล็กน้อย (ภาพประกอบ 20)

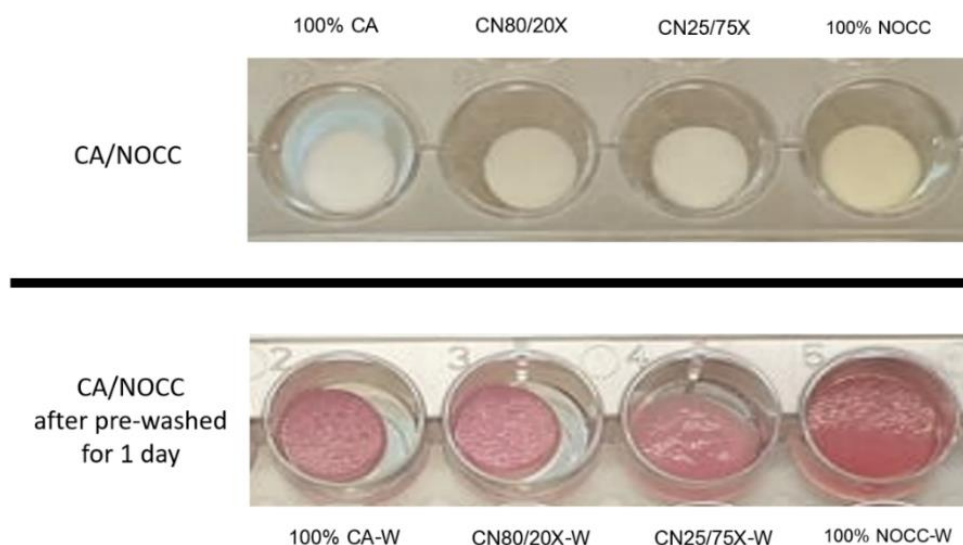


ภาพประกอบ 19 ลักษณะของวัสดุหุ้มเลือด CA/NOCC ที่ผ่านการเลี้ยงร่วมกับเซลล์ไฟโบรblast เอ็นดอทีเลียลเป็นระยะเวลา 7 วัน โดยภาพทางฝั่งด้านซ้ายเป็นของวัสดุที่เลี้ยงเซลล์ แบบปกติ ส่วนภาพทางฝั่งด้านขวาเป็นของวัสดุที่ผ่านการ pre-washed ก่อนเลี้ยงกับเซลล์ ทำการวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) ที่กำลังขยาย 100X และ 250X

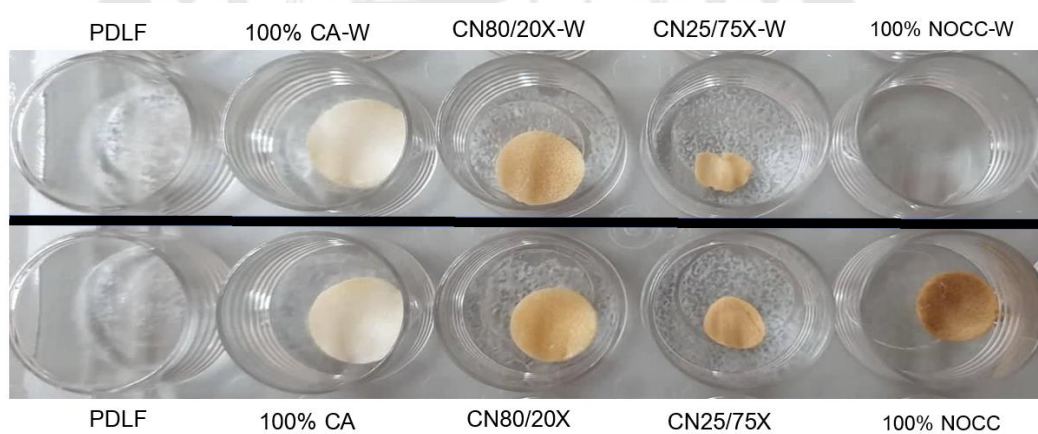


ภาพประกอบ 20 ลักษณะของเซลล์บนวัสดุหุ้มเลือด CA/NOCC ในสัดส่วนต่างๆ ที่ผ่านการ cross-link และเลี้ยงร่วมกับเซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นไนด์ปริทันต์เป็นระยะเวลา 7 วัน โดยภาพทางฝั่งด้านซ้ายเป็นของวัสดุที่เลี้ยงเซลล์แบบปกติ ส่วนภาพทางฝั่งด้านขวาเป็นของวัสดุที่ผ่านการ pre-washed ก่อนเลี้ยงกับเซลล์ ทำการวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) ที่กำลังขยาย 1000X และ 4000X

เมื่อทำการถ่ายภาพวัสดุหุ้มเลือด CA/NOCC สัดส่วนต่างๆ ที่ทำการทดสอบแบบปกติ และแบบ pre-washed ในวัสดุที่ทำการแช่วัสดุในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM++ มาเป็นระยะเวลา 1 วัน จะพบการบวมของวัสดุหุ้มเลือดจากการดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เข้าไปภายในโครงสร้าง โดยพบวัสดุที่มีการบวมจากมากไปน้อยดังนี้คือ วัสดุหุ้มเลือดกลุ่ม 100%NOCC-W, CN25/75X-W , CN80/20X-W และ 100%CA-W จากการสังเกตด้วยตาเปล่า (ภาพประกอบ 21) เมื่อทำการทดลอง และเลี้ยงเซลล์เป็นระยะเวลา 7 วัน จากนั้นจึงนำตัวอย่างทั้งหมดเข้าสู่กระบวนการเตรียมชิ้นงานด้วยสารละลายต่างๆ และทำให้แห้ง จนปรากฏเป็นชิ้นงานขนาดต่างๆ (ภาพประกอบ 22) ที่พร้อมจะนำไปวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดดังผลที่เห็นข้างต้น ทั้งนี้ กลุ่ม 100%NOCC-W ไม่สามารถเก็บตัวอย่างไว้ได้เนื่องจากวัสดุมีสลายตัวปะปนกับอาหารเลี้ยงเซลล์จนไม่สามารถแยกออกได้



ภาพประกอบ 21 ลักษณะวัสดุห้ามเลือด CA/NOCC สัดส่วนต่างๆ ที่ทดสอบแบบปกติ และแบบ pre-washed



ภาพประกอบ 22 ลักษณะวัสดุห้ามเลือด CA/NOCC สัดส่วนต่างๆ ที่ผ่านการเลี้ยงร่วมกับเซลล์ไฟโบร بلاสต์เอ็นดอทีเรียลเป็นระยะเวลา 7 วัน มีการเตรียมชิ้นงานด้วยสารละลายต่างๆ และทำให้แห้ง เพื่อทำการวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)

บทที่ 5

สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

อภิปรายผลการวิจัย

วัสดุห้ามเลือดเป็นสิ่งสำคัญอย่างหนึ่งที่จะรักษาชีวิตของผู้ป่วยได้ นอกจากความสามารถในการรักษาภาวะเลือดออกผิดปกติแล้ว วัสดุห้ามเลือดยังมีประโยชน์ต่อผู้ป่วยที่ได้รับบาดเจ็บจากการกลายเป็นลิ่มของเลือด เนื่องจากสามารถห้ามเลือดได้โดยไม่จำเป็นต้องเปลี่ยนวิธีรับประทานยา หรือหยุดยาชั่วคราวของยาในกลุ่มนี้ทำให้ลดโอกาสการเกิดภาวะหัวใจขาดเลือด และภาวะหัวใจล้มเหลวได้อีกด้วย (5) จากการนำวัสดุห้ามเลือดชนิดต่างๆ ที่ใช้บ่อยในทางทันตกรรมมาใช้งานทางคลินิกเริ่มมีการรายงานถึงข้อจำกัดบางอย่างของวัสดุ เช่น วัสดุห้ามเลือดจากเจลาตินเกิดการขยายขนาดของวัสดุภายหลังการดูดซึมเลือดบริเวณบาดแผล ส่งผลให้มีการกดทับของวัสดุห้ามเลือดบนเส้นประสาท (23, 24) วัสดุห้ามเลือดจากเซลลูโลสก่อให้เกิดปฏิกิริยาตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมของร่างกายต่อวัสดุเมื่อนำไปฝังในบริเวณบาดแผล และมีการรบกวนการหายของกระดูกที่หัก (50) Bone wax ทำให้เกิดการอักเสบ และการติดเชื้อของบาดแผลจากการฝังวัสดุชนิดนี้เข้าไปในเบ้ากระดูก เนื่องจากเป็นวัสดุที่ไม่สามารถย่อยสลายได้ (21) ส่วน Fibrin sealant นั้นพบว่าไม่เหมาะสมกับการห้ามเลือดในผู้ป่วยที่มีภาวะเลือดออกแบบรุนแรง อีกทั้งมีต้นทุนการผลิตสูง ทำให้เพิ่มค่าใช้จ่ายของผู้ป่วยโดยไม่จำเป็น (29) จากข้อจำกัดดังกล่าว ดังนั้นจึงยังมีการศึกษา และพัฒนาวัสดุห้ามเลือดชนิดใหม่ออกมาอย่างต่อเนื่อง โดยคำนึงถึงคุณสมบัติของวัสดุห้ามเลือดที่ดี คือ มีความเข้ากันได้ดีกับเนื้อเยื่อ สามารถสลายตัวได้ นำไปใช้งานได้สะดวก และมีราคาที่เหมาะสม (8)

จากการศึกษาของ Phaewphala et al. และ Mahatchariyapong et al. ที่ทดสอบความเข้ากันได้ของวัสดุห้ามเลือด CA/NOCC สัดส่วน 80:20 กับเซลล์เนื้อเยื่อในช่องปากของมนุษย์ โดยพบความเข้ากันได้ดีกับเซลล์สร้างกระดูก (13) แต่พบความผิดปกติของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เนื้อเยื่อเหงือก โดยเกิดการลดลงของอัตราการเพิ่มจำนวนของเซลล์ถึงร้อยละ 30 และมีการเปลี่ยนแปลงของลักษณะพื้นผิวของเซลล์ โดยมีการสร้างส่วนยื่นขนาดใหญ่ (large fibrils) และตุ่มพองใส (cellular blebbing) จำนวนมาก (14) ซึ่งในการศึกษานี้มีการตั้งสมมติฐานว่าผลในเชิงลบที่เกิดขึ้นกับเซลล์ไฟโบรบลาสต์เนื้อเยื่อเหงือกอาจมาจากแคลเซียมไอออนปริมาณสูงที่ปลดปล่อยจากวัสดุห้ามเลือด CA/NOCC ในงานวิจัยนี้เราจึงทดสอบวัสดุห้ามเลือด CA/NOCC ให้มีองค์ประกอบของ CA น้อยลงจาก CN80/20 เป็น CN25/75 และนำมาศึกษาผลกระทบต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นไอดีปริทันต์ และหาความสัมพันธ์กับปริมาณแคลเซียมไอออนใน

ทั้ง 2 กลุ่ม จะเห็นได้ว่าระดับของแคลเซียมไอออนที่วัดได้ในกลุ่ม CN25/75 มีปริมาณน้อยกว่าในกลุ่ม CN80/20 แต่อัตราการเพิ่มจำนวนของเซลล์ในกลุ่ม CN25/75 ไม่ได้เพิ่มขึ้น โดยมีแนวโน้มน้อยกว่า และไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม CN80/20 เมื่อทำการขจัดแคลเซียมไอออนโดยการแช่วัสดุห้ามเลือดในอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นระยะเวลา 1 คืน (pre-washed) แล้วดูดอาหารเลี้ยงออกก่อนการหว่านเซลล์ลงไป ปรากฏว่ากลุ่ม CN25/75-W มีอัตราการเพิ่มจำนวนของเซลล์น้อยกว่ากลุ่ม CN80/20 และ CN25/75 ทั้ง ๆ ที่กลุ่ม CN25/75-W นั้น มีสัดส่วนของ CA น้อยกว่า และมีการขจัดแคลเซียมไอออนที่ปลดปล่อยออกมาจากวัสดุ แสดงให้เห็นว่าการลดปริมาณแคลเซียมไอออนด้วยการปรับสัดส่วนองค์ประกอบของ CA/NOCC หรือการขจัดแคลเซียมไอออนด้วยการ pre-washed ไม่ได้ส่งผลให้เซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นยัตปริพันธ์มีอัตราการเพิ่มจำนวนของเซลล์เพิ่มขึ้น ซึ่งการที่มีระดับแคลเซียมไอออนที่สูงถึง $2.962.96 \pm 0.24$ mM ในกลุ่ม CN80/20 และลดลงมาเป็น 2.28 ± 0.02 mM ในกลุ่ม CN25/75 หรือการทำการขจัดแคลเซียมไอออนด้วยการ pre-washed กลับยิ่งทำให้การเพิ่มจำนวนของเซลล์ลดลงในการศึกษาครั้งนี้ ซึ่งให้ผลในทิศทางตรงข้ามกับการศึกษาของ Navarro-Requena et al. ที่ทดสอบเซลล์ไฟโบรบลาสต์ผิวหนังของหนูในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีระดับแคลเซียมไอออนภายนอกเซลล์ถึง 3.5 mM แล้วพบว่าเซลล์มีความสามารถในการเพิ่มจำนวนมากขึ้น (82) แต่ให้ผลในทิศทางเดียวกับการศึกษาวัสดุปิดแผลแคลเซียมอัลจิเนต (CA) ที่มีการปลดปล่อยแคลเซียมไอออนปริมาณมากลงสู่อาหารเลี้ยงเซลล์ และส่งผลในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของหนูชนิด L929 (16) และไฟโบรบลาสต์ของหนูชนิด 3T3 (88) นอกจากนี้มีการรายงานว่าวัสดุปิดแผล CA (Kaltostat) ส่งผลให้เซลล์เคราตินของมนุษย์ และเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของมนุษย์ชนิด MRC5 (Human embryonic lung fibroblast) มีลักษณะสัญญาณที่เปลี่ยนแปลง มีความหนาแน่นของเซลล์ลดลง และเซลล์ไม่ยึดเกาะกับจานเลี้ยงเซลล์ (17) เช่นเดียวกันกับการศึกษาของ Paddle-Ledinek et al. รายงานว่าสารสกัดจากวัสดุปิดแผล CA ได้แก่ Alginate M, Contreet-H และ SeaSorb ที่มีการปลดปล่อยแคลเซียมไอออนในปริมาณมาก ($3.06-4.89$ mM) ส่งผลให้การมีชีวิตและการเพิ่มจำนวนเซลล์เคราตินของมนุษย์ลดลง รวมถึงเกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะสัญญาณวิทยาไปจากเซลล์ปกติ (85) นอกจากนี้ Kulesz-Martin et al. พบว่าเซลล์เคราตินของหนูจะมีการเพิ่มจำนวนของเซลล์มากที่สุด เมื่อค่าความเข้มข้นของแคลเซียมไอออนภายนอกเซลล์มีระดับต่ำกว่า 0.1 mM ในขณะที่เซลล์ไฟโบรบลาสต์ผิวหนังมนุษย์มีการเพิ่มจำนวนของเซลล์มากที่สุด เมื่อค่าความเข้มข้นของแคลเซียมไอออนภายนอกเซลล์มีค่าประมาณ 1.4 mM (83) จึงอาจเป็นไปได้ว่าการตอบสนองในการทำหน้าที่เพิ่มจำนวนของเซลล์ต่อปริมาณแคลเซียมไอออนภายนอกเซลล์

ของเซลล์แต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน จากการศึกษาของเราที่ใช้เซลล์ไฟโบร بلاสท์เอ็นดรีพรี ทันต์ของมนุษย์ ซึ่งเป็นเซลล์ไฟโบร بلاสท์ชนิดหนึ่งเช่นกัน แต่กลับมีการตอบสนองต่อระดับ แคลเซียมที่สูงกว่าปกติไม่เหมือนกับการศึกษาที่ผ่านมาที่ใช้เซลล์ไฟโบร بلاสท์ของหนู (82) นี้ อาจจะเป็นการตอบสนองต่อระดับแคลเซียมที่แตกต่างกันเนื่องจากเป็นเซลล์ไฟโบร بلاสท์ที่มี ที่มาจากเนื้อเยื่อที่แตกต่างกัน และ ต่างสายพันธุ์กัน (มนุษย์ และ หนู) นอกจากนี้ในการศึกษาของ เราที่มีการกำจัดปริมาณแคลเซียมไอออนที่ปลดปล่อยออกมาในระดับสูงในวันแรก จนมีระดับ ไกล่เคียงกับกลุ่มควบคุมแล้ว แต่ยังไม่สามารถเพิ่มอัตราการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไฟโบร بلاสท์ เอ็นดรีพรีทันต์ได้ เพราะฉะนั้นจึงมีการตั้งข้อสงสัยว่าผลในเชิงลบของวัสดุ CA/NOCC ที่มีต่อเซลล์ อาจมีส่วนมาจากองค์ประกอบอื่นในวัสดุห้ามเลือด CA/NOCC นั่นก็คือ NOCC ที่สลายตัวออกมา

การที่กลุ่มผู้วิจัยจากศูนย์เทคโนโลยีโลหะ และวัสดุแห่งชาติ (National Metal and Materials Technology Center หรือ MTEC) ได้ผลิตวัสดุห้ามเลือด CA/NOCC ที่ทำการ cross-link ด้วย เครื่องอบแรงดันไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ทำให้เกิดการ สร้างพันธะระหว่างกลุ่มเอมีน (-NH₂) และกลุ่มคาบออกซิล (-COOH) ภายในโครงสร้างโพลิเมอร์ เกิดพันธะเป็นกลุ่มเอไมด์ (-CONH) ซึ่งกลุ่มเอไมด์เป็นพันธะที่แข็งแรงกว่าจึงส่งผลให้องค์ประกอบ NOCC ในวัสดุมีความแข็งแรง และมีความสามารถในการละลายน้ำลดลง (86) เมื่อทำการ เปรียบเทียบระหว่างวัสดุห้ามเลือด CA/NOCC ที่เตรียมแบบปกติ และที่ผ่านการ cross-link พบว่าอัตราการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไฟโบร بلاสท์เอ็นดรีพรีทันต์ในกลุ่ม CN80/20X และ CN25/75X มีอัตราการเพิ่มจำนวนที่มากกว่าเซลล์ในกลุ่ม CN80/20 และ CN25/75 โดยเฉลี่ย ประมาณร้อยละ 10-15 จากผลลัพธ์ดังกล่าว บ่งบอกได้ว่าเมื่อลดการสลายตัวขององค์ประกอบ NOCC โดยการ cross-link ของวัสดุอาจส่งผลดีต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์

ต่อมาจึงมีการผลิตวัสดุที่เป็นองค์ประกอบหลักของ CA/NOCC ได้แก่ 100%CA และ 100%NOCC มาทดสอบเพิ่มเติมร่วมกับวัสดุ CN80/20X และ CN25/75X โดยทำการทดสอบ แบบปกติ และแบบ pre-washed เพื่อประเมินการตอบสนองของเซลล์ต่อแต่ละองค์ประกอบของ วัสดุ CA/NOCC ได้ชัดเจนขึ้น ผลการทดลองพบว่าอัตราการเพิ่มจำนวนของเซลล์ในบรรดากลุ่ม ทดสอบ 100%CA และกลุ่ม CA/NOCC ในสัดส่วนต่างๆ ที่ทดสอบแบบปกติ และ pre-washed ไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ยกเว้น เซลล์ในกลุ่ม 100%NOCC ที่ผ่านการ pre-washed (100%NOCC-W) ที่พบอัตราการเพิ่มจำนวนของเซลล์น้อยกว่า 100%CA, 100%CA-W, CN80/20, CN80/20-W, CN25/75W และ 100%NOCC อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จึงอาจเป็นไปได้ว่าการแช่วัสดุ 100%NOCC ในอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นระยะเวลา 1 วัน (100%NOCC-W) ก่อน

การทดสอบนั้น ทำให้วัสดุเริ่มมีการสลายตัว และปลดปล่อยปัจจัยที่มีผลเสียต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ได้ ซึ่งการสลายตัวของวัสดุ 100%NOCC-W ภายหลังการเลี้ยงร่วมกับเซลล์เป็นระยะเวลา 7 วัน เกิดการย่อยสลายอย่างมากจนไม่สามารถเก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์ด้วย SEM ได้ ซึ่งเป็นไปตามการศึกษาของ Janvikul et al. ที่พบว่าวัสดุห้ามเลือด CA/NOCC มีอัตราการสลายตัวของวัสดุเร็วขึ้นเมื่อมีสัดส่วนของ NOCC มากขึ้น โดยการสลายตัวของ เริ่มการสลายตัวตั้งแต่วันแรกที่แช่อยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ ซึ่งพบว่าการสลายตัวทั้งหมดของวัสดุ 100%NOCC ภายใน 3 สัปดาห์ หรือ CA/NOCC ที่มีสัดส่วน 30:70 จะสลายตัวทั้งหมดภายใน 4 สัปดาห์ (7) ซึ่งกลุ่ม 100%NOCC-W ที่มีการสลายตัวขององค์ประกอบ NOCC ที่อธิบายไว้ข้างต้น ให้ผลที่คล้ายคลึงกับงานวิจัยของ ของ Lim et al. ที่พบการเพิ่มจำนวนของเซลล์โครตินบนผิวหนึ่งของมนุษย์ลดลงเมื่อทดสอบกับวัสดุ NOCC ที่วางไว้ในหลุมเลี้ยงเซลล์เป็นระยะเวลา 3 วัน (89) ในขณะที่มีงานวิจัยอื่นๆ กลับพบความเข้ากันได้ดีของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ NH3T3 (90) และไฟโบรบลาสต์ผิวหนึ่งของมนุษย์กับวัสดุที่มีองค์ประกอบของ NOCC (6) ส่วนในกลุ่มทดสอบ CN สัดส่วนต่างๆ ที่ไม่ค่อยมีความแตกต่างของอัตราการเพิ่มจำนวนของเซลล์ อาจะมาจากการที่วัสดุมีความแข็งแรงทั้งจากการ cross-link ในส่วนของ NOCC และการสร้าง semi-interpenetrating network ของ SA/NOCC โดยการ cross-link ด้วยแคลเซียมไฮดรอกไซด์ (7) ทำให้อาจจะยังไม่ทราบถึงกลไกการสลายตัวของวัสดุเหล่านี้อย่างชัดเจนที่ส่งผลในเชิงลบต่อเซลล์เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

เมื่อสังเกตการยึดเกาะและลักษณะของเซลล์บนวัสดุห้ามเลือดด้วยภาพ SEM ที่กำลังขยาย 1000X และ 4000X พบว่าเซลล์มีลักษณะเป็นรูปทรงกลม และแทบจะไม่พบการยื่นออกของไฟลอปอดียของเซลล์ไปยึดเกาะกับพื้นผิววัสดุในทุกกลุ่มทดสอบ การไม่ยึดเกาะของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นยัดปริทันต์ของมนุษย์อาจเกิดจากความเป็นประจุที่ไม่เหมาะสมกันระหว่างวัสดุ NOCC กับเซลล์ โดยที่วัสดุ NOCC มีประจุลบในโครงสร้างจำนวนมาก (65) และเซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นยัดปริทันต์มีพื้นผิวเซลล์ที่มีประจุเป็นลบจาก glycosaminoglycan ที่ปรากฏอยู่บนผิวเซลล์จำนวนมากเช่นเดียวกัน (91) ซึ่งปรากฏการณ์นี้มีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ Zhou et al. ที่พบว่าเซลล์ไฟโบรบลาสต์ 3T3 ไม่ยึดเกาะกับหลุมเพาะเลี้ยงเซลล์ที่เคลือบสารละลาย 0.1%NOCC ไว้เป็นระยะเวลา 16 ชั่วโมง (92) ทั้งนี้การยึดเกาะของเซลล์ที่ลดลงจะส่งผลให้เซลล์มีการแบ่งตัวน้อยลงเช่นเดียวกัน (93)

สรุปผลการวิจัย

จากการทดสอบวัสดุห้ามเลือด CA/NOCC สัดส่วนต่างๆ ที่ทดสอบแบบปกติ กับแบบขจัดแคลเซียมไฮดรอกไซด์ด้วยการ pre-washed พบว่าการลดสัดส่วนขององค์ประกอบแคลเซียมอัลจิเนตในวัสดุห้ามเลือด CA/NOCC หรือการขจัดแคลเซียมไฮดรอกไซด์ ไม่ได้ส่งผลให้เซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นโดทีเรียลมีการเพิ่มจำนวน หรือมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ที่ดีขึ้น ในขณะที่การสลายตัวของ 100%NOCC ที่ผ่านการ pre-washed นั้น ทำให้การเพิ่มจำนวนของเซลล์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และปรากฏลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ผิดปกติของเซลล์มากขึ้น นอกจากนี้ส่วนของ CA ที่อยู่ในวัสดุกลุ่มต่างๆ อาจมีส่วนร่วมในการการส่งผลเชิงลบต่อเซลล์ด้วยการพบอัตราการเพิ่มของเซลล์ลดลงร้อยละ 30 ในทุกกลุ่ม ดังนั้นอาจมีความจำเป็นในการค้นหาองค์ประกอบของวัสดุ CA/NOCC ที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ในการศึกษาในอนาคต

ข้อเสนอแนะ

1. จากการที่พบว่าส่วนของ NOCC อาจเป็นพิษต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นโดทีเรียลของมนุษย์ แนวทางในการศึกษาขั้นต่อไปอาจจะพยายามศึกษา และค้นหาปัจจัยของ NOCC ที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นโดทีเรียลของมนุษย์ โดยศึกษาองค์ประกอบในส่วนที่ทำการชะล้างออกมาใน 1 วัน และในส่วนที่คงเหลืออยู่ ซึ่งสัมผัสกับเซลล์
2. จากการที่วัสดุ CN80/20 มีความเข้ากันได้ดีกับเซลล์สร้างกระดูก และวัสดุ CN80/20X ที่มีแนวโน้มที่ให้ผลดีกับเซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นโดทีเรียลบ้าง จึงอาจพิจารณานำมาทำการศึกษาต่อยอด เพื่อประเมินการห้ามเลือด การย่อยสลายของวัสดุ และผลกระทบต่อการหายของแผลกระดูก เป้าพันในสัตว์ทดลองต่อไป

บรรณานุกรม

1. Zhong QK, Wu ZY, Qin YQ, Hu Z, Li SD, Yang ZM, et al. Preparation and Properties of Carboxymethyl Chitosan/Alginate/Tranexamic Acid Composite Films. *Membranes* (Basel). 2019;9(1).
2. Oryan A, Sahvieh S. Effectiveness of chitosan scaffold in skin, bone and cartilage healing. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2017;104:1003-11.
3. Khan MA, Mujahid M. A review on recent advances in chitosan based composite for hemostatic dressings. *Int J Biol Macromol*. 2019;124:138-47.
4. Hu Z, Zhang DY, Lu ST, Li PW, Li SD. Chitosan-Based Composite Materials for Prospective Hemostatic Applications. *Mar Drugs*. 2018;16(8).
5. Malmquist JP, Clemens SC, Oien HJ, Wilson SL. Hemostasis of oral surgery wounds with the HemCon Dental Dressing. *J Oral Maxillofac Surg*. 2008;66(6):1177-83.
6. 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.
7. Janvikul W, Uppanan P, Thavornyutikarn B. Calcium alginate, N,O-Carboxymethylchitosan and their blends: In vitro biocompatibility and biodegradability. *WACBE World Congress on Bioengineering*; Bangkok, Thailand ;2007.
8. Huang H, Chen H, Wang X, Qiu F, Liu H, Lu J, et al. Degradable and Bioadhesive Alginate-Based Composites: An Effective Hemostatic Agent. *ACS Biomaterials Science & Engineering*. 2019;5(10):5498-505.
9. Janvikul W, Uppanan P, Kosorn W, editors. Evaluation of Efficacy of Chitosan Derivative Based Hemostat: In Vitro and In Vivo Studies. *Proceedings of 2nd International Symposium on Biomedical Engineering*; 2006; Bangkok, Thailand.
10. Janvikul W, Thavornyutikarn B, Kosorn W, Surattanawanich P. Clinical study of chitosan-derivative-based hemostat in the treatment of split-thickness donor sites. *Maejo international journal of science and technology*. 2013;7:385-95.
11. Wongparami U, Janvikul W, Thavornyutikarn B, Kosorn W, Tanjak P. Preliminary

- Clinical Trial Results on Human Irritation and Delayed-type Hypersensitivity Evaluation of Chitosan Derivative - based Hemostats. REGION 4 MEDICAL JOURNAL. 2011;13:61-9.
12. Surattanawanich P, Janvikul W, Thavornnyutikarn B, Kosorn W. Preliminary Clinical Study on Resorbability of Chitosan Derivative-based Hemostat in Surgical treatment of Penile Paraffinoma. Journal of Medical and Public Health Region 2. 2011;1(1):2-8.
 13. 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) : 277-288]. 2020.
 14. Mahatchariyapong T, Phaewphala K, Kosorn W, Kittrueangphatchara K, Sricholpech M. Cytotoxicity of the Calcium Alginate/N,O-carboxymethylchitosan Hemostatic Sponge on Primary Human Gingival Fibroblasts. CM Dent J. 2022; 43(1):19-28.
 15. Orrenius S, McCabe MJ, Jr., Nicotera P. Ca(2+)-dependent mechanisms of cytotoxicity and programmed cell death. Toxicol Lett. 1992;64-65 Spec No:357-64.
 16. 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.
 17. Rosdy M, Clauss LC. Cytotoxicity testing of wound dressings using normal human keratinocytes in culture. J Biomed Mater Res. 1990;24(3):363-77.
 18. Ogle OE, Swantek J, Kamoh A. Hemostatic agents. Dent Clin North Am. 2011;55(3):433-9, vii.
 19. Schreiber MA, Neveleff DJ. Achieving hemostasis with topical hemostats: making clinically and economically appropriate decisions in the surgical and trauma settings. Aorn j. 2011;94(5):S1-20.
 20. Spangler D, Rothenburger S, Nguyen K, Jampani H, Weiss S, Bhende S. In vitro antimicrobial activity of oxidized regenerated cellulose against antibiotic-resistant microorganisms. Surg Infect (Larchmt). 2003;4(3):255-62.
 21. Kumar MP. Local hemostatic agents in the management of bleeding in oral surgery. Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research. 2016;9.

22. Szpalski M, Gunzburg R, Sztern B. An overview of blood-sparing techniques used in spine surgery during the perioperative period. *Eur Spine J.* 2004;13 Suppl 1(Suppl 1):S18-S27.
23. Epstein NE, Silvergleid RS, Hollingsworth R. Increased postoperative cervical myelopathy and cord compression resulting from the use of Gelfoam. *Spine J.* 2009;9(2):e19-21.
24. Friedman J, Whitecloud TS, 3rd. Lumbar cauda equina syndrome associated with the use of gelfoam: case report. *Spine (Phila Pa 1976).* 2001;26(20):E485-7.
25. Trojanowski JQ, Harrist TJ, Athanasoulis CA, Greenfield AJ. Hepatic and splenic infarctions: complications of therapeutic transcatheter embolization. *Am J Surg.* 1980;139(2):272-7.
26. Gibbs L, Kakis A, Weinstein P, Conte JE, Jr. Bone wax as a risk factor for surgical-site infection following neurospinal surgery. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2004;25(4):346-8.
27. Spotnitz WD, Burks S. Hemostats, sealants, and adhesives III: a new update as well as cost and regulatory considerations for components of the surgical toolbox. *Transfusion.* 2012;52(10):2243-55.
28. 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.
29. Eldibany RM. Platelet rich fibrin versus Hemcon dental dressing following dental extraction in patients under anticoagulant therapy. *Tanta Dental Journal.* 2014;11(2):75-84.
30. Preethi Soundarya S, Haritha Menon A, Viji Chandran S, Selvamurugan N. Bone tissue engineering: Scaffold preparation using chitosan and other biomaterials with different design and fabrication techniques. *Int J Biol Macromol.* 2018;119:1228-39.
31. Kim MS, Kim JH, Min BH, Chun HJ, Han DK, Lee HB. Polymeric Scaffolds for Regenerative Medicine. *Polymer Reviews.* 2011;51(1):23-52.
32. Rong JJ, Liang M, Xuan FQ, Sun JY, Zhao LJ, Zheng HZ, et al. Thrombin-loaded alginate-calcium microspheres: A novel hemostatic embolic material for transcatheter

arterial embolization. *Int J Biol Macromol*. 2017;104(Pt A):1302-12.

33. Lee KY, Mooney DJ. Alginate: properties and biomedical applications. *Prog Polym Sci*. 2012;37(1):106-26.

34. Taskin AK, Yasar M, Ozaydin I, Kaya B, Bat O, Ankarali S, et al. The hemostatic effect of calcium alginate in experimental splenic injury model. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg*. 2013;19(3):195-9.

35. Inmaculada A, Ruth H, Angeles H. Chitosan Amphiphilic Derivatives. *Chemistry and Applications. Current Organic Chemistry*. 2010;14(3):308-30.

36. Dash M, Chiellini F, Ottenbrite RM, Chiellini E. Chitosan—A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. *Prog Polym Sci*. 2011;36(8):981-1014.

37. Deepthi S, Venkatesan J, Kim SK, Bumgardner JD, Jayakumar R. An overview of chitin or chitosan/nano ceramic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Int J Biol Macromol*. 2016;93(Pt B):1338-53.

38. Croisier F, Jérôme C. Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. *European Polymer Journal*. 2013;49(4):780-92.

39. Aguilar A, Zein N, Harmouch E, Hafdi B, Bornert F, Offner D, et al. Application of Chitosan in Bone and Dental Engineering. *Molecules*. 2019;24(16):3009.

40. Yi H, Wu LQ, Bentley WE, Ghodssi R, Rubloff GW, Culver JN, et al. Biofabrication with chitosan. *Biomacromolecules*. 2005;6(6):2881-94.

41. Pavinatto FJ, Caseli L, Oliveira ON. Chitosan in Nanostructured Thin Films. *Biomacromolecules*. 2010;11(8):1897-908.

42. Takahashi T, Takayama K, Machida Y, Nagai T. Characteristics of polyion complexes of chitosan with sodium alginate and sodium polyacrylate. *International Journal of Pharmaceutics*. 1990;61(1):35-41.

43. Kean T, Thanou M. Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan. *Adv Drug Deliv Rev*. 2010;62(1):3-11.

44. Baldrick P. The safety of chitosan as a pharmaceutical excipient. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2010;56(3):290-9.

45. Joelle H, Rucktooa P, Clantin B, Azarkan M, Looze Y, Villeret V, et al. X-ray

Structure of Papaya Chitinase Reveals the Substrate Binding Mode of Glycosyl Hydrolase Family 19 Chitinases † ‡. *Biochemistry*. 2008;47:8283-91.

46. Yang YM, Hu W, Wang XD, Gu XS. The controlling biodegradation of chitosan fibers by N-acetylation in vitro and in vivo. *J Mater Sci Mater Med*. 2007;18(11):2117-21.
47. Xu J, McCarthy SP, Gross RA, Kaplan DL. Chitosan Film Acylation and Effects on Biodegradability. *Macromolecules*. 1996;29(10):3436-40.
48. Chatelet C, Damour O, Domard A. Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films. *Biomaterials*. 2001;22(3):261-8.
49. Kale TP, Singh AK, Kotrashetti SM, Kapoor A. Effectiveness of Hemcon Dental Dressing versus Conventional Method of Haemostasis in 40 Patients on Oral Antiplatelet Drugs. *Sultan Qaboos Univ Med J*. 2012;12(3):330-5.
50. 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.
51. Chou TC, Fu E, Wu CJ, Yeh JH. Chitosan enhances platelet adhesion and aggregation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;302(3):480-3.
52. Little JW, Miller CS, Henry RG, McIntosh BA. Antithrombotic agents: implications in dentistry. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2002;93(5):544-51.
53. Sacco R, Sacco M, Carpenedo M, Mannucci PM. Oral surgery in patients on oral anticoagulant therapy: a randomized comparison of different intensity targets. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2007;104(1):e18-21.
54. Edwards JV, Howley P, Prevost N, Condon B, Arnold J, Diegelmann R. Positively and negatively charged ionic modifications to cellulose assessed as cotton-based protease-lowering and hemostatic wound agents. *Cellulose*. 2009;16:911–21.
55. Zhou X, Zhang X, Zhou J, Li L. An investigation of chitosan and its derivatives on red blood cell agglutination. *RSC Advances*. 2017;7(20):12247-54.
56. Hattori H, Ishihara M. Changes in blood aggregation with differences in molecular weight and degree of deacetylation of chitosan. *Biomed Mater*. 2015;10(1):015014.
57. Klokkevold PR, Fukayama H, Sung EC, Bertolami CN. The effect of chitosan (poly-

N-acetyl glucosamine) on lingual hemostasis in heparinized rabbits. *J Oral Maxillofac Surg.* 1999;57(1):49-52.

58. Hattori H, Amano Y, Nogami Y, Takase B, Ishihara M. Hemostasis for severe hemorrhage with photocrosslinkable chitosan hydrogel and calcium alginate. *Ann Biomed Eng.* 2010;38(12):3724-32.

59. Sagnella S, Kwok J, Marchant RE, Kottke-Marchant K. Shear-induced platelet activation and adhesion on human pulmonary artery endothelial cells seeded onto hydrophilic polymers. *J Biomed Mater Res.* 2001;57(3):419-31.

60. Sperling C, Fischer M, Maitz MF, Werner C. Blood coagulation on biomaterials requires the combination of distinct activation processes. *Biomaterials.* 2009;30(27):4447-56.

61. He Q, Gong K, Ao Q, Ma T, Yan Y, Gong Y, et al. Positive charge of chitosan retards blood coagulation on chitosan films. *J Biomater Appl.* 2013;27(8):1032-45.

62. A P, G L, F R, M S, D P, G S, et al. Evaluation of chitosan effects on the hemostatic process. *Clin Lab.* 1986;10:151-4.

63. Fischer TH, Connolly R, Thatte HS, Schwaartzberg SS. Comparison of structural and hemostatic properties of the poly-N-acetyl glucosamine Syvek Patch with products containing chitosan. *Microsc Res Tech.* 2004;63(3):168-74.

64. Dowling MB, Kumar R, Keibler MA, Hess JR, Bochicchio GV, Raghavan SR. A self-assembling hydrophobically modified chitosan capable of reversible hemostatic action. *Biomaterials.* 2011;32(13):3351-7.

65. Wang W, Meng Q, Li Q, Liu J, Zhou M, Jin Z, et al. Chitosan Derivatives and Their Application in Biomedicine. *Int J Mol Sci.* 2020;21(2).

66. Glader B. In *Wintrobe's Clinical Hematology*. 9th ed. Lee, R. G, Bithel, C. T, Foester, J., et al., editors. Philadelphia: Lea & Febiger; 1993.

67. Janvikul W, Uppanan P, Thavornnyutikarn 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.

68. Jones MI, McColl IR, Grant DM, Parker KG, Parker TL. Protein adsorption and

platelet attachment and activation, on TiN, TiC, and DLC coatings on titanium for cardiovascular applications. *J Biomed Mater Res*. 2000;52(2):413-21.

69. Janvikul W, Uppanan P, Thavornnyutikarn B, Krewraing J, Prateepasen R. In vitro comparative hemostatic studies of chitin, chitosan, and their derivatives. *Journal of Applied Polymer Science*. 2006;102(1):445-51.

70. Nanci A, Bosshardt DD. Structure of periodontal tissues in health and disease. *Periodontol 2000*. 2006;40:11-28.

71. Pei X, Wang L, Chen C, Yuan X, Wan Q, Helms JA. Contribution of the PDL to Osteotomy Repair and Implant Osseointegration. *J Dent Res*. 2017;96(8):909-16.

72. Butler WT, Birkedal-Hansen H, Beegle WF, Taylor RE, Chung E. Proteins of the periodontium. Identification of collagens with the $[\alpha 1(I)]_2\alpha 2$ and $[\alpha 1(III)]_3$ structures in bovine periodontal ligament. *J Biol Chem*. 1975;250(23):8907-12.

73. Yamauchi M, Katz EP, Mechanic GL. Intermolecular cross-linking and stereospecific molecular packing in type I collagen fibrils of the periodontal ligament. *Biochemistry*. 1986;25(17):4907-13.

74. Bumann A, Carvalho RS, Schwarzer CL, Yen EH. Collagen synthesis from human PDL cells following orthodontic tooth movement. *Eur J Orthod*. 1997;19(1):29-37.

75. Karimbux NY, Rosenblum ND, Nishimura I. Site-specific expression of collagen I and XII mRNAs in the rat periodontal ligament at two developmental stages. *J Dent Res*. 1992;71(7):1355-62.

76. Myllyharju J, Kivirikko KI. Collagens, modifying enzymes and their mutations in humans, flies and worms. *Trends Genet*. 2004;20(1):33-43.

77. Sodek J. A comparison of the rates of synthesis and turnover of collagen and non-collagen proteins in adult rat periodontal tissues and skin using a microassay. *Arch Oral Biol*. 1977;22(12):655-65.

78. Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Duellman S. *Cell Viability Assays*. 2013 May 1 [Updated 2016 Jul 1] ed. Sittampalam GS GA, Brimacombe K, et al, editor. Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences 2004.

79. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application

- to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983;65(1-2):55-63.
80. Berridge MV, Tan AS. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch Biochem Biophys*. 1993;303(2):474-82.
 81. Ahmed SA, Gogal RM, Jr., Walsh JE. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [3H]thymidine incorporation assay. *J Immunol Methods*. 1994;170(2):211-24.
 82. Navarro-Requena C, Pérez-Amodio S, Castaño O, Engel E. Wound healing-promoting effects stimulated by extracellular calcium and calcium-releasing nanoparticles on dermal fibroblasts. *Nanotechnology*. 2018;29(39):395102.
 83. Kulesz-Martin MF, Fabian D, Bertram JS. Differential calcium requirements for growth of mouse skin epithelial and fibroblast cells. *Cell Tissue Kinet*. 1984;17(5):525-33.
 84. Magee AI, Lytton NA, Watt FM. Calcium-induced changes in cytoskeleton and motility of cultured human keratinocytes. *Exp Cell Res*. 1987;172(1):43-53.
 85. Paddle-Ledinek JE, Nasa Z, Cleland HJ. Effect of different wound dressings on cell viability and proliferation. *Plast Reconstr Surg*. 2006;117(7 Suppl):110S-8S; discussion 9S-20S.
 86. Janvikul W, Thavornnyutikarn B. New Route to the Preparation of Carboxymethylchitosan Hydrogels. *Journal of Applied Polymer Science - J APPL POLYM SCI*. 2003;90:4016-20.
 87. Sawa Y, Phillips A, Hollard J, Yoshida S, Braithwaite MW. The in vitro life-span of human periodontal ligament fibroblasts. *Tissue Cell*. 2000;32(2):163-70.
 88. 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.
 89. Lim CK, Halim AS, Lau HY, Ujang Z, Hazri A. In vitro cytotoxicology model of oligo-chitosan and n, o-carboxymethyl chitosan using primary normal human epidermal keratinocyte cultures. *J Appl Biomater Biomech*. 2007;5(2):82-7.

90. 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.
91. Yamamoto K, Yamamoto M, Ooka H. Changes in negative surface charge of human diploid fibroblasts, TIG-1, during in vitro aging. *Mech Ageing Dev*. 1988;42(2):183-95.
92. Zhou J, Elson C, Lee TD. Reduction in postoperative adhesion formation and re-formation after an abdominal operation with the use of N, O - carboxymethyl chitosan. *Surgery*. 2004;135(3):307-12.
93. Janvikul W, Uppanan P, Thavorniyutikarn B, Prateepasen R, Swasdison S. Fibroblast interaction with carboxymethylchitosan-based hydrogels. *J Mater Sci Mater Med*. 2007;18(5):943-9.





MF-04-version-2.0
วันที่ 18 ต.ค. 61



**หนังสือยืนยันการยกเว้นการรับรอง
คณะกรรมการจริยธรรมสำหรับพิจารณาโครงการวิจัยที่ทำในมนุษย์
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ**

(เอกสารนี้เพื่อแสดงว่าคณะกรรมการจริยธรรมสำหรับพิจารณาโครงการวิจัยที่ทำในมนุษย์ ได้พิจารณาโครงการวิจัยนี้)

ชื่อโครงการวิจัย	: ผลของวัสดุห้ามเลือดจากอนุพันธ์โคโคซานที่มีความหลากหลายของสัดส่วนการผสมต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นดีบริพันธ์ของมนุษย์
ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัย	: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พันตแพทย์หญิงมานิสา ศรีชลเพชร
หน่วยงานต้นสังกัด	: คณะทันตแพทยศาสตร์
รหัสโครงการวิจัย	: SWUEC-022/2563X

โครงการวิจัยนี้เป็นโครงการวิจัยที่เข้าข่ายยกเว้น (Research with Exemption from SWUEC)

วันที่ยืนยัน	: 20 มกราคม 2563
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)

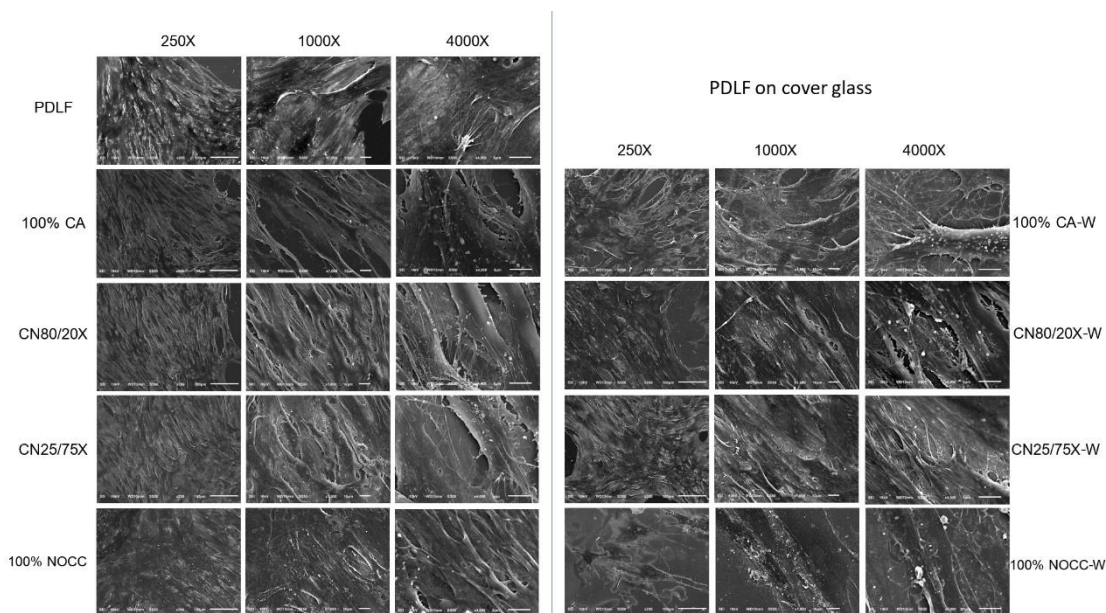
ออกให้ ณ วันที่ 13 มีนาคม 2563

(ลงชื่อ).....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พันตแพทย์หญิงณปภา เอี่ยมจิตรกุล)
กรรมการและเลขานุการคณะกรรมการจริยธรรม
สำหรับพิจารณาโครงการวิจัยที่ทำในมนุษย์

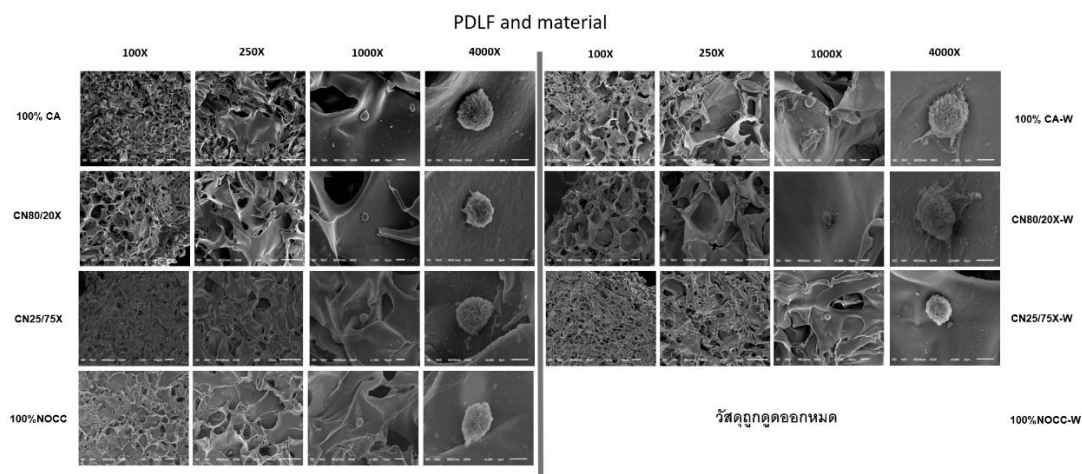
(ลงชื่อ).....
(แพทย์หญิงสุวิพร ภัทรสุวรรณ)
ประธานคณะกรรมการจริยธรรม
สำหรับพิจารณาโครงการวิจัยที่ทำในมนุษย์

หมายเลขรับรอง : SWUEC/X-022/2563

ภาพประกอบ 23 ภาพหนังสือยืนยันการยกเว้นการรับรองคณะกรรมการจริยธรรมสำหรับพิจารณาโครงการวิจัยที่ทำในมนุษย์มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒของโครงการวิจัยนี้ (หมายเลขรับรอง : SWUEC/X-022/2563)



ภาพประกอบ 24 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นดอทีเลียลที่เลี้ยงมาเป็นระยะเวลา 7 วัน บนแผ่นกระจกใส โดยมีกลุ่ม PDLF และกลุ่มที่ทดสอบกับวัสดุห้ามเลือด CA/NOCC สัดส่วนต่างๆ โดยทดสอบแบบปกติ และแบบ pre-washed ที่กำลังขยาย 250X 1000X และ 4000X ตามลำดับ



ภาพประกอบ 25 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เอ็นดอทีเลียล และลักษณะของวัสดุห้ามเลือด CA/NOCC สัดส่วนต่างๆ โดยทดสอบแบบปกติ และแบบ pre-washed ที่กำลังขยาย 100X 250X 1000X และ 4000X ตามลำดับ

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	วรพล แซ่เฮ้ง
วัน เดือน ปี เกิด	04 สิงหาคม 2535
สถานที่เกิด	กรุงเทพมหานคร
วุฒิการศึกษา	พ.ศ. 2559 ทันตแพทยศาสตรบัณฑิต จาก มหาวิทยาลัยมหิดล
ที่อยู่ปัจจุบัน	1744/199 ถนนเพชรบุรีตัดใหม่ แขวงบางกะปิ เขตห้วยขวาง กรุงเทพมหานคร 10310

