



ผลของวัสดุห้ามเลือดจากอนุพันธ์ไคโตซานต่อความมีชีวิตและการทำหน้าที่ของเซลล์สร้างกระดูก
ของมนุษย์

THE EFFECT OF A CHITOSAN-DERIVED HEMOSTATIC AGENT ON THE VIABILITY
AND FUNCTIONS OF HUMAN OSTEOBLAST

กัลดิมาศ แผลวผลา

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

2562

ผลของวัสดุห้ามเลือดจากอนุพันธ์โคโคซานต่อความมีชีวิตและการทำหน้าที่ของเซลล์
สร้างกระดูกของมนุษย์



ปริญญานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาการช่องปากและแม็กซิลโลเฟเชียล
คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ปีการศึกษา 2562
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

THE EFFECT OF A CHITOSAN-DERIVED HEMOSTATIC AGENT ON THE
VIABILITY AND FUNCTIONS OF HUMAN OSTEOBLAST



KALTIMAS PHAEWPHALA

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

Faculty of Dentistry Srinakharinwirot University

2019

Copyright of Srinakharinwirot University

ปริญญานิพนธ์

เรื่อง

ผลของวัสดุห้ามเลือดจากอนุพันธ์โคโคซานต่อความมีชีวิตและการทำหน้าที่ของเซลล์สร้างกระดูกของมนุษย์

ของ

กัลดิมาศ แผลวผลา

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาการช่องปากและแม็กซ์ซิลโลเฟเชียล
ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ฉัตรชัย เอกปัญญาสกุล)

คณะกรรมการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์

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

..... ประธาน
(รองศาสตราจารย์ ดร.สมหญิง พัฒน์ธีรพงศ์)

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

ชื่อเรื่อง	ผลของวัสดุห้ามเลือดจากอนุพันธ์โคโตซานต่อความมีชีวิตและการทำหน้าที่ของเซลล์สร้างกระดูกของมนุษย์
ผู้วิจัย	กัลติมาศ แผลพลา
ปริญญา	วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต
ปีการศึกษา	2562
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. มานีสา ศรีชลเพชร

ปัจจุบันมีวัสดุห้ามเลือดมากมายที่ได้รับการพัฒนาขึ้นมาเพื่อช่วยห้ามเลือดในงานศัลยศาสตร์ช่องปาก แต่ก็ยังไม่มีวัสดุห้ามเลือดตัวใดที่มีคุณสมบัติครบถ้วนตามอุดมคติ จึงทำให้ยังคงมีการพัฒนาวัสดุห้ามเลือดตัวใหม่ๆ ขึ้นมาเรื่อยๆ และวัสดุห้ามเลือดจากโคโตซานและอนุพันธ์ของโคโตซานก็เป็นวัสดุห้ามเลือดตัวหนึ่งที่ได้การยอมรับและกำลังเป็นที่นิยม เนื่องจากคุณสมบัติอันโดดเด่นของตัววัสดุเอง ได้แก่ ความเข้ากันได้ดีทางชีวภาพ การย่อยสลายได้เองตามธรรมชาติ มีคุณสมบัติช่วยห้ามเลือด และส่งเสริมการหายของแผล และจากการนำ *N,O*-carboxymethylchitosan มาผสมกับ Sodium alginate โดยให้สารทำปฏิกิริยาเชื่อมประสานร่างแหกันผ่านสารละลาย Calcium chloride ก่อให้เกิดเป็นวัสดุห้ามเลือดตัวใหม่ขึ้น คือ Calcium alginate/*N,O*-carboxymethylchitosan (CA/NOCC) โดยวัสดุนี้เคยผ่านการทดสอบแล้วว่ามีความเข้ากันได้ดีทางชีวภาพ สามารถย่อยสลายได้เองตามธรรมชาติ ไม่เป็นพิษต่อเนื้อเยื่อผิวหนัง มีคุณสมบัติในการห้ามเลือด และมีราคาถูก แต่อย่างไรก็ตามยังไม่เคยมีการนำวัสดุนี้มาทดสอบกับเซลล์ภายในช่องปากของมนุษย์มาก่อน และเพื่อที่จะพัฒนาวัสดุ CA/NOCC มาใช้เป็นวัสดุห้ามเลือดในทางทันตกรรมต่อไปในอนาคต การนำวัสดุ CA/NOCC มาทดสอบหาความเป็นพิษกับเซลล์ภายในช่องปากจึงเป็นสิ่งที่จำเป็น ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้จัดทำขึ้น โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบความเป็นพิษของวัสดุห้ามเลือด CA/NOCC ต่อเซลล์สร้างกระดูกที่เกี่ยวข้องได้จากกระดูกขากรรไกรของมนุษย์ โดยทำการประเมินความสามารถในการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์ผ่านการทดสอบเอ็มทีที และประเมินการตอบสนองของเซลล์จากการแสดงออกของลักษณะทางสัญญาณวิทยาผ่านกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ทั้งยังประเมินความสามารถในการทำหน้าที่ของเซลล์ผ่านทาง การแสดงออกของระดับปฏิกิริยาอัลคาไลน์ ฟอสฟาเตส และการสะสมแร่ธาตุในชั้นเมทริกซ์ภายนอกเซลล์ ซึ่งจะทำให้การทดสอบเปรียบเทียบกันระหว่างเซลล์สร้างกระดูกในกลุ่มทดสอบ (OBs+CA/NOCC) และกลุ่มควบคุม (OBs) ในทุกการทดลองของงานวิจัยครั้งนี้ และจากผลการศึกษาพบว่าเซลล์สร้างกระดูกในกลุ่มทดสอบและกลุ่มควบคุมไม่มีความแตกต่างกันทั้งในด้านความสามารถในการแบ่งตัวเพิ่มจำนวน การแสดงออกของระดับปฏิกิริยาอัลคาไลน์ ฟอสฟาเตส และการสะสมแร่ธาตุในชั้นเมทริกซ์ภายนอกเซลล์ เช่นเดียวกับการตอบสนองทางด้านลักษณะทางสัญญาณวิทยาของเซลล์ที่พบว่าเซลล์ที่เกาะอยู่บนแผ่นกระจกใสใสรอบๆ วัสดุทดสอบ CA/NOCC มีลักษณะแบน รูปร่างคล้ายกระสวยและผิวเรียบ ซึ่งเหมือนกับการแสดงออกของเซลล์ในกลุ่มควบคุม ในขณะที่เซลล์ที่เกาะอยู่บนพื้นผิวที่มีรูพรุนของวัสดุทดสอบมีลักษณะรูปร่างค่อนข้างกลมและมีการยืดยาวของรยางค์เล็กๆ ออกไปแตะบนพื้นผิวของวัสดุ ซึ่งพบได้จำนวนค่อนข้างน้อย ดังนั้นจากผลการศึกษาของเราจึงสรุปได้ว่าวัสดุทดสอบ CA/NOCC ไม่เป็นพิษต่อเซลล์สร้างกระดูกในช่องปากของมนุษย์ และหากต่อมาในภายภาคหน้าวัสดุทดสอบ CA/NOCC นี้ได้ผ่านการพิสูจน์ทั้งทางระดับหลอดทดลองและทางคลินิกแล้วว่ามีคุณสมบัติที่เหมาะสมในทุกด้านๆ วัสดุนี้จึงอาจเหมาะสมที่จะถูกนำมาพัฒนาใช้ในงานศัลยศาสตร์ช่องปากต่อไปในอนาคต

Title	THE EFFECT OF A CHITOSAN-DERIVED HEMOSTATIC AGENT ON THE VIABILITY AND FUNCTIONS OF HUMAN OSTEOBLAST
Author	KALTIMAS PHAEWPHALA
Degree	MASTER OF SCIENCE
Academic Year	2019
Thesis Advisor	Assistant Professor Marnisa Sricholpech , Ph.D.

To date, numerous hemostatic agents have been developed for bleeding control in oral surgery but none of them have overall ideal hemostatic properties. Therefore, the research and development of novel hemostatic agents are still ongoing. Chitosan and its derivatives have increasingly been accepted as suitable hemostatic materials based on their biocompatibility, biodegradability, hemostatic properties, and the promotion of wound healing. Moreover, they have been widely applied in the biomedical, pharmaceutical and food industries. By combining N,O-carboxymethylchitosan with sodium alginate and crosslinked with calcium chloride, the Calcium Alginate/N,O-carboxymethylchitosan (CA/NOCC) hemostatic sponge was developed. It is cytocompatible, biodegradable, non-toxic to tissues, cost efficient and demonstrated good hemostatic properties. However, to develop this CA/NOCC material for possible use in dentistry, cytotoxicity tests in cells of targeted oral tissues would be required. Therefore, this study aims to investigate the cytotoxicity of the CA/NOCC hemostatic sponge in human primary osteoblasts (OBs) isolated from alveolar bone. Human OBs, cultured in direct contact with or in the culture-media extract of CA/NOCC were assigned to the experimental groups (CA/NOCC+OBs), and compared with the control groups (OBs) in all of the experiments. The proliferative abilities of OBs were assessed by using MTT assays, while their morphologies were evaluated with scanning electron microscopy. The functions of OBs were assessed by alkaline phosphatase activity (ALP activity) and matrix mineralization assays (Alizarin red staining and quantification). The results showed that there were no statistically significant differences in terms of cell proliferation rates, ALP activity and Alizarin red stain quantification between the CA/NOCC+OBs and the OBs control groups. As for cell morphology, the OBs attached to the cover glasses surrounding the CA/NOCC sponge exhibited flat and fusiform cell morphologies with smooth surfaces which are relatively comparable to the OBs control. In addition, there were a few numbers of cells adhering to the porous surface of CA/NOCC. Those cells were mainly spheroid-shaped cells covered with small fibrils. In summary, the results of this study suggest that the CA/NOCC hemostatic sponge was non-cytotoxic to human primary osteoblasts. Future in vivo and clinical studies are warranted to determine its overall properties in being a suitable hemostatic agent for intrabony applications in the oral cavity.

Keyword : Primary human osteoblasts, Carboxymethylchitosan, Calcium alginate, Cell proliferation, Morphology, Alkaline phosphatase activity, Matrix mineralization



กิตติกรรมประกาศ

ปริญญาบัตรนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความเมตตากรุณาช่วยเหลือ และความเอาใจใส่อย่างดียิ่งตลอดจนการให้คำแนะนำ และข้อคิดเห็นที่เป็นประโยชน์สำหรับการปรับแก้ไขข้อบกพร่องจากท่านอาจารย์ที่ปรึกษาและคณะกรรมการผู้ควบคุมปริญญาบัตรทุกท่าน ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ทพญ.ดร.มานิสา ศรีชลเพชร และ อาจารย์ ทพ.กิตติวัตร กิตติเรืองพัชร ที่ได้ให้ความเมตตากรุณาเป็นที่ปรึกษาและให้ความช่วยเหลือชี้แนะแนวทางที่เป็นประโยชน์ต่อการศึกษาและการทำปริญญานี้ด้วยความเอาใจใส่อย่างดียิ่งตลอดมา รวมทั้ง

รองศาสตราจารย์ ทพญ.ดร.สมหญิง พัฒน์ธีรพงศ์, ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นพ.ทพ.ชาญชาย วงศ์ชั้น-สุนทร, ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ทพญ.อรุณวรรณ หล้าอุบล, ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ทพญ.ศิริลักษณ์ ติรณชนากุล และรองศาสตราจารย์ ทพญ.ดร.นิรดา ธเนศวร ที่กรุณาให้ข้อเสนอแนะต่างๆ เพิ่มเติมแก่ผู้วิจัย ทำให้ปริญญาบัตรฉบับนี้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอกราบขอบพระคุณคณะผู้วิจัยนำโดย ดร.วนิดา จันทร์วิฑูล จากศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ (เอ็มเทค) ที่ได้กรุณาให้ความอนุเคราะห์ในการให้ข้อมูลความรู้ ตลอดจนการสนับสนุนผลดีวัสดุห้ามเลือดจากอนุพันธ์โคโคซานที่ใช้ทดสอบกับเซลล์ในการศึกษาครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์และกรรมการบริหารหลักสูตรสาขาวิทยาการช่องปากและแม็กซิลโลเฟเชียล คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒทุกท่าน ที่ได้กรุณาประสิทธิ์ประสาทความรู้ต่างๆ ให้แก่ผู้วิจัย ตลอดจนให้ความช่วยเหลือในการทำวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณภาควิชาโสตจักษุวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่กรุณาอนุเคราะห์สถานที่และอุปกรณ์หลักในการทำวิจัยในส่วนของเครื่องเลี้ยวเซลล์ และการใช้ห้องปฏิบัติการ รวมถึงเจ้าหน้าที่ประจำห้องปฏิบัติการชั้น 10 ที่ช่วยคอยช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกตลอดการทำงานวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณทุนอุดหนุนการวิจัยจากโรงพยาบาลทันตกรรม คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒที่ทำให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณพี่ๆ และเพื่อนๆ สาขาวิทยาการช่องปากและแม็กซิลโลเฟเชียล รวมถึงบุคคลอีกหลายท่านที่ไม่ได้กล่าวนามไว้ ณ ที่นี้ที่ได้ให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจให้กับผู้วิจัยมาโดยตลอด

สุดท้ายนี้ ผู้วิจัยขอโน้มรำลึกถึงคุณของบิดามารดาและครูอาจารย์ ที่อบรมสั่งสอนให้ความรู้เป็นกำลังใจ และให้การสนับสนุนผู้วิจัยด้วยดีตลอดมา

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ฉ
กิตติกรรมประกาศ.....	ช
สารบัญ.....	ฅ
บทที่ 1	1
บทนำ.....	1
ภูมิหลัง.....	1
ความมุ่งหมายของงานวิจัย.....	4
ความสำคัญของการวิจัย.....	4
ขอบเขตของการวิจัย	4
ประชากรที่ใช้ในการวิจัย.....	4
กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัย	4
ตัวแปรที่ศึกษา	4
กรอบแนวคิดในการวิจัย	5
สมมุติฐานในงานวิจัย	5
บทที่ 2	6
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	6
1. กระบวนการห้ามเลือด (Hemostasis).....	6
1.1 การหดตัวของหลอดเลือด (Vasoconstriction).....	6
1.2 การสร้าง Platelet plug.....	7
1.3. การสร้างลิ่มเลือด (Blood clot formation or secondary hemostasis).....	9

2.การหายของแผล (Wound healing).....	11
2.1 ขบวนการหายของแผล (Phase of wound healing).....	11
2.3 การหายของแผลถอนฟัน (Normal healing of extraction wound).....	16
3. สารห้ามเลือดเฉพาะที่ (Local hemostatic agent).....	24
3.1 สารห้ามเลือดแบบแพสซีฟ (Passive hemostatic agents).....	24
3.1.1.1 เส้นใยคอลลาเจน (Microfibrillar collagen; Avitene).....	24
3.1.1.2 คอลลาเจนแบบละลาย (Absorbable collagen; Helistat).....	25
3.1.2.1 Oxidized regenerated cellulose (<i>Surgicel</i>).....	25
3.1.2.2 ActCel และ Gelitacel.....	25
3.2 สารห้ามเลือดแบบแอคทีฟ (Active hemostatic agents).....	27
3.3 Bone hemostats (Bone wax).....	28
4.อัลจิเนต (Alginate).....	28
5. วัสดุห้ามเลือดจากไคโตซาน (Chitosan-based product): HemCon Dental Dressing (HDD)..	29
6. วัสดุห้ามเลือดจากอนุพันธ์ไคโตซาน (Calcium Alginate/ <i>N,O</i> -carboxymethylchitosan; CA/NOCC).....	31
บทที่ 3.....	42
วิธีดำเนินการวิจัย.....	42
การกำหนดกลุ่มประชากรและการสุ่มกลุ่มตัวอย่าง.....	42
ประชากร.....	42
ขั้นตอนการทดลองที่ใช้ในการวิจัย.....	42
1.การเตรียมวัสดุห้ามเลือดที่มีอนุพันธ์ไคโตซานเป็นองค์ประกอบ (CA/NOCC).....	42
2.การเพาะเลี้ยงเซลล์สร้างกระดูก.....	43
3. การทดสอบความเป็นพิษของวัสดุ CA/NOCC ต่อเซลล์ตามมาตรฐานของ ISO 10993-5	44

4. การทดสอบความสามารถในการเพิ่มจำนวนของเซลล์ (Cell Proliferation)	45
5. การศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope)	45
6.การทดสอบระดับปฏิกิริยาอัลคาไลน์ ฟอสฟาเตส (Alkaline phosphatase assay)	46
7.การทดสอบการสะสมแร่ธาตุในแมทริกซ์ระหว่างเซลล์ (Matrix mineralization assay) 47	
การเก็บรวบรวมข้อมูล	49
สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล	49
บทที่ 4	50
ผลการดำเนินงานวิจัย	50
การแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์สร้างกระดูก (Cell proliferation)	50
การแสดงออกของลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์สร้างกระดูก	52
การแสดงออกของอัลคาไลน์ ฟอสฟาเตส (ALP activity).....	54
การสะสมแคลเซียมภายนอกเซลล์จากการเกิดการสะสมแร่ธาตุของเซลล์สร้างกระดูก	57
บทที่ 5	59
สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ	59
สรุปผลการวิจัย	59
อภิปรายผลการวิจัย	60
ข้อเสนอแนะ	65
ภาคผนวก	64
บรรณานุกรม	74
ประวัติผู้เขียน	79

สารบัญตาราง

หน้า

ตาราง 1 ปัจจัยการแข็งตัวของเลือด9

ตาราง 2 เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่าง HemCon Bandage และ HemCon dental dressing30



สารบัญรูปภาพ

หน้า

ภาพประกอบ 1 กรอบแนวคิดการวิจัย.....	5
ภาพประกอบ 2 การยึดเกาะของเกล็ดเลือดกับชั้น subendothelial ผ่านทาง glycoprotein receptor....	7
ภาพประกอบ 3 การเปลี่ยนแปลงที่เกิดกับเกล็ดเลือดเมื่อถูกกระตุ้น	8
ภาพประกอบ 4 การเกาะกลุ่มเกล็ดเลือดที่เกิดจากการจับกันระหว่าง GP IIb/IIIa กับ fibrinogen/ vWF.....	8
ภาพประกอบ 5 การกระตุ้นฤทธิ์ของ Factor X ผ่านทาง intrinsic pathway	10
ภาพประกอบ 6 การกระตุ้นฤทธิ์ของ Factor X ผ่านทาง extrinsic pathway	10
ภาพประกอบ 7 ระยะที่มีเลือดออกและการอักเสบ (stage of hemorrhage & inflammation).....	13
ภาพประกอบ 8 ระยะการสร้างเนื้อเยื่อเส้นใยหรือระยะงอกขยาย (stage of fibroblastic or proliferative phase)	13
ภาพประกอบ 9 ระยะงอกของการสร้างเนื้อเยื่อเส้นใย (proliferative phase of fibroplastic stage).....	14
ภาพประกอบ 10 ระยะเนื้อเยื่อเจริญเต็มที่ (maturation phase).....	14
ภาพประกอบ 11 การทำให้แผลหายแบบปฐมภูมิ (first intention healing).....	15
ภาพประกอบ 12 การทำให้แผลหายแบบทุติยภูมิ (second intention healing)	16
ภาพประกอบ 13 การทำให้แผลหายแบบตติยภูมิ (third intention healing).....	16
ภาพประกอบ 14 ภาพแสดงแผล 1 วัน หลังการถอนฟันมี fibrin clot เต็มเบ้ารากฟัน พบ inflammatory cell (จุดขาว) เต็มบน clot (x 200)	18
ภาพประกอบ 15 ภาพแสดง proliferative – osteogenic phase ในเบ้ารากฟัน (x 150)	19
ภาพประกอบ 16 A และ B แผล 2 เดือนหลังการถอนฟันบางส่วนของ connective tissue matrix ถูก แทนที่ด้วยกระดูกที่ถูกสร้างขึ้นใหม่ (x 125).....	21
ภาพประกอบ 17 A และ B แผล 1 เดือนหลังการถอนฟัน แสดงกระดูกที่ถูกสร้างขึ้นใหม่รอบๆ ผนังเบ้ารากฟัน (x 30).....	22

ภาพประกอบ 18 A และ B แผล 3 เดือนหลังการถอนฟัน มี osteogenic remodeling phase เกิดขึ้น สมบูรณ์ (x 150).....	23
ภาพประกอบ 19 แสดงโครงสร้างของไคโตซาน Poly [beta] (1 to 4)-N-acetyl D-glucosamine	29
ภาพประกอบ 20 ภาพแสดงโครงสร้างทางเคมีของวัสดุอนุพันธ์ไคโตซาน	32
ภาพประกอบ 21 ภาพแสดงการทดสอบ การระคายเคืองและการแพ้ต่อผิวหนังของวัสดุทดสอบ ชนิดต่างๆ : (a) ฟังก์ชันชนิดตัวควบคุมผลบวก (b) ฟังก์ชันชนิดตัวควบคุมผลลบ (c) วัสดุห้ามเลือด สำหรับใช้ภายนอกร่างกาย และ (d) วัสดุห้ามเลือดสำหรับใช้ภายในร่างกาย	33
ภาพประกอบ 22 ภาพแสดงการตอบสนองของผิวหนังของอาสาสมัครต่อวัสดุทดสอบชนิดต่างๆ: ฟังก์ชันชนิดตัวควบคุมผลบวก ฟังก์ชันชนิดตัวควบคุมผลลบ วัสดุห้ามเลือดสำหรับใช้ภายนอก ร่างกาย และวัสดุห้ามเลือดสำหรับใช้ภายในร่างกายที่เวลา 72 ชั่วโมง	33
ภาพประกอบ 23 ภาพแสดงวิธีการทดสอบทางคลินิกเพื่อประเมินประสิทธิภาพการห้ามเลือดบน แผลผิวหนังตัดเพื่อการถ่ายปลูก.....	34
ภาพประกอบ 24 ภาพแสดงลักษณะแผลหลังจากรักษาด้วยวัสดุทดสอบแต่ละชนิด:.....	34
ภาพประกอบ 25 ภาพแสดงภาพถ่ายบาดแผลและรูปวาดคัดลอกลักษณะบาดแผล สีแดง แทน ตำแหน่งที่มีเลือดออก, สีเหลืองแทนตำแหน่งที่ไม่มีเลือดออก (a) ภาพบาดแผลที่เวลา 8 นาที	35
ภาพประกอบ 26 ภาพแสดงการผ่าตัดครั้งที่ 1 (พร้อมการฝังวัสดุทดสอบในร่างกาย)	35
ภาพประกอบ 27 ภาพแสดงการผ่าตัดครั้งที่ 2 (พร้อมการประเมินประสิทธิภาพการสลายตัวของ วัสดุทดสอบในร่างกายผู้ป่วย)	36
ภาพประกอบ 28 ภาพแสดงการประเมินประสิทธิภาพการสลายตัวของวัสดุห้ามเลือดหลังการฝัง เป็นระยะเวลา 3 เดือนในผู้ป่วย (a) รายที่ 1 (b) รายที่ 2	36
ภาพประกอบ 29 ภาพแสดงลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อผู้ป่วย (a) ชิ้นเนื้อก่อนการฝังวัสดุ ของผู้ป่วยรายที่ 1 (b) ชิ้นเนื้อหลังการฝังวัสดุของผู้ป่วยรายที่ 1 (c) ชิ้นเนื้อก่อนการฝังวัสดุของ ผู้ป่วยรายที่ 2 (d) ชิ้นเนื้อหลังการฝังวัสดุของผู้ป่วยรายที่ 2	37
ภาพประกอบ 30 แสดงชิ้นงานวัสดุห้ามเลือดจากอนุพันธ์ไคโตซาน (CA/NOCC) ที่นำมาทดสอบ	43

- ภาพประกอบ 31 กราฟเส้นแสดงความสามารถในการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์สร้างกระดูก ระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบ CA/NOCC ในวันที่ 1, 3 และ 6 แสดงภาพกราฟตัวแทนจากการทดสอบ 1 ชุดการทดลอง, error bar แสดง standard error of mean (SEM)51
- ภาพประกอบ 32 กราฟแท่งแสดงอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์สร้างกระดูกระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบ CA/NOCC จากการทดสอบ 5 ชุดการทดลอง (แสดงความสัมพันธ์เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม คิดเป็น %control ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, , error bar แสดง standard error of mean (SEM).....51
- ภาพประกอบ 33 ภาพ SEM แสดงลักษณะสารทดสอบ Calcium Alginate/*N,O*-carboxymethylchitosan (CA/NOCC) ที่กำลังขยาย x25, x100, x250, x500, x1,000 และ x2,000 ตามลำดับ.....52
- ภาพประกอบ 34 ภาพ SEM แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์สร้างกระดูก; ก และ ข แสดงลักษณะของเซลล์สร้างกระดูกในกลุ่มควบคุม ที่กำลังขยาย x1,000 และ x5,000 ตามลำดับ, ค และ ง แสดงลักษณะของเซลล์สร้างกระดูกที่ยึดเกาะอยู่รอบๆ วัสดุทดสอบ CA/NOCC กำลังขยาย x1000 และ x5,000 ตามลำดับ, จ และ ฉ แสดงลักษณะของเซลล์สร้างกระดูกที่ยึดเกาะอยู่บนวัสดุทดสอบ CA/NOCC ที่กำลังขยาย x2,500 และ x5,000 ตามลำดับ.....53
- ภาพประกอบ 35 ภาพกราฟแท่งแสดงแนวโน้มปฏิกิริยาอัลคาไลน์ ฟอสฟาเตส (ALP activity) ระหว่างกลุ่มทดสอบและกลุ่มควบคุมจาก 6 ชุดการทดลอง, error bar แสดง standard error of mean (SEM).....55
- ภาพประกอบ 36 ภาพกราฟแท่งแสดงปฏิกิริยาอัลคาไลน์ ฟอสฟาเตส (ALP activity) ของกลุ่มทดสอบเทียบกับกลุ่มควบคุมในวันที่ 4, 8 และ 14 จากการทดสอบ 6 ชุดการทดลอง โดยหาค่าความสัมพันธ์เทียบกับกลุ่มควบคุมคิดเป็น %control ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, error bar แสดง standard error of mean (SEM)56
- ภาพประกอบ 37 ภาพสีย้อม Alizarin red แสดงระดับแร่ธาตุที่เซลล์สร้างกระดูกสร้างขึ้นของ เซลล์สร้างกระดูกในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบ ในสัปดาห์ที่ 1, 2, 3 และ 4 ตามลำดับ แสดงภาพตัวแทนจากการทดสอบ 1 ชุดการทดลอง.....57
- ภาพประกอบ 38 กราฟแท่งแสดงความสัมพันธ์ระดับแร่ธาตุที่เซลล์สร้างกระดูกสร้างขึ้นของกลุ่มควบคุมเทียบกับกลุ่มทดสอบ ในสัปดาห์ที่ 4 เทียบกับสัปดาห์ที่ 1 จากการทดสอบ 4 ชุดการทดลอง

โดยคิดเป็นค่า %control เทียบกับกลุ่มควบคุม ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, error bar แสดง standard error of mean (SEM)58



บทที่ 1

บทนำ

ภูมิหลัง

ปัญหาเลือดออกในงานศัลยศาสตร์ช่องปากเป็นปัญหาแทรกซ้อนสำคัญที่พบได้บ่อย ซึ่งหากเกิดขึ้นควรได้รับการป้องกันและแก้ไขในทันที เพื่อป้องกันอันตรายที่จะเกิดขึ้นต่อผู้ป่วยทั้งในระหว่างและหลังจากรับการรักษาแล้ว ในปัจจุบันได้มีการคิดค้นสารห้ามเลือดเฉพาะที่ (Local hemostatic agent) ต่างๆ ออกมามากมายเพื่อนำมาช่วยแก้ปัญหาดังกล่าว โดยสารห้ามเลือดในอุดมคติควรมีคุณสมบัติคือ ไม้เน่าเสีย (Nonperishable) คงทน (Durable) มีความยืดหยุ่น (Flexible) ไม้แพง สามารถยึดเกาะกับบาดแผลได้ดี เข้ากันได้ดีกับเนื้อเยื่อ ไม้ก่อให้เกิดปฏิกิริยาแพ้ (Tissue reaction) สามารถสลายตัวได้เอง และห้ามเลือดได้อย่างมีประสิทธิภาพ(1-3) ซึ่งในปัจจุบันก็ยังไม่มีการคิดค้นสารห้ามเลือดเฉพาะที่ตัวใดที่มีคุณสมบัติครบตามที่กล่าวมาข้างต้น ทำให้ยังคงมีการคิดค้นเพื่อพัฒนาสารห้ามเลือดใหม่ๆ ขึ้นมาเรื่อยๆ เพื่อให้ได้สารห้ามเลือดเฉพาะที่ที่มีคุณสมบัติครบถ้วนตามที่กล่าวไป

สารห้ามเลือดเฉพาะที่ที่มักพบเห็นว่าถูกนำมาใช้บ่อยๆ ในงานศัลยศาสตร์ช่องปาก ได้แก่ Surgicel และ Gelfoam(4) โดยวัสดุทั้งสองจัดอยู่ในกลุ่มสารห้ามเลือดแบบแพสซีฟ (Passive hemostatic agents) ที่มีกลไกการทำงานหลักในการห้ามเลือด คือ การอาศัยโครงสร้างทางกายภาพของวัสดุที่มีลักษณะเป็นโครงข่าย (Lattice-like matrix) ให้เลือดมายึดเกาะ จากนั้นจะเกิดการกระตุ้นกระบวนการทำงานของ extrinsic clotting pathway ทำให้เกิดเลือดที่อยู่โดยรอบมารวมตัวกันและเกิดเป็นลิ่มเลือดขึ้น โดยผ่านการทำงานของไฟบริน (Fibrin) สารห้ามเลือดประเภทนี้เหมาะสมที่จะใช้ในผู้ป่วยที่มี intact coagulation cascade ปกติ ทำให้เมื่อนำมาใช้ในผู้ป่วยที่มีความผิดปกติของกระบวนการแข็งตัวของเลือดหรือได้รับยาที่ส่งผลต่อกระบวนการแข็งตัวของเลือด วัสดุประเภทนี้จึงทำงานได้ไม่ดีนัก อีกทั้งยังมีข้อด้อยในเรื่องของการยึดเกาะที่ไม่ดีในเนื้อเยื่อที่มีลักษณะเปียก ทำให้วัสดุยึดติดกับบาดแผลได้ไม่ดีส่งผลให้มีเลือดซึมออกมาจากแผลเล็กน้อย แต่อย่างไรก็ตามสารห้ามเลือดนี้ก็กลับมีประสิทธิภาพในการห้ามเลือดในบริเวณที่มีเลือดออกมากๆ ได้ดี เนื่องจากมีความสามารถในการดูดซึมมากทำให้มีการสร้างโครงสร้างที่เป็นไฟบรินได้ดีกว่า มีคำแนะนำให้ใช้สารห้ามเลือดประเภทนี้ให้น้อยที่สุดเท่าที่ทำได้และให้นำส่วนเกินที่เหลือหลังจากใช้งานแล้วออก เนื่องจากวัสดุอาจไปกดโครงสร้างบริเวณข้างเคียง เช่น เส้นประสาท เส้นเลือด ทำให้รับกวนกระบวนการหายของแผลหรือเกิดการติดเชื้อตามมาภายหลังได้(5, 6)

จากข้อดีหลายประการของวัสดุห้ามเลือดข้างต้น จึงทำให้มีการคิดค้นวัสดุห้ามเลือดชนิดใหม่ที่มีการปรับปรุงคุณสมบัติให้ดีขึ้นเพื่อหวังผลที่จะกำจัดข้อดีดังกล่าวขึ้นมา ซึ่งวัสดุนั้นก็คือ วัสดุห้ามเลือดจากไคโตซานและอนุพันธ์ของไคโตซาน

ไคโตซานเป็นสารที่เตรียมได้จากไคติน โดยการดึงหมู่อะเซทิลของไคตินออกกลายเป็นหมู่อะมิโน สามารถละลายได้ในสารละลายที่เป็นกรดอ่อน โดยในปัจจุบันได้มีการนำไคตินหรือไคโตซานมาประยุกต์ใช้ในงานด้านต่างๆ รวมทั้งในด้านการแพทย์ อาหารและยา(1, 7-13) เนื่องจากคุณสมบัติอันโดดเด่นของไคโตซาน เช่น ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์บางชนิด(8, 14-16) ความไม่เป็นพิษ การเข้ากันได้ทางชีวภาพ(3, 14) คุณสมบัติในการห้ามเลือด(1, 7, 8, 10-14, 17, 18) และการย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ(1, 7-13) เป็นต้น

HemCon dental dressing (HDD) เป็นวัสดุห้ามเลือดจากไคโตซานที่ถูกนำมาใช้ห้ามเลือดในช่องปาก โดยได้มีการพัฒนามาจาก HemCon Bandage ซึ่งถูกใช้ในการห้ามเลือดเพื่อรักษาบาดแผลต่างๆ ที่มีเลือดออก ในสงครามอิรักและอัฟกานิสถานของสหรัฐอเมริกา(2, 4) โดยเกิดการห้ามเลือดผ่านกลไกของวัสดุที่มีคุณสมบัติเป็นประจุบวก เมื่อวัสดุสัมผัสกับเลือดประจุบวกจะทำหน้าที่ดึงดูดประจุลบที่อยู่บนผิวเซลล์ของเซลล์เม็ดเลือดแดงให้มาเกาะ ทำให้เกิดลิ่มเลือดที่ขึ้นหนาแน่นอย่างรวดเร็วและเกิดการยึดติดแน่นกับบริเวณบาดแผลที่ต้องการรักษา(2-4) และถึงแม้กระบวนการห้ามเลือดดังกล่าวจะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วแต่ก็ไม่ทำให้เกิดความร้อนขึ้น ส่งผลให้ไม่มีการทำอันตรายต่อเนื้อเยื่อในบริเวณบาดแผลจากอุณหภูมิ (Thermal injury) เกิดขึ้น(2) จากกลไกการทำงานดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าการทำงานของ HDD ไม่ขึ้นกับกระบวนการห้ามเลือดที่ทำงานผ่าน intrinsic และ extrinsic clotting pathway(12) ทำให้ HDD สามารถใช้งานได้อย่างมีประสิทธิภาพในผู้ป่วยที่ได้รับยาต้านการแข็งตัวของเลือด (Oral anticoagulant therapy)(15, 16) และยาต้านเกล็ดเลือด (Antiplatelet treatment)(19) โดยที่ไม่ต้องทำการปรับหรือเปลี่ยนแปลงยาที่ผู้ป่วยได้รับ ทำให้ลดความเสี่ยงจากอันตรายที่อาจเกิดขึ้นจากการปรับเปลี่ยนยาของผู้ป่วยลงได้(2, 15, 16)

แต่อย่างไรก็ตามวัสดุห้ามเลือดเฉพาะที่ที่ได้กล่าวไปในข้างต้นล้วนแต่ต้องถูกนำเข้ามาจากต่างประเทศ ทำให้มีราคาค่อนข้างสูงและต้องใช้เวลาในการจัดหาเพื่อนำมาใช้ในโรงพยาบาลหรือตามคลินิกต่างๆ ในประเทศ ดังนั้นการที่ศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ (เอ็มเทค) ได้พัฒนาสารห้ามเลือดชนิดใหม่ขึ้น จึงเป็นการช่วยลดภาระค่าใช้จ่ายดังกล่าวลงและก่อให้เกิดประโยชน์อย่างมากในวงการการแพทย์ของประเทศไทย

Calcium Alginate/*N,O*-carboxymethylchitosan (CA/NOCC) เป็นสารห้ามเลือดจากอนุพันธ์ไคโตซานที่ได้รับการพัฒนาขึ้นมาโดยคณะศูนย์วิจัยจากศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ (เอ็มเทค) ซึ่งเป็นสารห้ามเลือดทางเลือกตัวหนึ่งที่มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับคุณสมบัติของสาร

ห้ามเลือดในอุดมคติตามที่เรต้องการ โดยสารดังกล่าวมีกลไกที่ช่วยส่งเสริมให้เกิดการหยุดไหลของเลือดผ่านคุณสมบัติทั้งทางกายภาพและทางเคมีของตัวเอง CA/NOCC มีลักษณะพื้นผิวของสารที่เป็นประจุลบ ซึ่งคล้ายกับประจุบนพื้นผิวของชั้นเอนโดทีเลียมคอลลาเจน (subendothelial collagen) และหมู่คาร์บอกซิล (carboxyl functional group) ที่คล้ายกับเส้นใยคอลลาเจนในชั้นเอนโดทีเลียมของหลอดเลือด ทำให้เกิดการดึงดูดและกระตุ้นเกล็ดเลือด เหนี่ยวนำให้เกิด contact activation ของโปรตีนในการเกิดลิ่มเลือดต่างๆ และเริ่มการทำงานของกระบวนการ clotting cascade ทำให้เกิดการสร้างไฟบรินขึ้นอย่างรวดเร็ว รวมถึงจากคุณสมบัติพื้นผิวของสารที่ชอบน้ำระดับปานกลาง (Moderate hydrophilic surface) ซึ่งจะช่วยส่งเสริมให้เกิดการดูดซึมของไฟบริโนเจน (Fibrinogen) ได้ดี ส่งผลช่วยเพิ่มการยึดเกาะของเกล็ดเลือด (Platelet adhesion) และการสร้างทรอมบิน (Thrombin) ขึ้นอย่างรวดเร็ว(20) จากคุณสมบัติและกลไกการทำงานดังกล่าวจึงทำให้เกิดการห้ามเลือดขึ้นอย่างมีประสิทธิภาพ (รวดเร็วและแข็งแรง)

จากที่ได้กล่าวไปในข้างต้นจะเห็นได้ว่าถึงแม้ HDD และ CA/NOCC จะเป็นวัสดุห้ามเลือดที่ผลิตได้จากสารตั้งต้นชนิดเดียวกันคือ โคลดิน แต่ก็มีกลไกในการทำงานห้ามเลือดที่แตกต่างกันคือ HDD จะมีคุณสมบัติที่เป็นประจุบวกซึ่งช่วยในการดึงดูดให้เซลล์เม็ดเลือดแดงมาเกาะเป็นหลัก (2) หรือก็คือการทำงานในส่วนของ primary hemostasis(15) ส่วน CA/NOCC จะมีคุณสมบัติที่เป็นประจุลบซึ่งช่วยดึงดูดและกระตุ้นการทำงานของเกล็ดเลือด รวมถึงส่งเสริมกระบวนการทำงานของ clotting cascade(1, 20) หรือก็คือส่งเสริมให้มีการทำงานทั้งในส่วนของ primary และ secondary hemostasis ทำให้เกิดการห้ามเลือดขึ้นอย่างรวดเร็วและลิ่มเลือดที่ได้มีความแข็งแรง ช่วยลดปัญหาการสูญเสียเลือด ณ ขณะทำหัตถการและการเกิดเลือดออกในภายหลัง (Delay bleeding) จนอาจนำไปสู่การเกิดเป็นเลือดคั่ง (Hematoma) และพัฒนาให้เกิดการติดเชื้อในที่สุด ดังนั้นจะเห็นได้ว่า CA/NOCC ถือเป็นวัสดุห้ามเลือดชนิดหนึ่งที่มีประสิทธิภาพในการห้ามเลือดได้เป็นอย่างดี

โดยวัสดุห้ามเลือดดังกล่าวได้ผ่านการทดสอบคุณสมบัติต่างๆ และประสิทธิภาพในการช่วยเร่งการแข็งตัวของเลือดในระดับหลอดทดลองและในสัตว์ทดลอง รวมถึงความเป็นพิษต่อเซลล์บริเวณผิวหนังของมนุษย์เรียบร้อยแล้ว(1, 7, 10, 11, 21) แต่ยังไม่เคยมีการนำวัสดุดังกล่าวมาทดสอบในเซลล์สร้างกระดูกในช่องปากของมนุษย์ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้จัดทำขึ้นเพื่อทดสอบความเป็นพิษของวัสดุห้ามเลือดจากอนุพันธ์โคโนซานต่อเซลล์เนื้อเยื่อในช่องปาก (เซลล์สร้างกระดูก) เพื่อหวังผลที่จะนำวัสดุห้ามเลือดนี้มาใช้ประโยชน์ในงานศัลยกรรมช่องปากต่อไปในอนาคต

ความมุ่งหมายของงานวิจัย

เพื่อทดสอบความเป็นพิษของวัสดุห้ามเลือดจากอนุพันธ์โคโตซานต่อเซลล์สร้างกระดูก (Osteoblast)

ความสำคัญของการวิจัย

หากการทดสอบความเป็นพิษของวัสดุห้ามเลือดจากอนุพันธ์โคโตซานต่อเซลล์สร้างกระดูกให้ผลที่ดี คือไม่เป็นพิษต่อเซลล์สร้างกระดูก ทำให้เซลล์สามารถแบ่งตัวเพิ่มจำนวนและมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ รวมถึงการทำหน้าที่ของเซลล์สร้างกระดูกที่เป็นปกติแล้ว วัสดุห้ามเลือดจากอนุพันธ์โคโตซานนี้อาจเป็นทางเลือกหนึ่งที่จะถูกนำมาพัฒนาเพื่อใช้ประโยชน์ในงานศัลยกรรมช่องปากต่อไปในอนาคต

ขอบเขตของการวิจัย

ประชากรที่ใช้ในการวิจัย

เซลล์สร้างกระดูกของมนุษย์

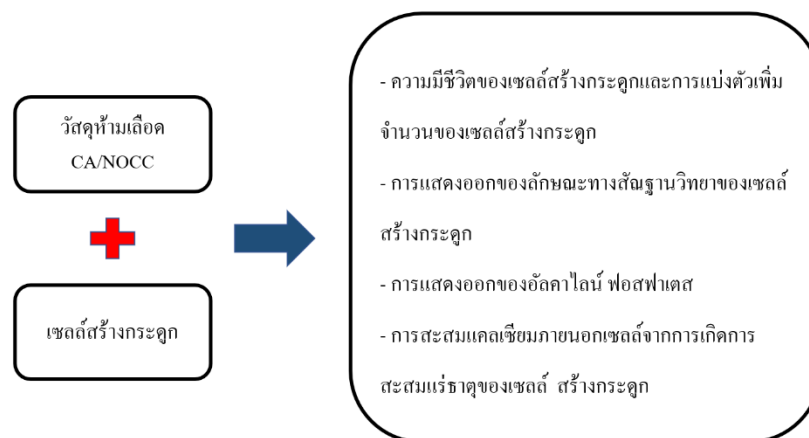
กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัย

เซลล์สร้างกระดูกที่เพาะเลี้ยงในงานเลี้ยงเซลล์

ตัวแปรที่ศึกษา

1. ตัวแปรอิสระ แบ่งเป็นดังนี้
 - 1.1 วัสดุห้ามเลือดจากอนุพันธ์โคโตซาน (CA/NOCC)
2. ตัวแปรตาม ได้แก่
 - 2.1 ความมีชีวิตของเซลล์สร้างกระดูกและการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์สร้างกระดูก
 - 2.2 การแสดงออกของลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์สร้างกระดูก
 - 2.3 การแสดงออกของอัลคาไลน์ ฟอสฟาเตส
 - 2.4 การสะสมแคลเซียมภายนอกเซลล์จากการเกิดการสะสมแร่ธาตุของเซลล์สร้างกระดูก

กรอบแนวคิดในการวิจัย



ภาพประกอบ 1 กรอบแนวคิดการวิจัย

สมมุติฐานในงานวิจัย

วัสดุห้ามเลือดจากอนุพันธ์ไคโตซานไม่เป็นพิษต่อเซลล์สร้างกระดูก ไม่ส่งผลต่อกระบวนการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์และการแสดงออกของลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์สร้างกระดูก พบการแสดงออกของอัลคาไลน์ ฟอสฟาเตส และการสะสมของแคลเซียมนอกเซลล์ของเซลล์สร้างกระดูก

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในการวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยได้ศึกษาเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง และได้นำเสนอตามหัวข้อต่อไปนี้

1. กระบวนการห้ามเลือด (Hemostasis)
2. การหายของแผล (Wound healing)
3. สารห้ามเลือดเฉพาะที่ (Local hemostatic agent)
4. อัลจิเนต (Alginate)
5. วัสดุห้ามเลือดจากไคโตซาน (HemCon dental dressing)
6. วัสดุห้ามเลือดจากอนุพันธ์ไคโตซาน (Calcium alginate/N,O-carboxymethylchitosan; CA/NOCC)

1. กระบวนการห้ามเลือด (Hemostasis)

เมื่อหลอดเลือดได้รับภัยอันตรายทางกายภาพ (Physical injury) จะเกิดการตอบสนอง โดยมีการทำงานร่วมกันระหว่างเกล็ดเลือด (Platelet), endothelial cell และ coagulation cascade ทำให้เกิดลิ่มที่ใช่หยุดเลือด (Hemostatic plug หรือ platelet-fibrin plug) ขึ้น โดยขั้นตอนในการห้ามเลือดจะประกอบด้วยขั้นตอนหลักๆ 3 ขั้นตอนด้วยกัน(5, 6) ได้แก่

- 1.1 การหดตัวของหลอดเลือด (Vasoconstriction): Primary hemostasis
- 1.2 การสร้าง platelet plug: Primary hemostasis
- 1.3 การสร้างลิ่มเลือด (Blood clot formation): Secondary hemostasis

1.1 การหดตัวของหลอดเลือด (Vasoconstriction)

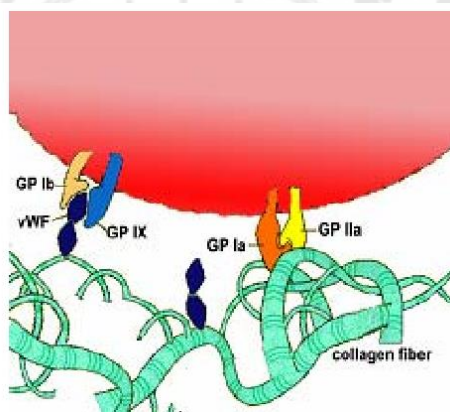
เมื่อหลอดเลือดถูกทำลายจะเกิดการตอบสนอง โดยมีการหดตัวของหลอดเลือดขึ้นทันที จากการทำงานของกล้ามเนื้อเรียบที่อยู่รอบหลอดเลือดผ่านกลไกทางระบบประสาทที่ยังไม่ทราบชัดเจน ทำให้เลือดไหลมาบริเวณที่ได้รับบาดเจ็บน้อยลง ซึ่งขั้นตอนนี้จัดอยู่ในกระบวนการห้ามเลือดระยะเริ่มแรก (Primary hemostasis)(5, 6)

1.2 การสร้าง Platelet plug

ส่วนเกล็ดเลือด (Platelet หรือ thrombocyte) เป็นชิ้นส่วนของเซลล์ที่ไม่มีนิวเคลียส แต่มี secretory vesicle หรือ granule ที่สะสมสารที่สำคัญในกระบวนการห้ามเลือด เมื่อมีการฉีกขาดของหลอดเลือด เกล็ดเลือดจะเริ่มเข้ามายึดเกาะบริเวณดังกล่าว นำไปสู่การกระตุ้นและการเกาะกลุ่มของ เกล็ดเลือดเป็น platelet plug ทำหน้าที่อุดบริเวณที่มีการฉีกขาด ทำให้เกิดการห้ามเลือดขึ้นในระยะแรก โดยกลไกการเกิด platelet plug สามารถแบ่งเป็น 3 ขั้นตอน(6) ดังนี้

1.2.1 Platelet adhesion

เป็นขั้นตอนที่เกล็ดเลือดจะเข้ามายึดเกาะกับชั้น subendothelial ของหลอดเลือดที่จะถูกเผยผิ๊งขึ้นมาสัมผัสกับเลือดเมื่อมีการฉีกขาด โดยอาศัยโปรตีน von Willebrand factor (vWF) เป็นตัวช่วยให้เกิดการยึดเกาะกัน ทำให้เกิดการห้ามเลือดขึ้น ขั้นตอนนี้จะเกิดขึ้นในระยะแรกและมีความสำคัญมากสำหรับการทำหน้าที่ห้ามเลือดของเกล็ดเลือด



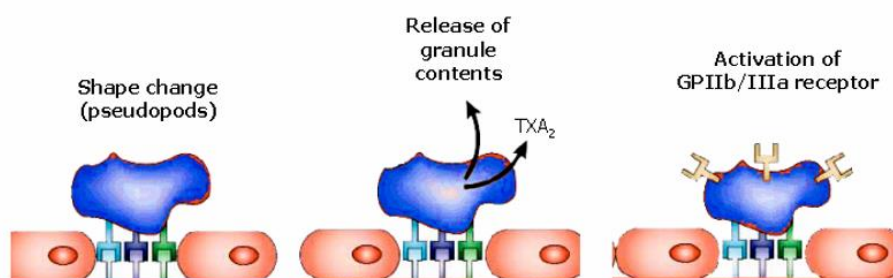
ภาพประกอบ 2 การยึดเกาะของเกล็ดเลือดกับชั้น subendothelial ผ่านทาง glycoprotein receptor

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

1.2.2 Platelet activation

เป็นขั้นตอนที่เกล็ดเลือดที่อยู่ในภาวะพักจะถูกกระตุ้นให้อยู่ในรูปแอคทีฟ (active) เพื่อให้ทำหน้าที่ในการห้ามเลือด ขั้นตอนนี้เกิดขึ้นหลังจากมีการจับกันระหว่างเกล็ดเลือดกับคอลลาเจน หรือ vWF ผ่านทาง GP receptor Ia/IIa หรือ Ib/IX ซึ่งผลของการจับกันของโมเลกุลผ่าน GP receptor เหล่านี้ จะทำให้เกิดการส่งทอดสัญญาณภายในเกล็ดเลือด (Intracellular signaling cascades) ขึ้น และทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงต่างๆ ของเกล็ดเลือดในขณะที่ถูกกระตุ้น (ภาพประกอบ 3) เช่น เกิดการเปลี่ยนรูปร่างของเกล็ดเลือดเป็น pseudopod ทำให้เกล็ดเลือดเกาะ-

กลุ่มกันได้ดีขึ้น มีการหลั่งสารที่เก็บสะสมใน granule ของเกล็ดเลือดออกมา ส่งผลช่วยกระตุ้นการทำงานและการเกาะกลุ่มกันของเกล็ดเลือด และเกิดการเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้างของ GPIIb/IIIa ทำให้เกล็ดเลือดเปลี่ยนคุณสมบัติจาก inactive ไปเป็น active receptor ซึ่งสามารถจับกับ fibrinogen และ vWF ได้อย่างแข็งแรง เป็นต้น

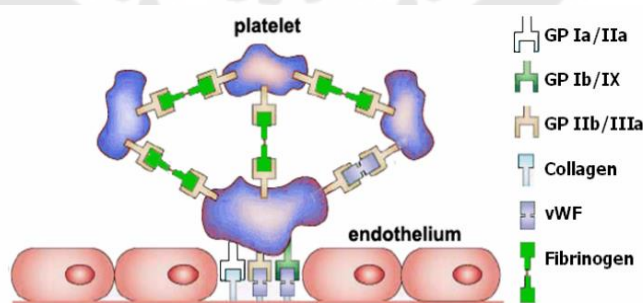


ภาพประกอบ 3 การเปลี่ยนแปลงที่เกิดกับเกล็ดเลือดเมื่อถูกกระตุ้น

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

1.2.3 Platelet aggregation

หลังจาก GPIIb/IIIa ถูกกระตุ้นให้เปลี่ยนเป็นรูปที่ active แล้ว fibrinogen และ vWF ในเลือดจะจับกับ GPIIb/IIIa บนเกล็ดเลือดและทำหน้าที่เชื่อมโยงเกล็ดเลือดเข้าด้วยกัน ทำให้เกิดการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดเกิดเป็น platelet plug มาอุดบริเวณที่มีการฉีกขาดของหลอดเลือด (ภาพประกอบ 4) ซึ่งเป็นหน้าที่ของเกล็ดเลือดใน primary hemostasis ที่จะเกิดขึ้นภายในเวลาเป็นวินาทีเมื่อมีการเสียหายของหลอดเลือด



ภาพประกอบ 4 การเกาะกลุ่มเกล็ดเลือดที่เกิดจากการจับกันระหว่าง GP IIb/IIIa กับ fibrinogen/

ที่มา: ชัชวาลย์ ศรีสวัสดิ์ (2555). การห้ามเลือด (HEMOSTASIS): ภาควิชาชีวเคมี คณะ

แพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล.

1.3. การสร้างลิ่มเลือด (Blood clot formation or secondary hemostasis)

การสร้างลิ่มเลือดหรือไฟบรินเกิดจากการทำงานของปัจจัยการแข็งตัวของเลือดหรือ coagulation factor ทำให้ได้ไฟบรินที่จะตกตะกอนลงมารวมกับเม็ดเลือดแดงกลายเป็นลิ่มเลือด (Blood clot หรือ fibrin clot) ที่มีความแข็งแรงและห้ามเลือดได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยปัจจัยการแข็งตัวของเลือดในกระบวนการสร้างลิ่มเลือดมีอยู่หลายชนิด ดังแสดงในตาราง 1 (5, 6)

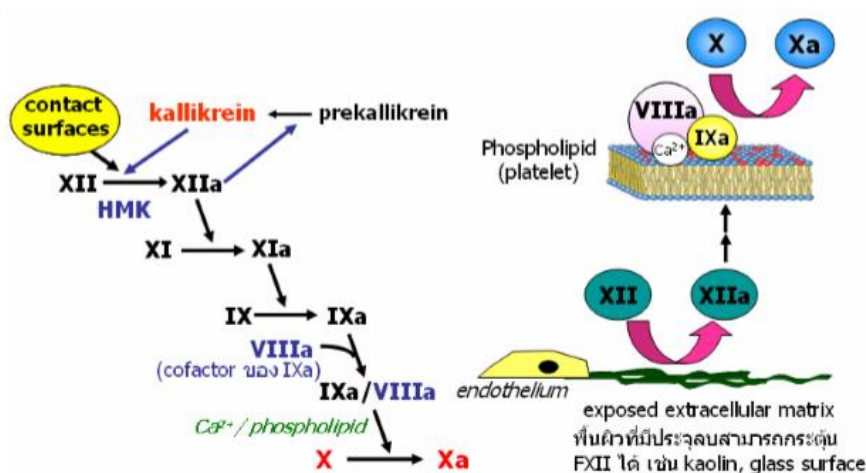
ตาราง 1 ปัจจัยการแข็งตัวของเลือด

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

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

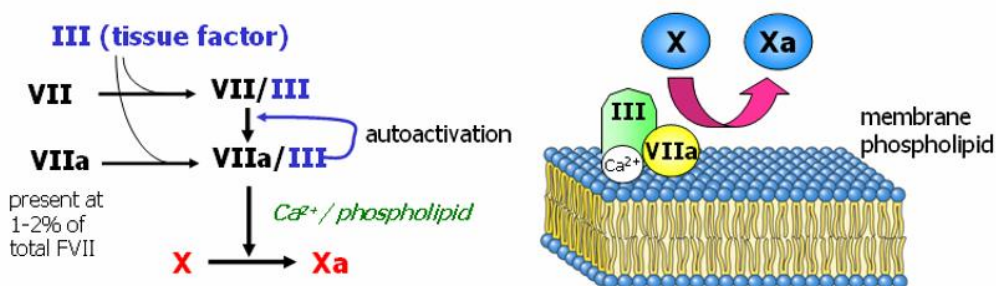
ผลของการกระตุ้นปัจจัยการแข็งตัวของเลือดเหล่านี้จะทำให้เกิด proteolytic cleavage ของ FI หรือ fibrinogen ที่ทำหน้าที่เป็น precursor ของการสร้างลิ่มเลือด ให้เกิดเป็นไฟบรินและลิ่มเลือดตามลำดับ โดยมีกลไกการทำงานที่อาจแบ่งออกได้เป็น 4 ขั้นตอน(6) ดังนี้

1.3.1 ขั้นตอนการกระตุ้น Factor X (Factor X activation) ผ่านทาง intrinsic และ extrinsic pathway ดังแสดงในภาพประกอบ 5 และ 6



ภาพประกอบ 5 การกระตุ้นฤทธิ์ของ Factor X ผ่านทาง intrinsic pathway

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



ภาพประกอบ 6 การกระตุ้นฤทธิ์ของ Factor X ผ่านทาง extrinsic pathway

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

1.3.2 ขั้นตอนการสร้างทรอมบิน (Thrombin generation) FXa ที่เกิดขึ้นจะทำงานร่วมกับ FVa ซึ่งเป็น cofactor แล้วเปลี่ยน prothrombin ให้เป็น thrombin

1.3.3 ขั้นตอนการสร้างไฟบริน (Fibrin formation) ทรอมบินที่เกิดขึ้นจะเปลี่ยน fibrinogen ให้กลายเป็น fibrin monomer ซึ่งจะเข้ามารวมกันเป็น fibrin polymer เกิดเป็น soft fibrin clot ที่ยังไม่มี ความแข็งแรง หลังจากนั้น FXIIIa ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มี transglutaminase activity จะทำให้เกิด covalent crosslink ระหว่าง fibrin monomer ทำให้ hard fibrin clot ซึ่งจะตกตะกอนลงมารวมกับเม็ดเลือดแดงกลายเป็นลิ่มเลือดที่มีความแข็งแรงและสามารถห้ามเลือด ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

1.3.4 การหดตัวของลิ่มเลือด (Clot retraction) ประมาณ 1-2 ชั่วโมงหลังจากเลือดแข็งตัว ลิ่มเลือดจะหดตัวบีบซีรั้มออกมาในกระบวนการที่ เรียกว่า syneresis การหดตัวของลิ่มเลือดนี้เกิดจาก contractile protein ในเกล็ดเลือด คือ thrombosthenin หดตัวโดยอาศัยพลังงานจาก ATP (เช่นเดียวกับ actin-myosin ในกล้ามเนื้อ) ดึงให้ไฟบรินในลิ่มเลือดหดตัวตามเป็นผลให้ลิ่มเลือดถูกบีบให้มีขนาดเล็กลง ถ้ามีเกล็ดเลือดต่ำกว่า $5,000$ ตัว/mm³ มักจะ ไม่มีการหดตัวของลิ่มเลือด (6)

2.การหายของแผล (Wound healing)

2.1 ขบวนการหายของแผล (Phase of wound healing)

ขบวนการหายของแผล จะเริ่มตั้งแต่เกิดแผล และดำเนินไปอย่างต่อเนื่องเป็นเวลานาน ต่างๆ กัน แล้วแต่ชนิดของแผล ตำแหน่ง และวิธีการรักษา ขั้นตอนต่างๆ ของการหายของแผล แบ่งเป็น 4 ระยะ แต่ละระยะอาจมีการเหลื่อมล้ำกันได้ ดังนี้(22, 23)

2.1.1 ระยะที่มีเลือดออกและการอักเสบ (Stage of hemorrhage & inflammation)

เมื่อเกิดบาดแผลมักมีการฉีกขาดของหลอดเลือดและเนื้อเยื่อร่วมด้วยเสมอ ร่างกายจะมีทั้งขบวนการห้ามเลือด และการหายของแผลเกิดขึ้น

เมื่อเกิดบาดแผลและหลอดเลือดฉีกขาด หลอดเลือดฝอยจะหดตัวอยู่ประมาณ 2-3 นาที ต่อมาเม็ดเลือดขาว (white blood cell) จะผลิตสื่อเคมี (chemical mediators) เช่น ฮีสตามีน (histamine) และพรอสตาแกลนดิน E1 และ E2 (prostaglandins E1 and E2) ซึ่งจะทำให้หลอดเลือดฝอยขยายตัวเกิดการอักเสบที่บาดแผล ทำให้มีช่องว่างระหว่างเซลล์เยื่อชั้นในของหลอดเลือด (endothelial cell) ทำให้พลาสมา, เอนไซม์ และเม็ดเลือดขาว (leukocytes) รั่วซึมออกมาในบาดแผล พลาสมาที่ซึมผ่านออกมาจะทำให้สิ่งปนเปื้อนเชื้อจากและการสะสมมากขึ้นจนเกิด

อาการบวม เม็ดเลือดขาวที่ออกมาในระยะแรกจะเป็น นิวโทรฟิล (neutrophils) ต่อมาเป็น โมโนไซต์ (monocytes) ซึ่งจะกลายเป็นแมคโครเฟจ (macrophage) ซึ่งเป็นตัวสำคัญในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมในแผล เช่น เนื้อตายและแบคทีเรีย นอกจากนี้ในแผลยังมี ลิมโฟไซต์ (lymphocyte) ที่ช่วยระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายในการกำจัดสิ่งแปลกปลอม (ภาพประกอบ 7) โดย lymphatic flow จะช่วยกำจัดพวกของเหลวออกเซลล์ส่วนเกิน แบคทีเรียและเนื้อเยื่อตาย รวมทั้งสิ่งแปลกปลอมออกไป ถ้ามีจำนวนมาก จะระบายสู่ภายนอกในลักษณะของหนอง

อาการแสดงของการอักเสบ จะมีอาการปวด บวม แดง ร้อน ระยะที่มีการอักเสบของแผลนี้บางครั้งถูกเรียกว่า “lag phase” เพราะระยะนี้แผลไม่แข็งแรง เนื่องจากคอลลาเจนเกิดขึ้นน้อยและการยึดกันของบาดแผลมีน้อย

2.1.2 ระยะการสร้างเนื้อเยื่อเส้นใยหรือระยะงอกขยาย (Stage of fibroplastic หรือ proliferative phase)

ระยะนี้จะมีปัจจัยการเจริญเติบโต (growth factor) ที่ออกมาจากเกล็ดเลือด นิวโทรฟิลและแมคโครเฟจ เป็นตัวกระตุ้นเซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue) ได้แก่ เซลล์ของ fibrocyte, เยื่อบุผิวของหลอดเลือดฝอย (capillary endothelium) และกล้ามเนื้อเรียบ (smooth muscle) ให้แบ่งตัวและเจริญเข้าไปในแผล (ภาพประกอบ 8) ต่อมาเซลล์ของ fibrocyte จะเปลี่ยนแปลงเป็น fibroblast ซึ่งจะทำหน้าที่สร้างคอลลาเจน เส้นใยที่ยืดหยุ่นได้ (elastic fiber) และเนื้อเยื่อพื้น (ground substance) (ภาพประกอบ 9)

ตั้งแต่วันที่ 3 หรือ 4 หลังจากมีบาดแผล สารที่เป็นเนื้อเยื่อพื้นจะประกอบด้วย mucopolysaccharide หลายชนิด มีลักษณะคล้ายวุ้น ช่วยยึดเส้นใยคอลลาเจนอยู่ด้วยกัน คอลลาเจนจะถูกสร้างขึ้นมากและเร็วภายในสองสัปดาห์ หลังจากนั้นอัตราการสร้างจะช้าลงและมีปริมาณคงที่หลัง 40 วัน คอลลาเจนที่ถูกสร้างขึ้นมานี้จะทำให้แผลแข็งแรงและหายเร็ว

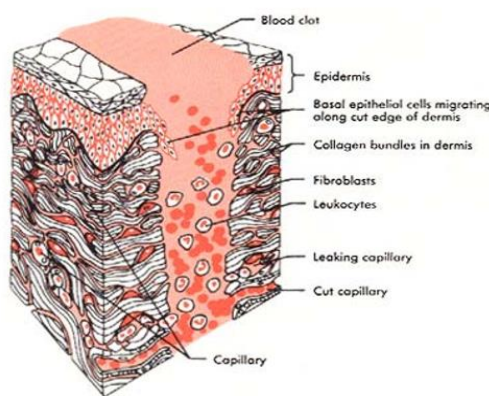
เนื้อเยื่อที่ร่างกายสร้างขึ้นมาใหม่บริเวณแผลจะประกอบด้วย เนื้อเยื่อพื้น (ground substance) คอลลาเจน หลอดเลือดฝอย ไฟโบรบลาสต์ และเซลล์อักเสบ (inflammatory cell) ทั้งหมดจะคั่งมีสีแดงสด เป็นมัน รวมเรียกว่า “granulation tissue”

เยื่อบุผิวที่ขอบแผลเริ่มงอกเข้าไปคลุมแผล โดยเคลื่อนตัวไปบนผิวของ granulation tissue จนขอบของเยื่อบุผิวมาชนกันจะหยุดการเคลื่อนตัว การหยุดการเคลื่อนตัวของเยื่อบุผิวที่งอกมาชนกันนี้ เรียกว่า “contact inhibition”

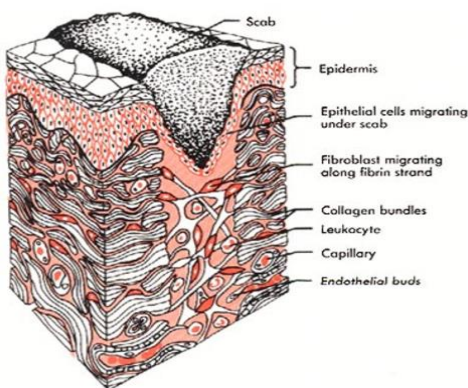
ระยะการสร้างเนื้อเยื่อเส้นใยหรือระยะงอกขยายนี้จะเริ่มเกิดขึ้นตั้งแต่วันที่ 5 จนถึงวันที่ 20 หลังจากเกิดบาดแผล ช่วงนี้ร่างกายต้องการสารอาหารที่มีประโยชน์เพื่อช่วยในการหายของแผล

2.1.3 ระยะเวลาเนื้อเยื่อเจริญเต็มที่หรือระยะปรับตัว (Maturation phase หรือ remodeling phase)

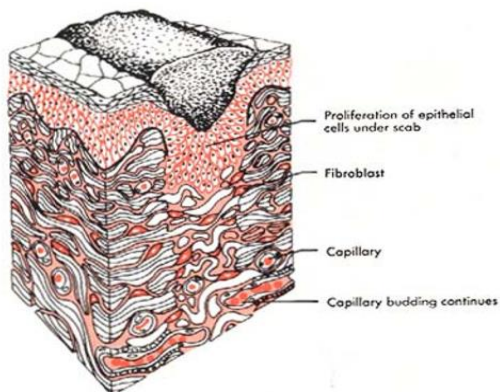
เป็นระยะสุดท้ายของการหายของแผล เริ่มตั้งแต่หลังวันที่ 20 ดำเนินไปเรื่อยๆ และบางกรณีอาจมีการเปลี่ยนแปลงไปได้ยาวนานถึง 2 ปี ระยะนี้มีการสลายตัวของเส้นใยคอลลาเจน พร้อมกับมีการสร้างเส้นใยคอลลาเจนใหม่ขึ้นมาทดแทน คอลลาเจนใหม่นี้จะมัดโยงไว้กัน ทำให้บาดแผลแข็งแรงมากขึ้น แต่จะแข็งแรงได้เพียงร้อยละ 80-85 ของเนื้อเยื่อเดิม และไม่มีความยืดหยุ่นที่แผล เป็นเพราะไม่มีการสร้าง elastin ขึ้นมาทดแทนได้ (ภาพประกอบ 10)



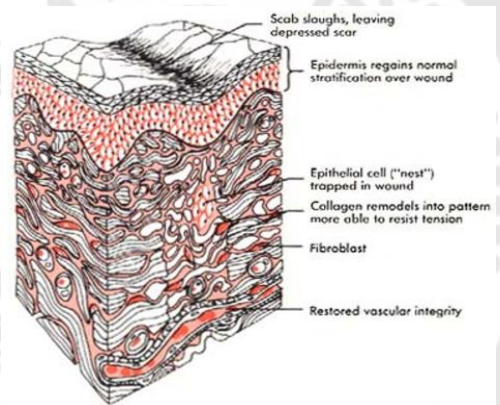
ภาพประกอบ 7 ระยะเวลาที่มีเลือดออกและการอักเสบ (stage of hemorrhage & inflammation)



ภาพประกอบ 8 ระยะเวลาการสร้างเนื้อเยื่อเส้นใยหรือระยะงอกขยาย (stage of fibroblastic or proliferative phase)



ภาพประกอบ 9 ระยะเวลาของการสร้างเนื้อเยื่อ (proliferative phase of fibroplastic stage)



ภาพประกอบ 10 ระยะเวลาเนื้อเยื่อเจริญเต็มที่ (maturation phase)

2.2 ชนิดของการหายของแผล (Type of wound healing)

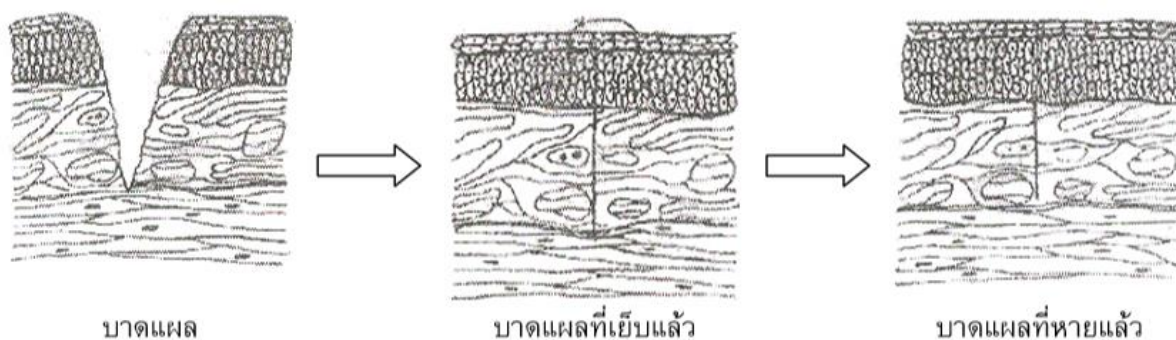
วิธีการทำให้แผลหายเป็นส่วนหนึ่งของการดูแลแผล ซึ่งจะช่วยให้แผลหายได้อย่างสมบูรณ์ รวดเร็ว ป้องกันปัญหาแทรกซ้อนที่อาจจะเกิดตามมาได้ การทำให้แผลหายแบ่งเป็น 3 แบบ ดังนี้(22, 23)

2.2.1 การหายแบบปฐมภูมิ (first intention healing) (ภาพประกอบ 11)

เป็นการหายของแผลที่มีการนำขอบแผลมาชิดกัน โดยไม่มีแรงดึงของแผล แผลสะอาด ไม่มีสิ่งปนเปื้อนที่จะเสี่ยงต่อการติดเชื้อภายหลัง ลักษณะบาดแผลไม่มีการสูญเสียเนื้อไป-

มาก หรือถ้ามีการสูญเสียจะสามารถตกแต่งและมีการนำขอบแผลมาชิดกันได้ แผลพวกนี้จะหายเร็ว มีแผลเป็น (scar) เกิดขึ้นน้อยหรือไม่มีเลย

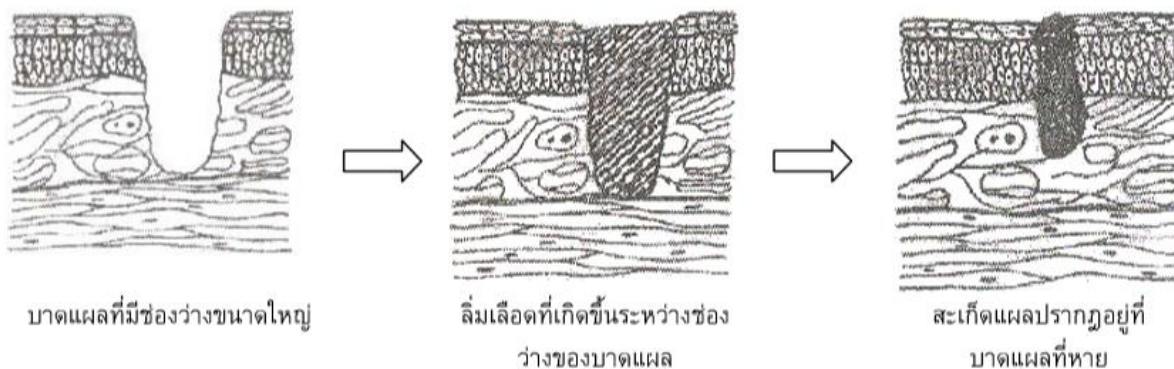
บาดแผลพวกนี้ได้แก่ บาดแผลผ่าตัดที่ถูกเย็บปิด, กระจกหักที่ถูกจัดเข้าที่เดิม เป็นต้น



ภาพประกอบ 11 การทำให้แผลหายแบบปฐมภูมิ (first intention healing)

2.2.2 การหายแบบทุติยภูมิ (second intention healing) (ภาพประกอบ 12)

เป็นการหายของแผลขนาดใหญ่และลึก มีช่องว่างระหว่างขอบแผล มีการสูญเสียเนื้อเยื่อ หรือมีการติดเชื้อเกิดขึ้น ไม่เหมาะสมสำหรับการเย็บแผลปิด ควรให้การรักษาแบบแผลเปิด โดยปล่อยให้มีการเกิดลิ่มเลือด (blood clot) อยู่ในแผลและปล่อยให้หายเองโดยการสร้าง granulation tissue และมีการเจริญของเยื่อบุผิว (epithelialization) มาปิดแผล การหายแบบนี้จะใช้เวลานานกว่าแบบปฐมภูมิและเกิดเป็นแผลเป็นได้มากกว่า นอกจากนี้มีโอกาสเกิดการติดเชื้อได้มากกว่าด้วย

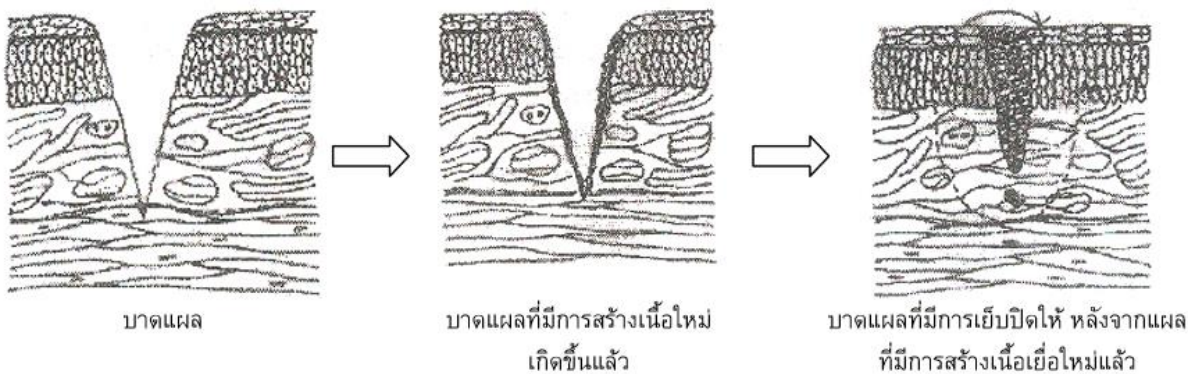


ภาพประกอบ 12 การทำให้แผลหายแบบทุติยภูมิ (second intention healing)

บาดแผลพวกนี้ ได้แก่ บาดแผลที่เย็บไว้ปริ หรือวัสดุเย็บแผลหลุด บาดแผลถอนฟัน บาดแผลที่สูญเสียเนื้อหลายๆ แผลที่มีการติดเชื้อ แผลไฟไหม้ หรือกระดูกหักที่จัดไม่เข้าที่เดิม เป็นต้น

2.2.3 การหายแบบตติยภูมิ (third intention healing) (ภาพประกอบ 13)

เป็นการหายของแผลที่มีช่องว่างระหว่างแผลและปล่อยให้แผลหายระยะหนึ่งจนมีการสร้าง granulation tissue ขึ้นใหม่ จึงช่วยให้แผลหายเร็วขึ้น โดยการเย็บปิดบาดแผล (delayed primary closure) หรือปิดด้วยการนำผิวหนังมาปลูก (skin graft)



ภาพประกอบ 13 การทำให้แผลหายแบบตติยภูมิ (third intention healing)

2.3 การหายของแผลถอนฟัน (Normal healing of extraction wound)

การหายของแผลถอนฟันปกติจะเหมือนกับการหายของแผลทั่วไป จะใช้เวลานานต่างกันบ้างในผู้ป่วยแต่ละราย ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับอายุ ตำแหน่งของฟัน เช่น ฟันคุดที่ต้องผ่าตัดออก การติดเชื้อ สภาพะสุขภาพของผู้ป่วย และความยากง่ายของการถอนฟัน เป็นต้น(22, 23)

การหายของแผลถอนฟันจะแบ่งเป็น 4 ระยะ

2.3.1 Coagulative phase

2.3.2 Proliferative phase

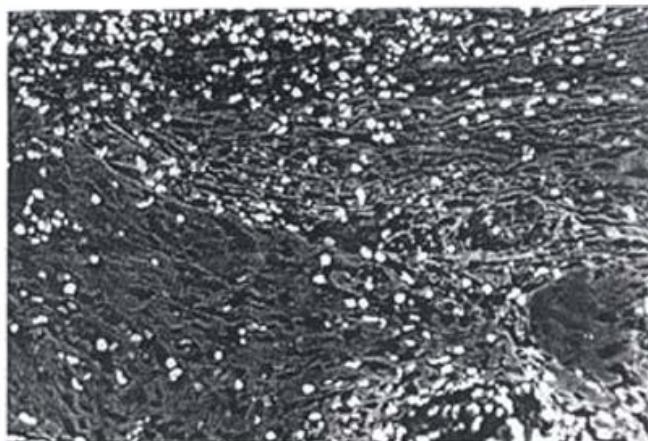
2.3.3 Osteogenic – remodeling phase

2.3.4 Epithelium formation

จากการทดลองในสัตว์ทำให้ทราบถึงระยะเวลาในการหายของแผลแต่ละระยะได้ ซึ่งอาจจะไม่เหมือนกับการหายของแผลในคนที่เดียนัก แต่พออนุมานว่าน่าจะใกล้เคียงกันได้ ดังนี้

ระยะที่ 1 Coagulative phase

ทันทีที่ร่างกายได้รับความกระทบกระเทือนจากการถอนฟันหรือการผ่าตัดเอาฟันออก ระบบการแข็งตัวของเลือด (coagulation system) และปฏิกิริยาการอักเสบ (inflammatory reaction) จะถูกกระตุ้น ภายในแผลถอนฟันจะเต็มไปด้วยลิ่มเลือด ซึ่งประกอบด้วย เส้นใยไฟบริน เม็ดเลือดแดงและเกล็ดเลือด ที่ผิวของลิ่มเลือดจะถูกปกคลุมด้วยแบคทีเรีย เซลล์ที่ตาย จะพบนิเว-
 โตรฟิลเริ่มเข้ามาในแผล มีส่วนของเยื่อปริทันต์ (periodontal ligament) หลงเหลืออยู่ที่ผนังของเบ้า-
 รากฟัน และมีปฏิกิริยาของการอักเสบเกิดขึ้น คือมีการขยายตัวของหลอดเลือดด้วย (ภาพประกอบ
 14)



ภาพประกอบ 14 ภาพแสดงแผล 1 วัน หลังการถอนฟันมี fibrin clot เต็มเบ้ารากฟัน พบ inflammatory cell (จุดขาว) เต็มบน clot (x 200)

ที่มา: Courtesy of Dr.Carlos E. Nasjleti and Dr.Raul G.Caffesse, University of Texas Health Science Center at Houston, Dental Branch, Department of Periodontics.)

ตรงกลางของลิ้มเลือดจะเกิดภาวะขาดออกซิเจน (hypoxic) เพราะไม่มีเลือดมาเลี้ยง แต่บริเวณขอบของลิ้มเลือดยังมีปริมาณความกดดันของออกซิเจน (oxygen tension) สูงอยู่ ความกดดันที่ต่างกันนี้ ทำให้คิงคูดไฟโบรบลาสต์เข้ามาในบริเวณนี้

ไฟโบรบลาสต์มีแหล่งกำเนิดจากเซลล์เยื่อปริทันต์ที่ตกค้างอยู่ และจากเซลล์ของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันของเหงือก (connective tissue of gingiva) ที่อยู่โดยรอบ สิ่งที่เป็นตัวช่วยดึงให้ไฟโบรบลาสต์และเซลล์เยื่อบุผิวของเส้นเลือด (endothelial cell) เข้ามายังบริเวณลิ้มเลือด ได้แก่ ปัจจัยการเจริญเติบโต (growth factor) ได้แก่ PDGF, TGF- β ทรอมบิน (thrombin) และไฟโบรเนคติน (fibronectin)

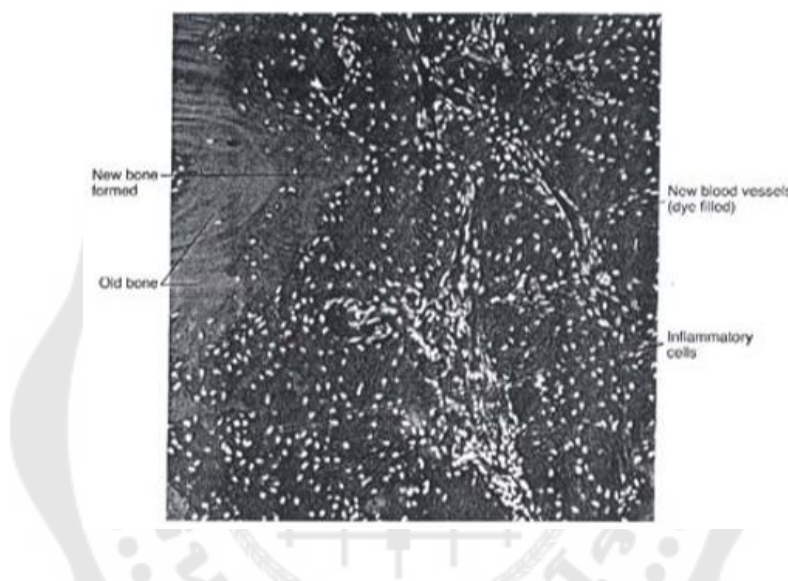
นอกจากนี้ไฟโบรบลาสต์จะหลั่งสารชื่อ ลามินิน (laminin) ซึ่งจะช่วยกระตุ้นให้เซลล์เยื่อบุผิวของเส้นเลือดเข้ามายังคอลลาเจน แมททริก (collagen matrix) ที่กำลังถูกผลิตขึ้นใหม่ด้วย

ระยะนี้จะมีเซลล์เม็ดเลือดขาวจะเข้าไปกำจัดเชื้อแบคทีเรีย สิ่งแปลกปลอม และเนื้อตาย

ระยะ coagulative phase จะใช้เวลาประมาณ 1 ถึง 3 วัน ไฟโบรบลาสต์และเซลล์เยื่อบุผิวของเส้นเลือดจะเป็นตัวสร้างเนื้อเยื่อ granulation ขึ้นมาแทนที่ลิ้มเลือดนั่นเอง

ระยะที่ 2 Proliferative phase (ภาพประกอบ 15)

ในระยะ proliferative นี้ จะมีเหตุการณ์หลายอย่างเกิดขึ้น ได้แก่ การสลายตัวของลิมเลือด การสร้างเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue matrix) มีการเจริญของเส้นเลือดใหม่เข้าไปในแผล มี osteoclast เข้ามาบริเวณแผลและเซลล์ที่จะสร้างเซลล์กระดูก (osteoprogenitor cell) จะเปลี่ยนรูปร่างเป็นออสติโอเบลาสต์ (osteoblasts) ปรากฏการณ์ต่างๆ เหล่านี้จะเกิดขึ้นพร้อมๆ กันและไม่เกี่ยวข้องกัน จากการทดลองในสัตว์พบว่าระยะนี้จะเกิดในช่วง 3 ถึง 10 วัน หลังการถอนฟัน



ภาพประกอบ 15 ภาพแสดง proliferative – osteogenic phase ในบ่ารากฟัน (x 150)

ที่มา: Courtesy of Dr.Carlos E. Nasjleti and Dr.Raul G. Caffesse, University of Texas Health Science Center at Houston, Dental Branch, Department of Periodontics.

นอกจากมีปัจจัยการเจริญเติบโต เช่น PDGF, TGF- β , bFGF ซึ่งทำหน้าที่ดึงไฟโบรบลาสต์และเซลล์เยื่อหุ้มของเส้นเลือดเข้ามาในแผลแล้ว ยังมีปัจจัยการเจริญเติบโตที่มาจากต่อมน้ำลาย ได้แก่ epidermal growth factor (EGF) และ nerve growth factor (NGF) ซึ่งจะทำหน้าที่เสริมการสร้างเนื้อเยื่อ granulation, ทำให้ไฟโบรบลาสต์และเซลล์เยื่อหุ้มของเส้นเลือดมีจำนวนมากขึ้น และช่วยให้มีการสร้างเส้นเลือดใหม่ (angiogenesis) ด้วย ฉะนั้นน้ำลาย เป็นตัวช่วยให้มีการหายของแผลตามปกติด้วย ได้มีการทดลองในสัตว์ทดลองโดยตัดต่อมน้ำลายออก พบว่าแผลหายช้าลงอย่างชัดเจน

เนื้อเยื่อ granulation ที่ถูกสร้างขึ้นเพื่อแทนที่ลิ่มเลือด จะพบได้ประมาณวันที่ 7 หลังถอนฟัน ในเนื้อเยื่อ granulation จะพบทั้งเซลล์เม็ดเลือดแดง เม็ดเลือดขาว ไฟบริน และเส้นเลือดเล็กๆ มากมาย ภายในสัปดาห์ที่สอง จะพบว่าเบ้ารากฟันมีเนื้อเยื่อ granulation อยู่เป็นจำนวนมาก ในระยะนี้เซลล์ที่ช่วยสร้างกระดูก (osteoprogenitor cell) ซึ่งพบได้บริเวณเยื่อหุ้มกระดูก เยื่อปริทันต์และเนื้อเยื่อ granulation เองจะเริ่มมีการเปลี่ยนแปลงตัวเองไปเป็น osteoblast ทั้งนี้โดยผ่านขบวนการเหนี่ยวนำ inductive process) จากโปรตีนในตระกูล Bone morphogenetic protein (BMP)

เนื้อเยื่อ granulation จะถูกแทนที่ด้วยเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ประมาณวันที่ 20 หลังถอนฟัน เนื้อเยื่อเกี่ยวพันนี้จะประกอบด้วยคอลลาเจน และเส้นใย reticulum ซึ่งถูกสร้างขึ้นมาโดยไฟโบรบลาสต์นั่นเอง คอลลาเจนที่พบเป็นชนิดที่ 1, 3 และ 5 (collagen type I, III, V) โดยที่พบคอลลาเจนชนิดที่ 1 และ 5 มากในช่วงที่เกิดแผลใหม่ๆ จากนั้นจะลดลงเรื่อยๆ และจะพบคอลลาเจนชนิดที่ 1 และ 3 เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ในวันต่อๆ มา โดยพบว่าคอลลาเจนชนิดที่ 5 มีส่วนเกี่ยวข้องกับ การเกิดเส้นเลือดใหม่ (angiogenesis) และการหายของกระดูก (bone healing)

การเกิดเนื้อเยื่อ granulation อาจถูกขัดขวางได้ถ้าลิ่มเลือดถูกทำลายไปโดยขบวนการ fibrinolysis โดยเอนไซม์พลาสมิน (plasmin enzyme) จะไปทำลายเส้นใยไฟบริน นอกจากนี้ยังมีเอนไซม์อีลาสเทส (elastase enzyme) ซึ่งผลิตโดยนิวโตรฟิล จะช่วยเสริมให้เกิด fibrinolysis โดยทำให้พลาสมิโน-เจน โมเลกุล (plasminogen molecule) แดกกระจาย ขัดขวางต่อ anti-plasmin ที่อยู่ในกระแสเลือดทำให้พลาสมินเด่นขึ้น เกิดขบวนการสลายไฟบริน (fibrinolysis) อาจพบได้ประมาณวันที่ 3 – 6 หลังการถอนฟัน

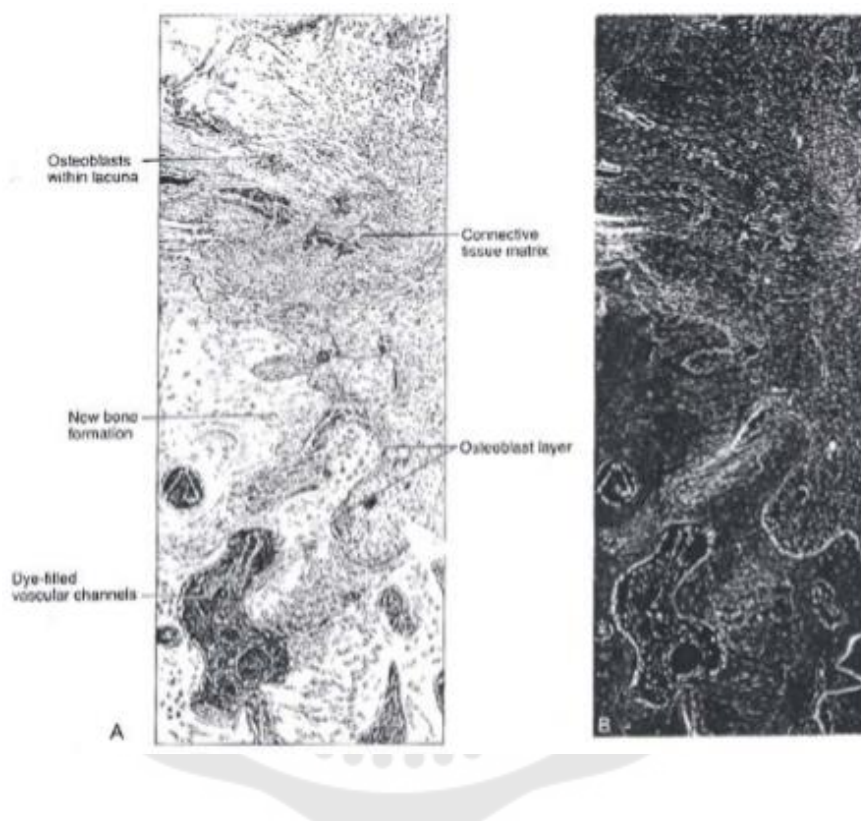
ระยะที่ 3 Osteogenic – remodeling phase

ขบวนการ osteogenesis ประกอบด้วย 1. การผลิต osteoid (secretion of osteoid) 2. การสะสมพอกพูนของแร่ธาตุ (mineralization of the matrix) และ 3. การปรับสภาพของกระดูก (remodeling of bone) โดยมีรายละเอียดดังนี้

ในสัปดาห์แรกหลังถอนฟัน crestal bone จะเริ่มมีการถูกทำลายโดย osteoclast ประมาณวันที่ 7 หลังถอนฟัน osteoblast จะผลิตเนื้อเยื่อพื้นฐาน (ground substance) ที่อุดมไปด้วยคอลลาเจน จากนั้นจะมีการผลิต extracellular matrix vesicles ที่ภายในเต็มไปด้วยผลึกของไฮดรอกซีอะพาไทต์ (hydroxyapatite) เอนไซม์ alkaline pyrophosphatases และ ATPases เอนไซม์ทั้ง 2 ตัวนี้เชื่อกันว่าจะช่วยเสริมให้มีการ calcification โดยไปห้ามผลของ pyrophosphate และ ATP ทำให้มีความเข้มข้นของ phosphate มากขึ้น

เมื่อมีการสะสมพอกพูนธาตุ (mineralization) extracellular matrix vesicle จะ แตกออก ผลึกของไฮดรอกซีอะพาไทท์จะถูกปล่อยออกมาสะสมพอกพูนไปตามเส้นใยคอลลาเจน และขยายพอกพูนขึ้นเรื่อยๆ

ในกระดูกที่ถูกสร้างขึ้นใหม่ จะพบเส้นใยของ trabeculae ที่มี marrow space กว้าง ประมาณ 80 – 120 μm ในส่วน trabeculae จะพบ osteoblastic lacunae ด้วย (ภาพประกอบ 16)

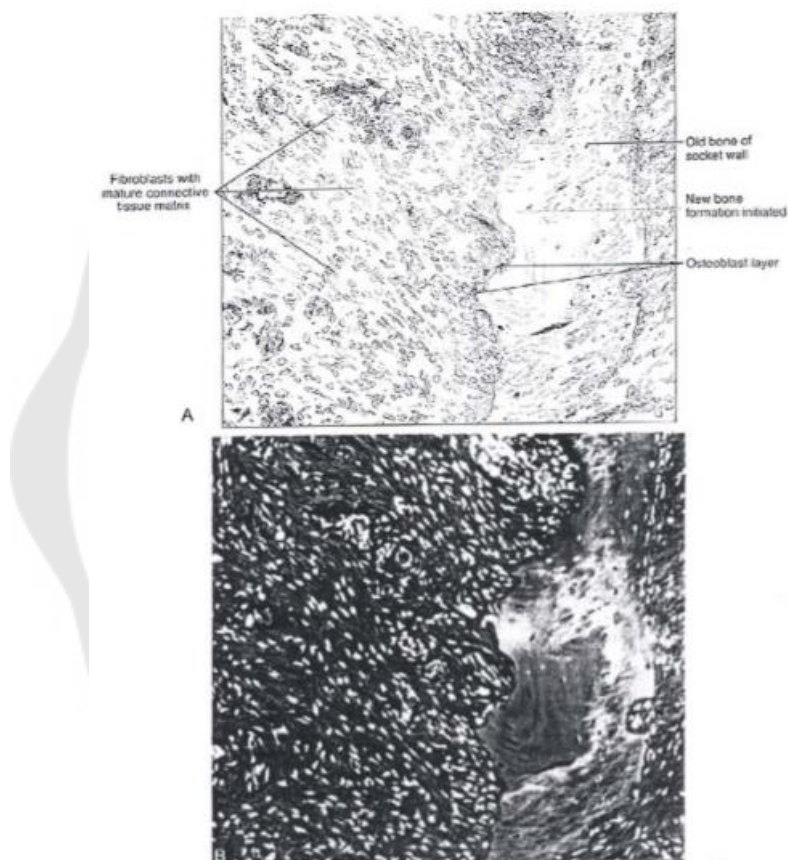


ภาพประกอบ 16 A และ B แผล 2 เดือนหลังการถอนฟันบางส่วนของ connective tissue matrix ถูกแทนที่ด้วยกระดูกที่ถูกสร้างขึ้นใหม่ (x 125)

ที่มา: Courtesy of Dr.Carlos E. Nasjleti and Dr.Raul G. Caffesse, University of Texas Health Science Center at Houston, Dental Branch, Department of Periodontics.

กระดูกที่ถูกสร้างขึ้นนี้จะสร้างก่อนที่บริเวณชิดกับเชื่อมต่อกระดูก และรอบๆ ผนังเบ้ารากฟัน (along socket walls) (ภาพประกอบ 17)

ช่วงระยะเวลาที่มีการสร้างกระดูกมากที่สุด คือช่วง 4-8 สัปดาห์ (active bone formation) จากนั้นจะมีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นกระดูกที่สมบูรณ์ (remodeling) ขบวนการ osteogenesis จะใช้เวลาทั้งหมดประมาณ 12-16 สัปดาห์



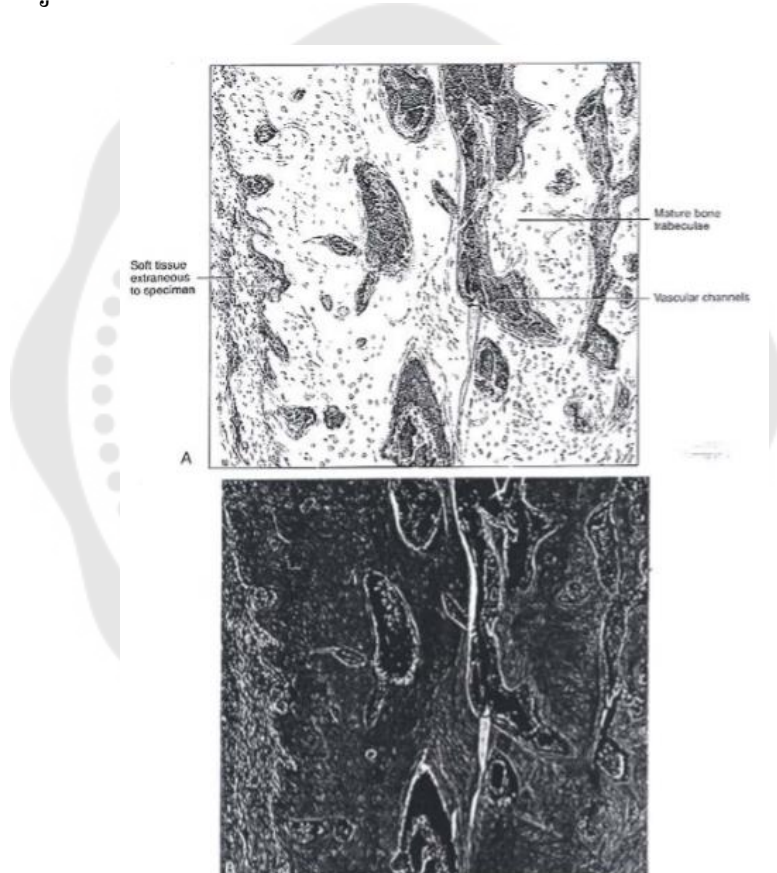
ภาพประกอบ 17 A และ B แสดง 1 เดือนหลังการถอนฟัน แสดงกระดูกที่ถูกสร้างขึ้นใหม่รอบๆ ผนังเบ้ารากฟัน (x 30)

ที่มา: Courtesy of Dr.Carlos E. Nasjleti and Dr.Raul G. Caffesse, University of Texas Health Science at Houston, Dental Branch, Department of Periodontics.

จากการทดลองในหนูพบว่า หลังจากถอนฟันไปแล้ว 22 วัน ไม่สามารถแยกขอบเขตของกระดูกใหม่และกระดูกเขี้ยวฟันเดิมได้ และภายใน 3 เดือน พบมีการเชื่อมต่อกันของกระดูกใหม่กับกระดูกเก่า (remodeling) ได้อย่างสมบูรณ์ (ภาพประกอบ 18)

ระยะที่ 4 Epithelium formation

การงอกของเยื่อผิวหรือเยื่อปาก (mucosa) จะออกจากขอบเขี้ยวฟันเริ่มตั้งแต่วันที่ 4 หลังถอนฟัน โดยงอกออกไปเหนือลิ้มเลือด และเนื้อเยื่อ granulation ที่ถูกสร้างขึ้นมาจนกระทั่งมาบรรจบกัน ในแผลถอนฟันขนาดเล็ก แผลจะปิดเร็วตั้งแต่สัปดาห์ที่สอง ในแผลถอนฟันขนาดใหญ่อาจปิดในสัปดาห์ที่สามหรือสี่



ภาพประกอบ 18 A และ B แผล 3 เดือนหลังการถอนฟัน มี osteogenic remodeling phase เกิดขึ้น
สมบูรณ์ (x 150)

ที่มา: Courtesy of Dr.Carlos E.Nasjleti and Dr.Raul G. Caffesse, University of Texas Health Science at Houston, Dental Branch, Department of Periodontics.

3. สารห้ามเลือดเฉพาะที่ (Local hemostatic agent)

สารห้ามเลือด คือสารที่ช่วยสนับสนุนให้เลือดหยุดไหล โดยสารห้ามเลือดในอุดมคติควรมีประสิทธิภาพ สามารถสลายได้ด้วยตัวเอง มีความปลอดภัยเมื่อใช้กับร่างกายและใช้ได้ง่าย โดยสารห้ามเลือดเฉพาะที่ (Local hemostatic agent) สามารถจำแนกได้เป็น 2 ประเภท ดังนี้

3.1 สารแบบพาสซีฟ (Passive agents) 3.2 สารแบบแอคทีฟ (Active agents)(5)

3.1 สารห้ามเลือดแบบพาสซีฟ (Passive hemostatic agents)

มีลักษณะเป็นโครงข่าย (Framework) ที่ทำหน้าที่ให้เกิดเลือดมายึดเกาะแล้วเกิดเป็นลิ่มเลือดที่มีความเสถียร กลไกการทำงานหลักของสารห้ามเลือดประเภทนี้จะมีลักษณะเป็นรูปแบบทางกายภาพประกอบเป็นโครงข่าย (Lattice-like matrix) ให้เลือดมายึดเกาะ และช่วยกระตุ้นกระบวนการทำงานของ extrinsic clotting pathway ทำให้เกิดเลือดที่อยู่โดยรอบมารวมตัวและ เกิดเป็นลิ่มเลือดขึ้น โดยอาศัยการทำงานของไฟบรินสารห้ามเลือดประเภทนี้เหมาะสมที่จะใช้ในผู้ป่วยที่มี intact coagulation cascade โดยมีกจะเป็นสารห้ามเลือดที่ถูกนำมาใช้เป็นอันดับแรก เนื่องจากสามารถนำมาใช้ได้ทันที ใช้งานง่ายและมีราคาถูก มีคำแนะนำให้ใช้สารห้ามเลือดประเภทนี้ให้น้อยที่สุดเท่าที่ทำได้และให้นำส่วนเกินที่เหลือหลังจากที่สามารถทำให้เกิดการหยุดไหลของเลือดแล้วออก เนื่องจากมันมีผลข้างเคียงไปกดโครงสร้างบริเวณข้างเคียง เช่น เส้นประสาท เส้นเลือด ตัวอย่างสารห้ามเลือดประเภทนี้ เช่น คอลลาเจน (Collagens), เซลลูโลส (Cellulose), เจลาติน (Gelatins) และ พอลิแซคคาไรด์ สเฟียร์ (Polysaccharide spheres)(5)

3.1.1 ผลิตภัณฑ์จากคอลลาเจน (Collagen-base products)

เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้มาจากส่วนเอ็นวัว (Bovine tendon) หรือคอลลาเจนส่วนผิวของวัว (Bovine dermal collagen) แบ่งได้เป็น เส้นใยคอลลาเจน (Microfibrillar collagen products) และคอลลาเจนชนิดละลายตัวเอง (Absorbable collagen products)

3.1.1.1 เส้นใยคอลลาเจน (Microfibrillar collagen; Avitene)

เป็นผลิตภัณฑ์จากคอลลาเจนบริสุทธิ์จากชั้นผิวหนังของวัว (Purified bovine dermal collagen) มีลักษณะเป็นเส้นใยหลวมๆ ทำหน้าที่ในการดึงดูดเกล็ดเลือดให้มารวมตัวกันและยึดเกาะระหว่างช่องว่างของเส้นใยเกิดเป็นลิ่มเลือดขึ้น (Physiologic platelet plug)

3.1.1.2 คอลลาเจนแบบละลาย (Absorbable collagen; Helistat)

เป็นผลิตภัณฑ์ของคอลลาเจนบริสุทธิ์ที่ได้มาจากเอ็นของวัว (Bovine flexor tendon) และทำให้แห้งโดยวิธีการเยือกแข็ง (Purified and lyophilized) มีลักษณะนุ่ม มีสีขาว ยืดหยุ่นได้ ไม่เปราะ มีโครงสร้างคล้ายฟองน้ำ และมีคุณสมบัติในการดูดซึมของเหลวได้จำนวนมาก และมีการสลายตัวอย่างสมบูรณ์ใน 14 – 56 วัน ทำงานโดยการทำหน้าที่อุดกั้นเลือดและส่งผลให้เกิดการแข็งตัวของเลือด (Coagulation process) โดยเมื่อเลือดสัมผัสกับวัสดุ คอลลาเจนจะกระตุ้นให้เกิดการเลือดมารวมกัน (Aggregation of platelet) และจับกับเส้นใยคอลลาเจนจำนวนมาก จากนั้นเกล็ดเลือดจะสลาย (Degranulate) และปล่อย factor ออกมา เช่น Thromboxane A2 ซึ่งจะช่วยให้เกิดการสร้างลิ่มเลือดขึ้น

3.1.2 ผลิตภัณฑ์จากเซลลูโลส (Cellulose-base product)

3.1.2.1 Oxidized regenerated cellulose (*Surgicel*)

เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้มาจากพืช (Plant-based alpha-cellulose) มีความสามารถในการดูดซึม มีสีขาว ลักษณะคล้ายผ้าถัก เป็นโครงข่ายปลอดเชื้อ (Sterile fabric meshwork) อาจเป็นแบบแผ่นเดียวหรือหลายๆ แผ่นก็ได้ ราคาแพง โดยจะทำให้เกิดการดูดซึมทางกายภาพของเมทริกซ์เพื่อให้เกิดการสร้างลิ่มเลือดขึ้น และเกิดการห้ามเลือดโดยอาศัยกลไกจากการกด (Mechanical pressure) วัสดุนี้มีคุณสมบัติเป็นกรด ซึ่งอาจทำให้เกิดการอักเสบและการตายของเนื้อเยื่อ ขึ้นได้ และทำให้การทำงานของ thrombin ไม่มีประสิทธิภาพ แต่มีประโยชน์ในเรื่องของการช่วยยับยั้งแบคทีเรีย (Bacteriostatic) วัสดุสามารถดูดซึมและสลายไปได้เองภายในเวลาประมาณ 4-8 สัปดาห์ โดย Loescher and Robinson(24) ได้มีการรายงานว่าวัสดุห้ามเลือดนี้ อาจเป็นสาเหตุทำให้เกิดการรบกวนของการรับความรู้สึกชั่วคราว (Temporary sensory disturbance)

3.1.2.2 ActCel และ Gelitacel

เป็นวัสดุห้ามเลือดชนิดใหม่ที่ผลิตมาจากเซลลูโลสปลอดเชื้อ ทำออกมาในลักษณะของโครงข่าย Surgicel (Meshwork-like Surgicel) โดยเมื่อวัสดุสัมผัสกับเลือดมันจะเกิดการขยายตัวขึ้น 3-4 เท่า และรวมตัวกันกลายเป็นเจล วัสดุชนิดนี้สามารถสลายตัวโดยสมบูรณ์ได้เองภายในเวลา 1-2 สัปดาห์ เมื่อการสลายตัวสิ้นสุดจะให้ผลิตภัณฑ์เป็นกลูโคสและน้ำ ซึ่งจะไม่ส่งผลต่อกระบวนการหายของแผล

ActCel มีกลไกการทำงานหลายอย่าง คือ ช่วยส่งเสริมให้เกิดกระบวนการ coagulation โดยการกระตุ้นให้เกิด platelet aggregation และสร้างลิ่มเลือดที่เสถียรแบบสามมิติ ActCel จะจับกับแคลเซียมไอออนส่งผลกระตุ้นกระบวนการ coagulation cascade ผ่านทาง intrinsic pathway นอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย วัสดุนี้ถูกนำมาใช้ในบริเวณแผลผ่าตัด

พันธุศาสตร์ที่สามเพื่อป้องกันการเกิดเบ้าฟันอักเสบ (Dry socket) นอกจากนี้ยังนำมาใช้ในงานปริทันต์และงานผ่าตัดขากรรไกรด้วย (Periodontal & orthognathic surgeries) ข้อบ่งชี้ในการใช้วัสดุชนิดนี้คือ ใช้ในการห้ามเลือดบริเวณแผลเปิดและบริเวณช่องว่างต่างๆ ของร่างกาย (เช่น ปาก หู จมูก คอ และช่องคลอด)

Gelitacel เป็นวัสดุที่ทำงานอย่างรวดเร็ว เกิดการสลายของเซลล์โลสผ่านทางกระบวนการออกซิไดซ์ โดยสามารถสลายตัวได้อย่างรวดเร็วภายในเวลา 96 ชั่วโมง ดังนั้นจึงเป็นการลดความเสี่ยงในการเกิด encapsulation ซึ่ง Gelitacel มีราคาสูงกว่า Surgicel

3.1.3 ผลิตภัณฑ์จากเจลาติน (Gelatin-based products) : Gelfoam

เจลโฟม (Gelfoam) เป็นวัสดุห้ามเลือดที่ได้มาจากเจลาตินบริสุทธิ์จากชั้นผิวหนังของหมู มีลักษณะเป็นรู ยืดหยุ่นได้ มีคุณสมบัติเป็นฟองน้ำเจลาตินที่ดูดซึมได้ มีการผลิตออกมาทั้งในรูปแบบของแผ่นฟิล์ม ฟองน้ำเจลาติน (Gelfoam) และผง เจลโฟมทำงานโดยจะทำหน้าที่เป็นโครงข่ายให้เกิดการแข็งตัวของเลือดขึ้น (Clotting framework) ให้ประสิทธิภาพประอบดีเมื่อใช้ในการหยุดเลือดที่มาจากหลอดเลือดเล็กๆ และจะมีประสิทธิภาพเพิ่มมากขึ้นเมื่อนำมาผสมกับทროมบิน เจลโฟมก่อให้เกิดปฏิกิริยาต่อเนื่องน้อย สามารถสลายตัวได้อย่างสมบูรณ์ภายใน 4-6 สัปดาห์ และมีรายงานว่าวัสดุห้ามเลือดจากเจลาตินสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดลิ่มเลือดที่มีคุณภาพได้มากกว่าวัสดุห้ามเลือดจากคอลลาเจน

3.1.4 Polysaccharide hemopheres

เป็นวัสดุห้ามเลือดชนิดใหม่ที่ได้จากการสกัดแป้งในผัก (Vegetable starch) ไม่มีส่วนประกอบที่ได้จากมนุษย์หรือสัตว์ ถูกผลิตออกมาในรูปแบบของผง ใช้ในการควบคุมภาวะเลือดออกจากเส้นเลือดขนาดเล็ก โดยอาศัยคุณสมบัติที่ชอบน้ำ (Hydrophilic) ของวัสดุทำให้เลือดแห้ง (Dehydrating blood) ทำให้มีความเข้มข้นเพิ่มมากขึ้นจนกลายเป็นส่วนประกอบที่แข็ง ดังนั้นจึงเป็นการช่วยเพิ่มการสร้างแนวกัน (Barrier formation) วัสดุห้ามเลือดชนิดนี้ควรใช้อย่างระมัดระวังในผู้ป่วยเบาหวาน เนื่องจากมีส่วนประกอบของน้ำตาล

จากคุณสมบัติของวัสดุห้ามเลือดแบบแพสซีฟขึ้นอยู่กับความสามารถในกระตุ้นกระบวนการแข็งตัวของเลือดเฉพาะที่ โดยไม่มีความเกี่ยวข้องกับ intrinsic coagulation factor แต่จะกระตุ้นให้เกิดการสร้างลิ่มเลือดขึ้นโดยโครงข่ายสามมิติ (3D scaffold) ดังนั้นวัสดุห้ามเลือดกลุ่มนี้จึงไม่มีประสิทธิภาพเมื่อนำมาใช้ในผู้ป่วยที่มีภาวะการแข็งตัวของเลือดผิดปกติ (Coagulopathic) และจากงานวิจัยพบว่า microfibrillar collagen เป็นวัสดุห้ามเลือดที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดในวัสดุห้ามเลือดแบบแพสซีฟ ตามมาด้วย collagen sponge, gelatin sponge และ oxidized regenerated cellulose ตามลำดับ

3.2 สารห้ามเลือดแบบแอคทีฟ (Active hemostatic agents)

เป็นสารห้ามเลือดที่มีการทำงานด้วยกระบวนการทางชีววิทยา (Biologic activity) โดยจะเข้าไปมีส่วนร่วมโดยตรงกับ coagulation cascade เหนี่ยวนำให้เกิดลิ่มเลือดขึ้น สารห้ามเลือดแบบแอคทีฟนี้ประกอบด้วยทรอมบินและผลิตภัณฑ์ของทรอมบิน โดยสารห้ามเลือดชนิดนี้เป็นทางเลือกที่มีประโยชน์อย่างมากในการใช้ห้ามเลือดผู้ป่วยที่ได้รับยาต้านการแข็งตัวของเลือดและยาต้านเกล็ดเลือด (5)

3.2.1 ทรอมบิน (Thrombin)

เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้มาจากพลาสมาของวัวหรือมนุษย์หรือผลิตจากเทคนิคการ-สร้าง DNA สายผสม (Recombinant DNA techniques เช่น recombinant thrombin) ทรอมบินถูกนำมาใช้แบบเฉพาะที่ในรูปของผงหรือสารละลายที่ใช้ร่วมกับฟองน้ำเจลาตินหรือนำมาผสมกับเจลาตินเมตริกซ์ (Gelatin matrix) หรือในรูปสเปรย์ ผลิตภัณฑ์นี้ทำงานอย่างรวดเร็วภายใน 10 นาที โดยมีผลทำให้ไฟบริโนเจนเปลี่ยนไปเป็นไฟбрิน

3.2.2 วัสดุห้ามเลือดชนิดไหลแผ่ (Flowable hemostatic agent; FloSeal)

เป็นวัสดุห้ามเลือดที่ได้จากการรวมกันของสาร 2 ชนิด คือ bovine-derived gelatin granules และ human-derived thrombin โดยสารทั้งสองจะทำงานร่วมกันและทำให้เกิดลิ่มเลือดที่เสถียรขึ้นในบริเวณที่มีเลือดออก ซึ่งมีกลไกการทำงานคือ เมื่อวัสดุห้ามเลือดถูกใส่ลงไปในบริเวณที่เกิดเลือดออก gelatin granule ที่สัมผัสกับเลือดจะบวมตัวขึ้น 10-20% ทำให้เกิดการแนบสนิทกับบริเวณที่เกิดเลือดออกขึ้น จากนั้นส่วนที่เป็นทรอมบินจะไปกระตุ้น common pathway ในกระบวนการแข็งตัวของเลือดและเปลี่ยนไฟบริโนเจนให้เป็นไฟบรินทำให้เกิดการสร้างลิ่มเลือดที่เสถียรขึ้นโดยรอบ วัสดุนี้สามารถสลายได้เองในร่างกายภายในเวลา 6-8 สัปดาห์ และจากคุณสมบัติของวัสดุที่ไหลแผ่ได้จึงทำให้มันสามารถปรับรูปร่างให้เข้ากับบาดแผลต่างๆ ได้ดี สามารถใช้ได้ทั้งการบาดเจ็บที่เกิดขึ้นในกระดูกและเนื้อเยื่ออ่อน

3.2.3 Sealant

เป็นวัสดุห้ามเลือดที่ทำหน้าที่ขวางกั้นไม่ให้ของเหลวไหลผ่านได้ โดยแบ่งเป็น 4 ชนิด ได้แก่ fibrin sealants, PEG polymers, albumin with glutaraldehyde และ new cyanoacrylate sealant

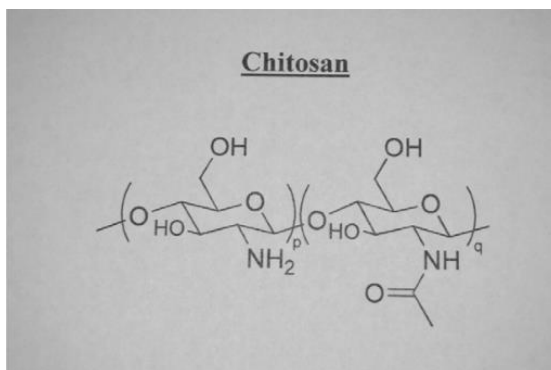
3.3 Bone hemostats (Bone wax)

เป็นวัสดุห้ามเลือดที่ได้จากส่วนผสมปลอดเชื้อที่ไม่ละลายน้ำของขี้ผึ้ง (Beeswax), พาราฟิน (Paraffin) และ isopropyl palmitate มีลักษณะอ่อนนุ่ม ใช้ในการห้ามเลือดเฉพาะที่ในบริเวณที่มองเห็นตำแหน่งที่เกิดเลือดออกจากกระดูก โดยทั่วไปจะหมายถึง bone bleeder ในบริเวณที่ทำการผ่าตัด จากคุณสมบัติที่ยืดหยุ่นจึงทำให้สามารถที่จะนำวัสดุนี้ไปใช้ในบริเวณที่เกิดเลือดออกหรือบริเวณที่ถูกกรอได้เลย เนื่องจากวัสดุสามารถเปลี่ยนแปลงรูปร่างไปตามที่ต้องการได้ และทันทีที่เกิดการบีบรัดของเส้นเลือด ก็จะทำให้เลือดหยุดไหล จากคุณสมบัติที่ไม่ละลายน้ำจึงทำให้วัสดุนี้ไม่สามารถถูกดูดซึมและสลายตัวได้ ซึ่งจะส่งผลให้เกิดการขัดขวางกระบวนการหายของแผลตามปกติและเกิดการติดเชื้อได้จากการลดลงของการกำจัดเชื้อแบคทีเรียตามปกติ (Bacteria clearance) ในกระดูก cancellous ควรระมัดระวังการใช้วัสดุชนิดนี้ในบริเวณที่กระดูกกำลังมีการสร้างใหม่ การใช้วัสดุห้ามเลือดนี้ในระยะเวลาอันอาจก่อให้เกิดการอักเสบและเกิดปฏิกิริยาแพ้สิ่งแปลกปลอม (Giant cell reaction) ขึ้นได้

4. อัลจิเนต (Alginate)

อัลจิเนตเป็นพอลิเมอร์แซคคาไรด์ประจุลบที่สกัดได้จากสาหร่ายทะเลสีน้ำตาล (kelp) มีคุณสมบัติเข้ากันได้ดีทางชีวภาพ สามารถย่อยสลายได้เองตามธรรมชาติ มีอัตราดูดซับน้ำสูง มีความสามารถในการห้ามเลือด ช่วยส่งเสริมการหายของบาดแผล และราคาไม่แพง(25, 26) และเมื่อนำเกลือโซเดียมมาผสมกับอัลจิเนตทำให้ได้สารประกอบโซเดียมอัลจิเนต (Sodium alginate; SA) ซึ่งถูกนำมาใช้ประโยชน์ในการห้ามเลือดอย่างแพร่หลาย เนื่องจากความสามารถของสารในการช่วยให้เกิดการรวมตัวและยึดเกาะกันของส่วนประกอบที่ใช้ในการห้ามเลือด เช่น เกล็ดเลือด และ coagulation factor ต่างๆ ส่งเสริมให้เกิดการแข็งตัวของเลือดขึ้น ทั้งยังมีคุณสมบัติในการดูดซับน้ำได้ดีด้วย(27)

5. วัสดุห้ามเลือดจากไคโตซาน (Chitosan-based product): HemCon Dental Dressing (HDD)



ภาพประกอบ 19 แสดงโครงสร้างของไคโตซาน Poly [beta] (1 to 4)-N-acetyl D-glucosamine

ที่มา: Malmquist et al.(2008). Hemostasis of Oral Surgery Wounds: J oral Maxillofacial Surgery

HemCom Dental Dressing (HDD) เป็นวัสดุห้ามเลือดจากไคโตซานที่ถูกนำมาใช้ห้ามเลือดในช่องปาก โดยได้มีการพัฒนามาจาก Hemcon Bandage ซึ่งถูกใช้ในการห้ามเลือดเพื่อรักษาบาดแผลต่างๆ ที่มีเลือดออก ในสงครามอิรักและอัฟกานิสถานของสหรัฐอเมริกา(3, 15) HDD มีความแตกต่างจาก HemCon Bandage ตรงที่มีขนาดเล็กกว่า สามารถละลายได้ด้วยของเหลวในช่องปากหลังจากทำหัตถการ และไม่มีส่วนของ poly backing ทำให้ HDD สามารถใช้ห้ามเลือดได้ทั้งสองด้าน(2, 19)

ตาราง 2 เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่าง HemCon Bandage และ HemCon dental dressing

	HemCon Bandage	HemCon Dental Dressing
Function	Hemostatic dressing: major combat wounds	Hemostatic dressing: oral surgery wounds
Mechanism of action	Electropositive surface charge	Electropositive surface charge
Composition	Freeze dried chitosan	Freeze dried chitosan
Size	100 x 100 x 5.5 mm	10 x 12 x 5.5 mm
Backing	Non-stick polybacking: prevent hands sticking to wounds	No backing required: dissolves intraorally
Orientation	Poly backing towards hand: smooth material side toward wound	Non-directional: either surface can be placed into the extraction socket
Removal	Sterile water or saline rinse	Dissolves intraorally
Accidental ingestion risk	None: food grade and large size	None: food grade
Accidental inhalation risk	None: large size	None: low specific gravity, surgical protocol throat packs and dissolution eliminates risk
Packaged	Sterile single-use foil pack: 2-year shelf life	Sterile single-use foil pack: 2-year shelf life

ที่ ๓๑ : Malmquist et al.(2008). Hemostasis of Oral Surgery Wounds: J oral Maxillofacial Surgery.

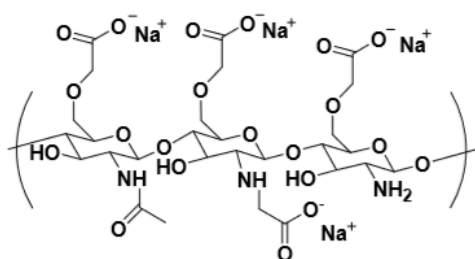
HDD คือ N-acetyl glucosamine polysaccharide ที่ผลิตมาจากไคโตซานที่ทำให้แห้ง (Freeze dried chitosan) โดยไคโตซานเป็นพอลิเมอร์ชีวภาพประกอบเตรียมได้จากไคติน(2, 3, 15, 16) สามารถสกัดได้จากเปลือกกุ้งมีคุณสมบัติละลายได้ในสารละลายที่เป็นกรดอ่อน ไม่เป็นพิษ มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพ ย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่เป็นประจุบวก(15, 16, 19) มีคุณสมบัติในการห้ามเลือด และความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียบางชนิด ได้แก่ Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumonia, Pseudomonas aeruginosa และ Proteus mirabilis(15) HDD ถูกผลิตออกมาในรูปแบบของแผ่นฟองน้ำที่ไม่ยืดหยุ่น ดังนั้นก่อนใช้งานจะต้องทำการตัดวัสดุให้มีขนาดพอดีกับบาดแผลที่ต้องการรักษา จากหลายๆ งานวิจัยพบว่า HDD สามารถห้ามเลือดได้ภายใน 1 นาที การห้ามเลือดที่เกิดขึ้นอาศัยการทำงานผ่านกลไกของวัสดุที่มีคุณสมบัติเป็นประจุบวก โดยเมื่อวัสดุสัมผัสกับเลือดประจุบวกจะทำหน้าที่ดึงดูดประจุลบที่อยู่บนผิวเซลล์ของเซลล์เม็ดเลือดแดงให้มาเกาะ ทำให้เกิดลิ่มเลือดที่ชั้นหนืดขึ้นอย่างรวดเร็วและเกิดการยึดติดแน่นกับบริเวณบาดแผลที่ต้องการรักษา(2, 4) และถึงแม้กระบวนการห้ามเลือดดังกล่าวจะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วแต่ก็ไม่ทำให้เกิดความร้อนขึ้น ส่งผลให้ไม่มีการทำอันตรายต่อเนื้อเยื่อในบริเวณบาดแผลจากอุณหภูมิ (Thermal injury) เกิดขึ้น จากกลไกการทำงานดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าการทำงานของ HDD ไม่ขึ้นกับกระบวนการห้ามเลือดที่ทำงานผ่าน intrinsic และ extrinsic clotting pathway(12) ทำให้ HDD สามารถใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพในผู้ป่วยที่ได้รับยาต้านการแข็งตัวของเลือด (Oral anticoagulant therapy)(15, 16) และยาต้านเกล็ดเลือด (Antiplatelet treatment)(19) โดยที่ไม่ต้องทำการปรับหรือเปลี่ยนแปลงการได้รับยา(2, 15, 19) นอกจากนี้จากการศึกษาของ Roberto Pippi และคณะ(15, 19) ยังพบว่า HDD ช่วยลดความเจ็บปวดหลังการรักษาในเช้าวันถัดมาและในวันที่ทำการตัดไหมได้ดีกว่าเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และยังช่วยทำให้เกิดการหายของบาดแผลที่ดีขึ้นด้วย(2, 15, 16, 19)

6. วัสดุห้ามเลือดจากอนุพันธ์ไคโตซาน (Calcium Alginate/N,O-carboxymethylchitosan; CA/NOCC)

Calcium Alginate/N,O-carboxymethylchitosan (CA/NOCC) เป็นสารห้ามเลือดจากอนุพันธ์ไคโตซานร่วมกับโซเดียมอัลจิเนต ที่ได้รับการพัฒนาขึ้นมาโดยคณะศูนย์วิจัยจากศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ (เอ็มเทค) มีกลไกที่ช่วยส่งเสริมให้เกิดการหยุดไหลของเลือดผ่านคุณสมบัติทั้งทางกายภาพและทางเคมีของตัวเอง CA/NOCC มีลักษณะพื้นผิวของสารที่เป็นประจุลบ ซึ่ง

คล้ายกับประจุลบบนพื้นผิวของซับเอนโดทีเลียมคอลลาเจน (Subendothelial collagen) และหมู่คาร์บอกซิล (Carboxyl functional group) ที่คล้ายกับเส้นใยคอลลาเจนในชั้นเอนโดทีเลียมของหลอดเลือด ทำให้เกิดการดึงดูดและกระตุ้นเกล็ดเลือดเหนี่ยวนำให้เกิด contact activation (กระตุ้น factor XII จาก inactive form ให้กลายเป็น active form) ของโปรตีนในการเกิดลิ่มเลือดต่างๆ และเริ่มการทำงานของกระบวนการ clotting cascade ทำให้เกิดการสร้างไฟบรินขึ้นอย่างรวดเร็ว รวมถึงจากคุณสมบัติพื้นผิวของสารที่ชอบน้ำระดับปานกลาง (Moderate hydrophilic surface) จึงส่งเสริมให้เกิดการดูดซึมของไฟบริโนเจนได้ดี ส่งผลช่วยเพิ่มการยึดเกาะของเกล็ดเลือดและการสร้าง thrombin ขึ้นอย่างรวดเร็ว จากกลไกข้างต้นจะเห็นได้ว่า CA/NOCC กระตุ้นให้เกิดการห้ามเลือดขึ้นผ่านทางกลไกการทำงานของทั้ง primary และ secondary hemostasis ทำให้การห้ามเลือดที่เกิดขึ้นสามารถเกิดขึ้นได้อย่างรวดเร็วและแข็งแรง(1, 7, 20, 21)

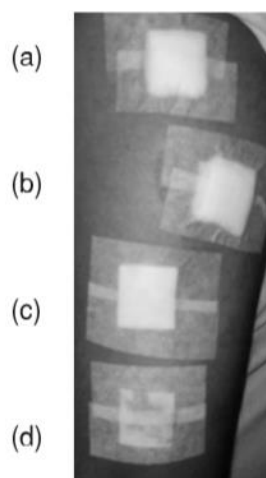
จากการศึกษาของคณะผู้วิจัยจากศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ (เอ็มเทค) พบว่าวัสดุห้ามเลือดจากอนุพันธ์ไคโตซาน (CA/NOCC) มีประสิทธิภาพในการช่วงเร่งการแข็งตัวของเลือดและห้ามเลือดได้ดี(1, 7, 21) ไม่เป็นพิษ(28) สามารถสลายตัวได้อย่างสมบูรณ์ในร่างกายผู้ป่วยภายในระยะเวลาประมาณ 3 เดือน ไม่พบปฏิกิริยาการอักเสบหรือการต่อต้านของเนื้อเยื่อที่สัมผัสกับวัสดุ และไม่ก่อให้เกิดการระคายเคืองและการแพ้(10, 11) โดยคุณสมบัติดังกล่าวได้ผ่านการทดสอบทั้งในระดับหลอดทดลอง สัตว์ทดลอง และในเซลล์บริเวณผิวหนังของมนุษย์เรียบร้อยแล้ว ดังแสดงในภาพประกอบ 20 – 29 ดังนั้นจึงแสดงว่าวัสดุห้ามเลือด CA/NOCC มีความปลอดภัย และสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในมนุษย์ได้



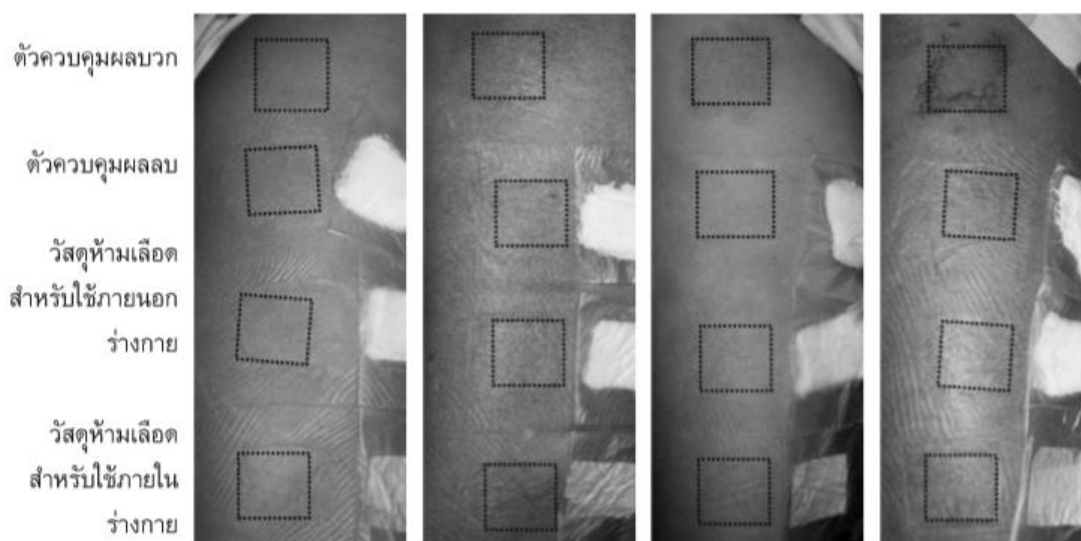
Carboxymethylchitosan

ภาพประกอบ 20 ภาพแสดงโครงสร้างทางเคมีของวัสดุอนุพันธ์ไคโตซาน

ที่มา : Janvikul et al.(2013). Clinical study of chitosan-derivative-based hemostat in the treatment of split-thickness donor site.

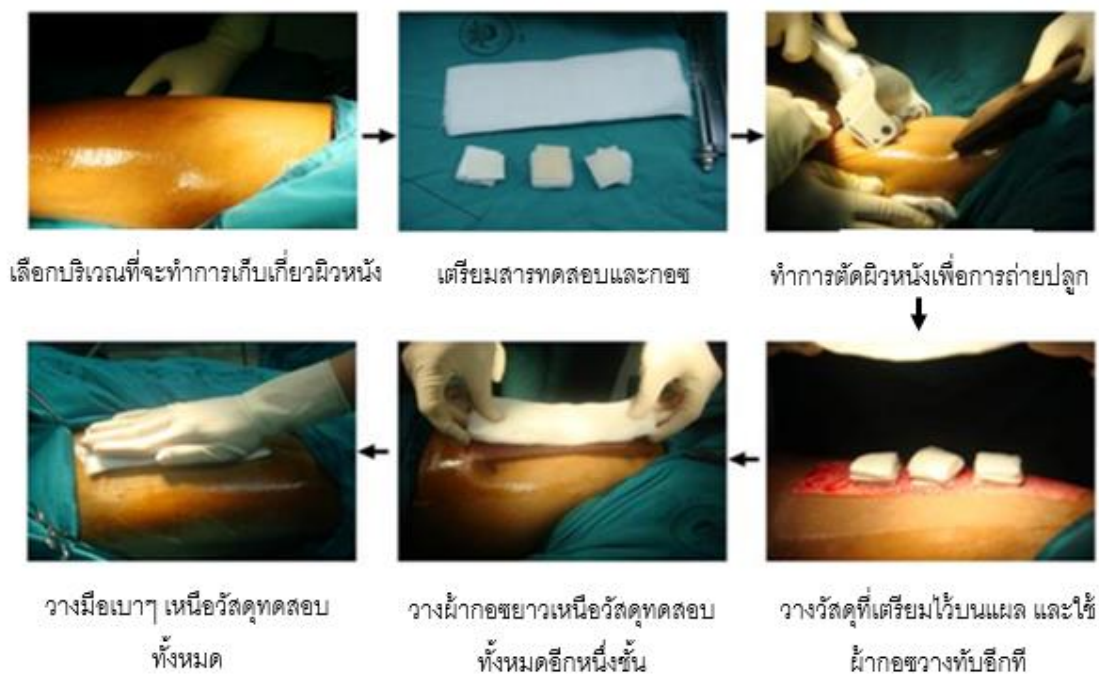


ภาพประกอบ 21 ภาพแสดงการทดสอบ การระคายเคืองและการแพ้ต่อผิวหนังของวัสดุทดสอบชนิดต่างๆ : (a) ผ้าก๊อชชนิดตัวควบคุมผลบวก (b) ผ้าก๊อชชนิดตัวควบคุมผลลบ (c) วัสดุห้ามเลือดสำหรับใช้ภายนอกร่างกาย และ (d) วัสดุห้ามเลือดสำหรับใช้ภายในร่างกาย

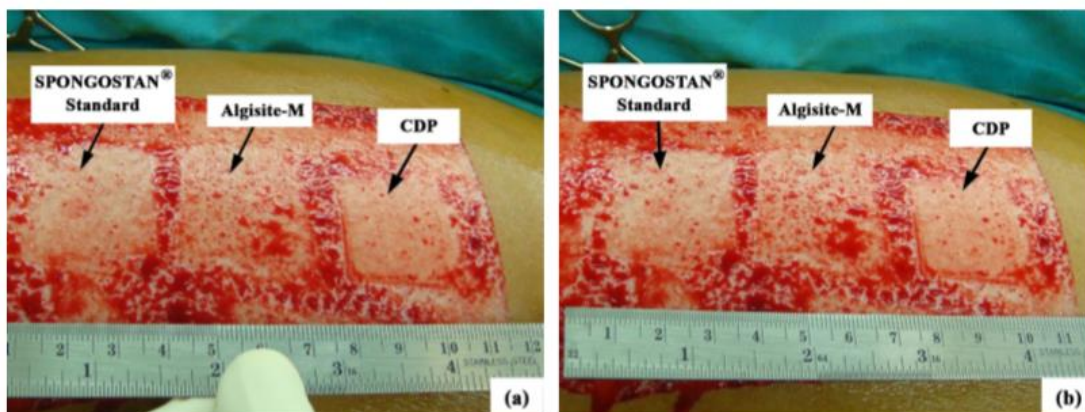


ภาพประกอบ 22 ภาพแสดงการตอบสนองของผิวหนังของอาสาสมัครต่อวัสดุทดสอบชนิดต่างๆ: ผ้าก๊อชชนิดตัวควบคุมผลบวก ผ้าก๊อชชนิดตัวควบคุมผลลบ วัสดุห้ามเลือดสำหรับใช้ภายนอกร่างกาย และวัสดุห้ามเลือดสำหรับใช้ภายในร่างกายที่เวลา 72 ชั่วโมง

ที่ม 1: Wongparami et al.(2011). Preliminary Clinical Trial Results on Human Irritation and Delayed-type Hypersensitivity Evaluation of Chitosan Derivative – based Hemostats.

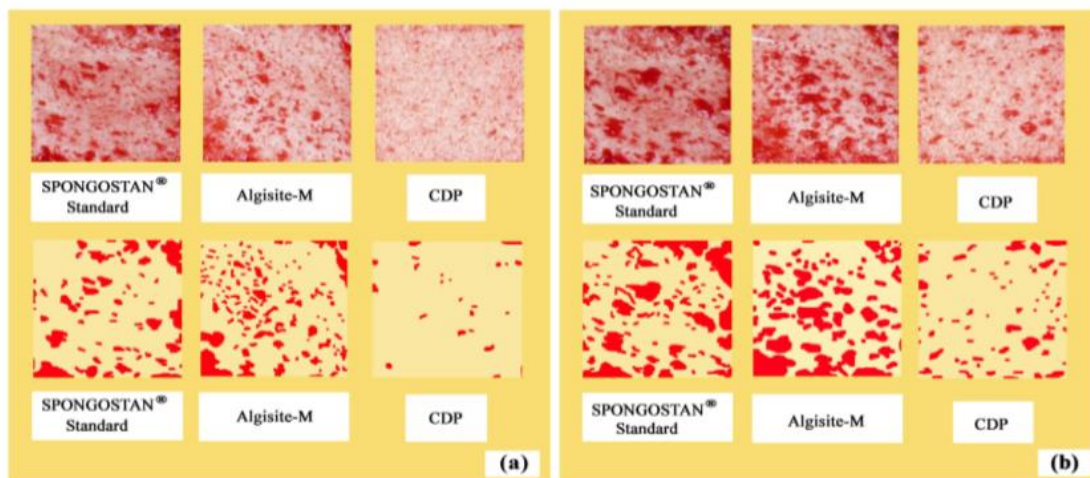


ภาพประกอบ 23 ภาพแสดงวิธีการทดสอบทางคลินิกเพื่อประเมินประสิทธิภาพการห้ามเลือดบนแผลผิวหนังตัดเพื่อการถ่ายปลูก



ภาพประกอบ 24 ภาพแสดงลักษณะแผลหลังจากรักษาด้วยวัสดุทดสอบแต่ละชนิด:

(a) ที่เวลา 8 นาที (b) ที่เวลา 8.5 นาที



ภาพประกอบ 25 ภาพแสดงภาพถ่ายบาดแผลและรูปวาดคัดลอกลักษณะบาดแผล สีแดง แทนตำแหน่งที่มีเลือดออก, สีเหลืองแทนตำแหน่งที่ไม่มีเลือดออก (a) ภาพบาดแผลที่เวลา 8 นาที (b) ภาพบาดแผลหลังเวลา 8 นาที ที่ 30 วินาที

ที่ม 1 : Janvikul et al.(2013). Clinical study of chitosan-derivative-based hemostat in the treatment of split-thickness donor site.

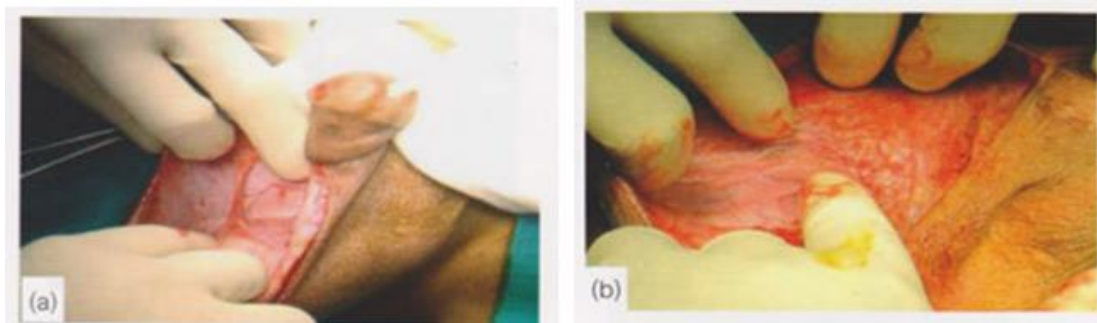


ภาพประกอบ 26 ภาพแสดงการผ่าตัดครั้งที่ 1 (พร้อมการฝังวัสดุทดสอบในร่างกาย)

ที่ม 1 : Surattanawanich et al.(2011). Preliminary Clinical Study on Resorbability of Chitosan Derivative-based Hemostat in Surgical treatment of Penile Paraphimoma.

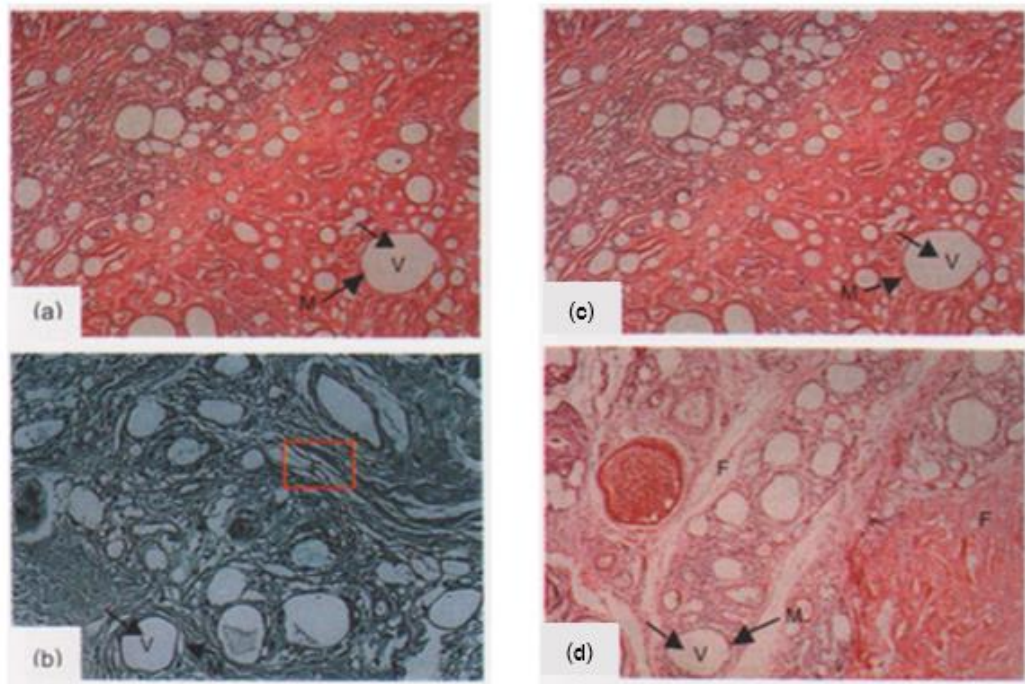


ภาพประกอบ 27 ภาพแสดงการผ่าตัดครั้งที่ 2 (พร้อมการประเมินประสิทธิภาพการสลายตัวของวัสดุทดสอบในร่างกายผู้ป่วย)



ภาพประกอบ 28 ภาพแสดงการประเมินประสิทธิภาพการสลายตัวของวัสดุห้ามเลือดหลังการฝังเป็นระยะเวลา 3 เดือนในผู้ป่วย (a) รายที่ 1 (b) รายที่ 2

ที่มา: Surattanawanich et al.(2011). Preliminary Clinical Study on Resorbability of Chitosan Derivative-based Hemostat in Surgical treatment of Penile Paraffinoma.



ภาพประกอบ 29 ภาพแสดงลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อผู้ป่วย (a) ชิ้นเนื้อก่อนการฝังวัสดุของผู้ป่วยรายที่ 1 (b) ชิ้นเนื้อหลังการฝังวัสดุของผู้ป่วยรายที่ 1 (c) ชิ้นเนื้อก่อนการฝังวัสดุของผู้ป่วยรายที่ 2 (d) ชิ้นเนื้อหลังการฝังวัสดุของผู้ป่วยรายที่ 2

ที่มา: Surattanawanich et al.(2011). Preliminary Clinical Study on Resorbability of Chitosan Derivative-based Hemostat in Surgical treatment of Penile Paraffinoma.

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

ในการวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยได้ดำเนินการตามขั้นตอนดังนี้

1. การกำหนดประชากรและการสุ่มกลุ่มตัวอย่าง
2. ขั้นตอนการทดลองที่ใช้ในการวิจัย
3. การเก็บรวบรวมข้อมูล
4. การจัดกระทำและการวิเคราะห์ข้อมูล

การกำหนดกลุ่มประชากรและการสุ่มกลุ่มตัวอย่าง

ประชากร

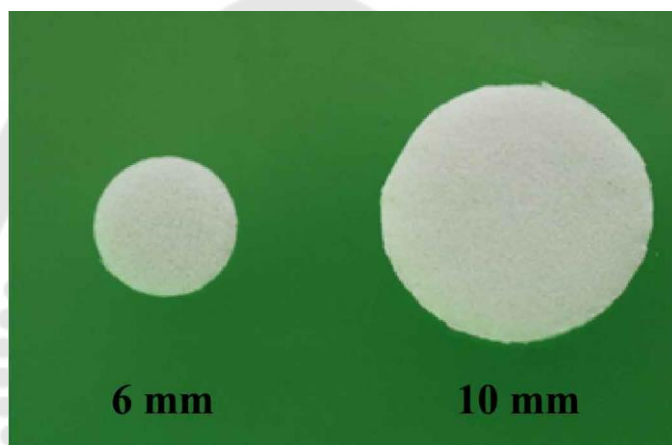
เซลล์สร้างกระดูกที่ผ่านการคัดแยกมาจากชิ้นกระดูก ซึ่งเก็บจากผู้ยินยอมตนที่มีสุขภาพแข็งแรง อายุมากกว่า 20 ปี ไม่จำกัดเพศ จำนวน 10 ราย ที่มารับบริการผ่าตัดขนาดเล็กในช่องปาก (minor surgery) เช่น ฟันคุด ฟันตัดแต่งปุ่มกระดูกส่วนเกินในขากรรไกร เป็นต้น โดยบริเวณที่ทำการผ่าตัดต้องปราศจากการอักเสบติดเชื้อ และเก็บไว้ในคลังเก็บเซลล์ ซึ่งได้รับการรับรองจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์มาแล้ว โดยในงานวิจัยจะทำการเลือกเซลล์สร้างกระดูกจากการสุ่ม 3-6 เซลล์ไลน์ (Cell line) และเลือกเซลล์ที่เพาะเลี้ยงได้ในรุ่นที่ 1-3 มาทำการทดลอง

ขั้นตอนการทดลองที่ใช้ในการวิจัย

1. การเตรียมวัสดุห้ามเลือดที่มีอนุพันธ์ไคโตซานเป็นองค์ประกอบ (CA/NOCC)

วัสดุห้ามเลือดที่มีอนุพันธ์ไคโตซานเป็นองค์ประกอบ (CA/NOCC) นั้นได้รับการอนุเคราะห์ผลิตโดยคณะผู้วิจัยจากศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ (เอ็มเทค) ซึ่งทำการเตรียมโดยการเทสารละลายผสม 2.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) ของคาร์บอกซีเมทิลไคโตซาน 0.5 กรัม และโซเดียมแอลจินेट 2.0 กรัม ในน้ำ 100 มิลลิลิตร (สัดส่วนโดยน้ำหนักของ CM-Chitosan/SA = 20/80) จากนั้นนำสารละลายของสารผสมที่ได้เทหล่อแบบลงในแม่แบบที่มีขนาด

เหมาะสมกับการนำไปใช้งาน แล้วสารละลายชนิดในแม่แบบที่ได้ไปแช่แข็งและทำให้แห้งด้วยเครื่องฟรีซ-ดรายเออร์ กลายเป็นแผ่นปุยคล้ายฟองน้ำ นำแผ่นวัสดุที่ได้มาจุ่มลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ (10%wt.) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้างสิ่งตกค้างในแผ่นวัสดุออกด้วยน้ำหลายๆ ครั้ง แล้วทำให้แห้งด้วยเครื่องฟรีซ-ดรายเออร์ นำแผ่นวัสดุไปตัดให้มีขนาดเหมาะสมที่กับชิ้นงานที่ต้องการใช้ (วงกลมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร และ 10 มิลลิเมตร หน้า 1 มิลลิเมตร) แล้วนำวัสดุบรรจุในซองฆ่าเชื้อและทำการฆ่าเชื้อโดยการอบด้วยแก๊สเอธิลีนออกไซด์ก่อนนำไปใช้ทดสอบกับเซลล์ต่อไป(29)



ภาพประกอบ 30 แสดงชิ้นงานวัสดุห้ามเลือดจากอนุพันธ์โคโคซาน (CANOCC) ที่นำมาทดสอบ

2.การเพาะเลี้ยงเซลล์สร้างกระดูก

ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์สร้างกระดูกจากกระดูก ในบริเวณพืนกรามซี่ที่ 3 ที่ปราศจาก ฟัน ผุ ซึ่งได้รับการผ่าตัดนำฟันออก และปุ่มกระดูกบริเวณขากรรไกรบนหรือล่างที่ได้รับการผ่าตัดนำออกก่อนรับการรักษาทางทันตกรรมประดิษฐ์ ในคณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ภายใต้ความยินยอมของผู้ป่วย จากนั้นนำชิ้นกระดูกที่ได้มาทำให้มีขนาดเล็กลง (1-2 มิลลิเมตร) แล้วล้างด้วย Phosphate buffered saline (PBS) 2 ครั้ง นำชิ้นกระดูกที่ได้มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ Advanced DMEM/F12 ที่เติม Penicillin 100 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และ Streptomycin 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (PEST), Amphotericin B 5 ไมโครกรัม, L-Glutamine 2 มิลลิโมลาร์ต่อมิลลิลิตร และ 10% Fetal bovine serum (FBS) ลงไป ทิ้งไว้เป็นเวลา 4 วัน ก่อนทำการเปลี่ยนสารตัวกลางครั้งแรก จากนั้นทำการเปลี่ยน สารตัวกลางสัปดาห์ละครั้ง(30, 31)

3. การทดสอบความเป็นพิษของวัสดุ CA/NOCC ต่อเซลล์ตามมาตรฐานของ ISO

10993-5

3.1 Direct contact ใช้ในการทดสอบความสามารถในการเพิ่มจำนวนของเซลล์ (Cell proliferation) และการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) ซึ่งมีวิธีการทดสอบโดยการวางวัสดุทดสอบ CA/NOCC ให้สัมผัสกับเซลล์สร้างกระดูกในกลุ่มทดสอบโดยตรง

3.2 CA/NOCC extract ใช้ในการทดสอบระดับปฏิกิริยาอัลคาไลน์ ฟอสฟาเตส (Alkaline phosphatase assay) และการทดสอบการสะสมแร่ธาตุในชั้นแมทริกซ์ระหว่างเซลล์ (Matrix mineralization assay) โดยเป็นการทดสอบความเป็นพิษของวัสดุ CA/NOCC ต่อเซลล์สร้างกระดูกในกลุ่มทดสอบแบบ indirect contact มีวิธีการเตรียมสารทดสอบคือ นำวัสดุทดสอบ CA/NOCC แच्छ่งในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM/F12/10% FBS ในหลอดขนาด 15 มิลลิลิตร โดยใช้อัตราส่วนในการแช่คือ วัสดุทดสอบ CA/NOCC ขนาด 6 มิลลิเมตร หนา 1 มิลลิเมตร 1 ชิ้น : DMEM/F12/10% FBS 1,000 ไมโครลิตร (สำหรับการทดสอบระดับปฏิกิริยาอัลคาไลน์ ฟอสฟาเตส) หรือ วัสดุทดสอบ CA/NOCC ขนาด 10 มิลลิเมตร หนา 1 มิลลิเมตร 1 ชิ้น : DMEM/F12/10% FBS 2,000 ไมโครลิตร (สำหรับการทดสอบการสะสมแร่ธาตุในชั้นแมทริกซ์ระหว่างเซลล์) โดยเริ่มแช่วัสดุทดสอบในวันเดียวกับวันที่ทำการหว่านเซลล์เริ่มการทดลอง จากนั้นนำหลอด CA/NOCC extract ที่เตรียมข้างต้นเข้าสู่ตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในคาร์บอนไดออกไซด์ 5% และเมื่อถึงกำหนดเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ของการทดลองในกลุ่มทดสอบ ให้นำเฉพาะอาหารเลี้ยงเซลล์ในหลอด CA/NOCC extract ย้ายมาใส่หลอดใหม่ แล้วนำเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 20,000 x g เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกเศษตะกอนวัสดุ CA/NOCC ออกมา นำของเหลวส่วนที่ลอยอยู่เหนือตะกอนออกมาใส่หลอดใหม่ จากนั้นนำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปใช้เลี้ยงเซลล์ในกลุ่มทดสอบในลำดับถัดไป สำหรับหลอด CA/NOCC extract เดิมที่ยังคงมีวัสดุ CA/NOCC ตั้งต้นอยู่ ให้เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ลงไปให้เท่ากับปริมาณอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ถูกนำออกมาใช้ แล้วนำเข้าตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ต่อ รอจนถึงรอบเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ครั้งถัดไปจึงนำออกมาใช้ตามวิธีการที่ได้กล่าวไปข้างต้น

4. การทดสอบความสามารถในการเพิ่มจำนวนของเซลล์ (Cell Proliferation)

วางวัสดุทดสอบ CA/NOCC ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร หน้า 1 มิลลิเมตร ลงบนจานเลี้ยงเซลล์ชนิด 24 หลุม และเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ 1,000 ไมโครลิตร นำจานเลี้ยงเซลล์เข้าสู่ตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการแยกเซลล์สร้างกระดูกเป็นเซลล์เดี่ยวๆ โดยใช้ 0.25% Trypsin-EDTA และหว่านลงบนวัสดุทดสอบ CA/NOCC จำนวน 2×10^4 เซลล์ใน DMEM/F12/10% FBS 1,000 ไมโครลิตร (โดยกำหนดให้หลุมที่มีเฉพาะเซลล์สร้างกระดูกเป็นกลุ่มควบคุม) และแต่ละกลุ่มทดลองจะมีการทำซ้ำ 3 หลุมต่อกลุ่ม นำจานเลี้ยงเซลล์เข้าสู่ตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลาอีก 24 ชั่วโมง (ทำการทดลอง 3 ชุด สำหรับทดสอบในวันที่ 1, 3 และ 6) หลังจากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกให้หมด แล้วล้างด้วย PBS หลุมละ 1,000 ไมโครลิตร ทำการวัดความมีชีวิตของเซลล์ด้วยการทดสอบเอ็มทีที (MTT assay, [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromide]) โดยละลายผงเอ็มทีที ใน PBS ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วนำสารละลายเอ็มทีที ไปผสมกับ DMEM/F12 ที่ไม่มีซีรัม ในอัตราส่วน 50:500 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปเติมลงในหลุมเลี้ยงเซลล์ หลุมละ 550 ไมโครลิตร โดยในหลุมเลี้ยงเซลล์กลุ่มทดสอบจะมีการนำวัสดุ CA/NOCC ยกออกไปวางไว้ในหลุมเลี้ยงเซลล์ที่ว่างก่อนพร้อมกับการทดสอบ MTT ในวัสดุ CA/NOCC ที่ยกออกนี้ด้วย แล้วนำไปเข้าสู่ตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 นาที หลังจากนั้นดูดสารละลายดังกล่าวออกจากหลุม เติม Dimethyl sulfoxide (DMSO) ลงไปแทนในแต่ละหลุม หลุมละ 500 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที เพื่อละลายผลึก Formazan แล้ววัดปริมาณการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร เพื่อประเมินปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต โดยใช้เครื่อง Asys UVM340 Microplate reader และคำนวณเป็นร้อยละ โดยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ทำการทดสอบเช่นเดียวกันกับชุดการทดลองของวันที่ 3 และ 6(32)

5. การศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope)

วางวัสดุทดสอบ CA/NOCC ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 10 มิลลิเมตร หน้า 1 มิลลิเมตร บนแผ่นกระจกกั้นใส (Cover slip) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 13 มิลลิเมตร ในจานเลี้ยงชนิด 24 หลุม จากนั้นทำการแยกเซลล์สร้างกระดูกเป็นเซลล์เดี่ยวๆ โดยใช้ 0.25% Trypsin-EDTA และหว่านเซลล์ลงบนวัสดุทดสอบ CA/NOCC จำนวน 6×10^4 เซลล์ใน DMEM/F12/10%FBS 1,000 ไมโครลิตร นำ

งานเลี้ยงเซลล์เข้าสู่ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลาอีก 72 ชั่วโมง (กำหนดให้งานเลี้ยงเซลล์ที่มีเฉพาะเซลล์สร้างกระดูกเป็นกลุ่มควบคุม) จากนั้นทำการยึด (Primary Fixation) เซลล์บนพื้นผิวของแผ่นกระจกนั้นใสด้วยกลูตารัลดีไฮด์ ร้อยละ 2.5 (2.5% glutaraldehyde) ในน้ำกลั่น ทิ้งไว้ 4 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง แล้วล้างด้วย PBS เป็นระยะเวลา 10 นาที จากนั้นทำให้เกิดคายน้ำ (Dehydration) ด้วยเอทานอล ที่ความเข้มข้นร้อยละ 25 50 70 และ 100 ขึ้นตอนละ 10 นาที ตามลำดับ แล้วทำให้แห้งด้วยสารเคมีเฮกซะเมทิลไดไซลาเซน (Hexamethyldisilazane: HDMS) โดยทำการเติมสารเคมีให้พอท่วมชิ้นงาน แะทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อตัวอย่างทดสอบแห้งแล้ว ให้นำไปทำการเคลือบทองด้วยเครื่องเคลือบระบบอัตโนมัติ (Auto fine coater) จากนั้นนำไปทำการวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด และทำการบันทึกข้อมูลรูปร่างของเซลล์เพื่อดูถึงควมมีชีวิตและการตอบสนองของเซลล์ต่อวัสดุทดสอบที่เกิดขึ้น(32)

6. การทดสอบระดับปฏิกิริยาอัลคาไลน์ ฟอสฟาเตส (Alkaline phosphatase assay)

ทำการแยกเซลล์สร้างกระดูกเป็นเซลล์เดี่ยวๆ โดยใช้ 0.25% Trypsin-EDTA และหว่านลงบนงานเลี้ยงเซลล์ จำนวน 10^4 เซลล์ใน DMEM/F12/10% FBS 1,000 ไมโครลิตร (โดยกำหนดให้หลุมที่เลี้ยงเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ได้จากการสกัดเป็นกลุ่มทดสอบ) และแต่ละกลุ่มทดลองจะมีการทำซ้ำ 3 หลุมต่อกลุ่ม นำงานเลี้ยงเซลล์เข้าสู่ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ในหลุมทดสอบให้เป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ได้จากการสกัดที่เตรียมไว้ตามวิธีข้อ 3.2 (CA/NOCC extract) เพาะเลี้ยงเซลล์จนเซลล์โตเต็มที่ จากนั้นทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นสารละลายตัวกลาง osteogenic medium ซึ่งบรรจุ ascorbic acid 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร, β - glycerophosphate 2 มิลลิโมลาร์ และ dexamethasone 10 นาโนโมลาร์ ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ต่อจนถึงวันที่ 4, 8 และ 14 จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกให้หมด ล้างเซลล์ด้วย PBS 1 ครั้ง แล้วใส่ Pierce IP lysis buffer ลงในงานเลี้ยงเซลล์หลุมละ 200 ไมโครลิตร นำงานเลี้ยงเซลล์เข้าสู่ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 5 นาที แล้วย้ายเซลล์ไปยังหลอดไมโครเซนทริฟิวก์ นำเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว $13,000 \times g$ เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกก้อนเศษเซลล์ (cell debris) ออกมานำของเหลวส่วนที่ลอยอยู่นือตะกอน (cell

lysate) ออกมาใส่หลอดใหม่ แล้วนำไปวิเคราะห์ความเข้มข้นของโปรตีนและปฏิกิริยา p-nitrophenol ในขั้นต่อไป(30, 31, 33)

ทำการวัดปริมาณความเข้มข้นของโปรตีนที่เกิดขึ้นทั้งหมดโดยนำ cell lysate ที่เตรียมไว้จำนวน 25 ไมโครลิตร ผสมกับ working reagent ของ microBCA protein assay kit (μ BCA, Thermo Scientific, Lite Technologies, ref.n.23235) จำนวน 25 ไมโครลิตร ใส่ลงในจานเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม นำจานเลี้ยงเซลล์เข้าสู่อบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำออกมาทำให้อุณหภูมิต่ำลงโดยการทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้อง ก่อนนำไปวัดปริมาณการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง Asys UVM340 Microplate reader(33)

ทำการวัดปฏิกิริยา p-nitrophenol ที่เกิดขึ้นโดยนำ cell lysate ที่เตรียมไว้จำนวน 25 ไมโครลิตร ผสมกับ ALP yellow reagent (Sigma Aldrich, ref. n. P7998) จำนวน 50 ไมโครลิตร ใส่ลงในจานเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม จากนั้นทำการป้องกันเซลล์จากแสงโดยการห่อจานเลี้ยงเซลล์ด้วยอะลูมิเนียมฟอยล์ ทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที แล้วทำการหยุดปฏิกิริยาโดยการเติม NaOH 3 โมลาร์ ลงไปจำนวน 50 ไมโครลิตร ทำการวัด p-nitrophenol ที่เกิดขึ้นโดยการวัดปริมาณการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง Asys UVM340 Microplate reader(33)

7.การทดสอบการสะสมแร่ธาตุในแมทริกซ์ระหว่างเซลล์ (Matrix mineralization assay)

ทำการแยกเซลล์สร้างกระดูกเป็นเซลล์เดี่ยวๆ โดยใช้ 0.25% Trypsin-EDTA และหว่านลงบนจานเลี้ยงเซลล์ขนาด 35 มิลลิเมตร จำนวน 2×10^5 เซลล์ใน DMEM/F12/10%FBS 2,000 ไมโครลิตร (โดยกำหนดให้หลุมที่เลี้ยงเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ได้จากการสกัดเป็นกลุ่มทดสอบ) นำจานเลี้ยงเซลล์เข้าสู่อบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ในหลุมทดสอบให้เป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ได้จากการสกัดที่เตรียมไว้ตามวิธีข้อ 3.2 (CA/NOCC extract) เพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 1 สัปดาห์ จากนั้นเปลี่ยนสารละลายตัวกลางเป็น osteogenic medium ซึ่งบรรจุ ascorbic acid 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร, β - glycerophosphate 2 มิลลิโมลาร์ และ dexamethasone 10 นาโนโมลาร์ แล้วทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ต่อไปจนถึงสัปดาห์ที่ 4 โดยในวันสุดท้ายของแต่ละสัปดาห์ให้นำ ชั้นแมทริกซ์ที่เซลล์สร้างมา

ล้างด้วย PBS แล้วทำการตรึงด้วย 100% methanol จากนั้นทำการย้อมด้วย 1% Alizarin Red S (Sigma-Aldrich) ซึ่งจะจับกับแคลเซียมที่สะสมอยู่ภายนอกเซลล์ ทำการประเมินอัตราการสะสมของแร่ธาตุ ทำการเปรียบเทียบอัตราการสะสมแร่ธาตุของกลุ่มทดสอบและกลุ่มควบคุมในสัปดาห์ที่ 1, 2, 3 และ 4(9, 31)

การวัดอัตราการสะสมแร่ธาตุในชั้นเมทริกซ์ระหว่างเซลล์เชิงปริมาณ ทำการทดสอบโดยนำตัวอย่างที่ได้จากการย้อมสี Alizarin Red S ข้างต้น มาแช่ในสารละลาย 10% acetic acid ปริมาณ 800 ไมโครลิตร เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อให้ชั้นโมโนเลเยอร์ของเซลล์หลุดลอกออกจากจานเลี้ยงเซลล์ จากนั้นนำชั้นโมโนเลเยอร์ของเซลล์และสารละลายข้างต้นย้ายไปไว้ในหลอด Eppendorf ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ทำการซีลปากหลอดด้วยพาราฟิน แล้วนำหลอดไปปั่นเพื่อให้ส่วนประกอบของสารในหลอดเข้ากันเป็นเวลา 30 วินาที ด้วยเครื่อง Vortex ต่อมานำหลอด Eppendorf ของสารตัวอย่างไปอุ่นที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และนำไปแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที ตามลำดับ แล้วนำเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 20,000 x g เป็นเวลา 15 นาที เพื่อแยกเอาชั้นตะกอนออกมา แล้วทำการนำของเหลวที่ลอยอยู่ด้านบนปริมาณ 500 ไมโครลิตร ย้ายไปไว้ในหลอดใหม่ เติมสารละลาย 10% ammonium hydroxide ปริมาณ 200 ไมโครลิตรลงไป เพื่อปรับสมดุล pH สารละลายในหลอด (pH 4.1 – 4.5) จากนั้นทำการดูดสารละลายตัวอย่างปริมาณ 150 ไมโครลิตร ลงในจานเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม ทำซ้ำตัวอย่างละ 3 หลุม ทำการวัดค่าความเข้มสี Alizarin red S ที่สกัดได้ โดยการวัดปริมาณการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง Asys UVM340 Microplate reader นำค่าที่อ่านได้มาวิเคราะห์ทางสถิติ เพื่อทำการเปรียบเทียบอัตราการสะสมแร่ธาตุของกลุ่มทดสอบและกลุ่มควบคุมในสัปดาห์ที่ 1, 2, 3 และ 4

การเก็บรวบรวมข้อมูล

1. ประเมินการเพิ่มจำนวนของเซลล์สร้างกระดูก จากปริมาณการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร ในการทดสอบเอ็มทีที (MTT assay)
2. ประเมินรูปร่างลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์สร้างกระดูก จากการวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)
3. ประเมินการเพิ่มจำนวนของเซลล์สร้างกระดูกจากการทดสอบระดับปฏิกิริยาของอัลคาไลน์ฟอสฟาเตส (Alkaline phosphatase assay)
4. ประเมินอัตราการสะสมแร่ธาตุในแมทริกซ์ระหว่างเซลล์ จากการทดสอบการสะสมแร่ธาตุในแมทริกซ์ระหว่างเซลล์ (Matrix mineralization assay)

สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

ทำการทดลองซ้ำอย่างน้อย 3 ครั้ง เพื่อแสดงถึงความสามารถในการทำซ้ำได้ (Reproducibility) และความถูกต้องในการแปลผลการทดลอง โดยใช้โปรแกรม GraphPad Prism 8 ในการวิเคราะห์ข้อมูล ใช้ Mann-Whitney test เปรียบเทียบค่าเฉลี่ย (Mean) ระหว่างกลุ่มทดลองกับกลุ่มควบคุม ในการทดสอบความสามารถในการเพิ่มจำนวนของเซลล์และการทดสอบการสะสมแร่ธาตุในแมทริกซ์ระหว่างเซลล์ และใช้ Kruskal-Wallis test เปรียบเทียบค่าเฉลี่ย (Mean) ระหว่างกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุมในการทดสอบระดับปฏิกิริยาของอัลคาไลน์ฟอสฟาเตส ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยแสดงค่าความคลาดเคลื่อนของข้อมูลด้วย standard error of mean (SEM)

บทที่ 4

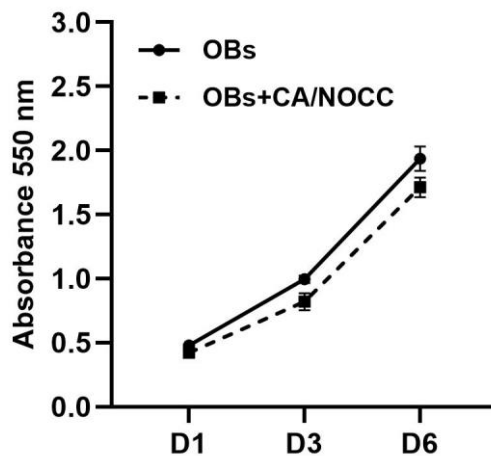
ผลการดำเนินงานวิจัย

จากการวิจัยเพื่อทดสอบความเป็นพิษของวัสดุห้ามเลือดจากอนุพันธ์โคโคซานต่อเซลล์สร้างกระดูก (Osteoblast) ผู้วิจัยได้ดำเนินการวิจัยโดยทำการศึกษาทดสอบตามขั้นตอนต่างๆ ดังที่ได้กล่าวไว้ข้างต้น เพื่อให้สอดคล้องไปตามวัตถุประสงค์และกรอบแนวคิดการวิจัยที่ได้กำหนดไว้ ดังนี้

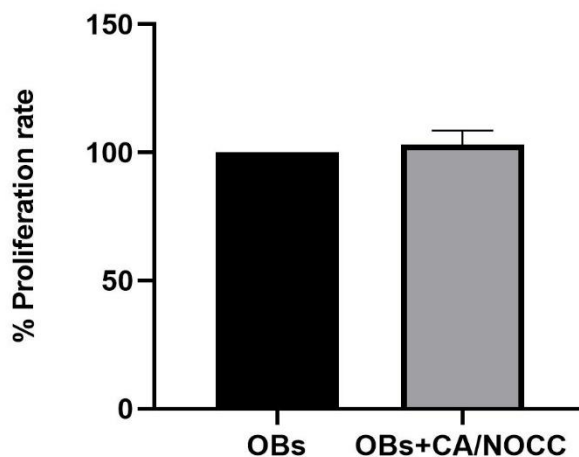
1. การแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์สร้างกระดูก
2. การแสดงออกของลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์สร้างกระดูก
3. การแสดงออกของอัลคาไลน์ ฟอสฟาเตส
4. การสะสมแคลเซียมภายนอกเซลล์จากการเกิดการสะสมแร่ธาตุของเซลล์สร้าง-
กระดูก

การแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์สร้างกระดูก (Cell proliferation)

จากการทดสอบความสามารถในการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์สร้างกระดูก (Osteoblast) โดยใช้การทดสอบเอ็มทีที เพื่อประเมินปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตในวันที่ 1, 3 และ 6 จากการทดลองจำนวน 5 ชุด โดยใช้เซลล์สร้างกระดูกที่เพาะเลี้ยงได้ในรุ่นที่ 1 – 3 พบว่า เซลล์สร้างกระดูกทั้งในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบมีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนมากขึ้นเมื่อเวลาผ่านไปดังแสดงในภาพประกอบ 31 โดยเมื่อนำผลการทดสอบมาวิเคราะห์คำนวณหาค่า %control เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบที่ทำการทดสอบด้วยวัสดุทดสอบ CA/NOCC พบว่ามีค่าเท่ากับ 100 และ 103.12 ตามลำดับ และมีค่า P-value เท่ากับ 0.8125 แสดงว่าความสามารถในการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์สร้างกระดูกระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบไม่แตกต่างกัน ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ดังแสดงในภาพประกอบ 32



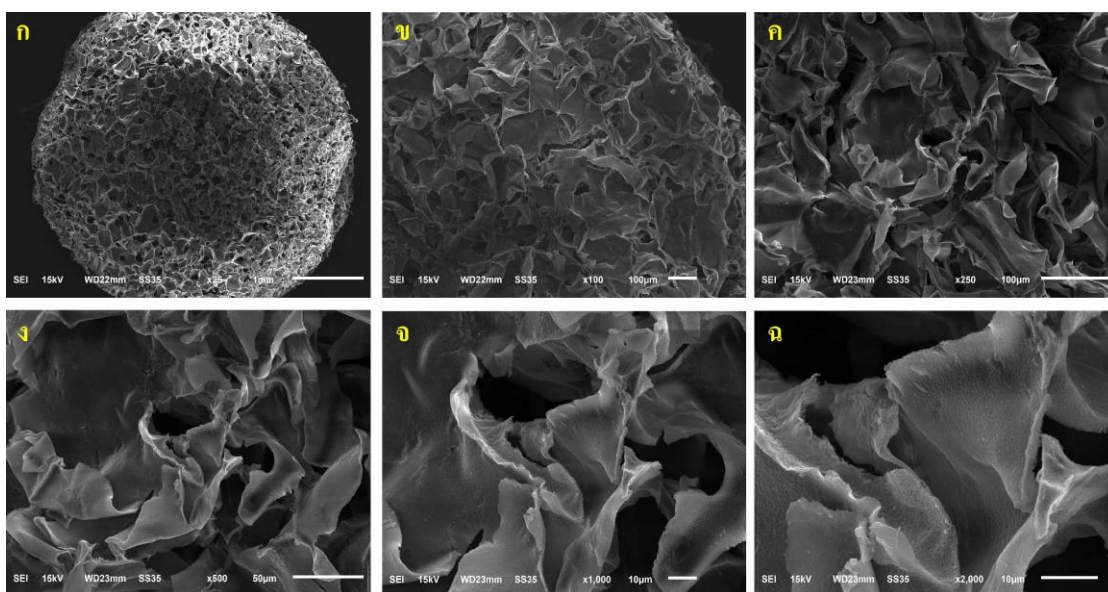
ภาพประกอบ 31 กราฟเส้นแสดงความสามารถในการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์สร้างกระดูก ระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบ CA/NOCC ในวันที่ 1, 3 และ 6 แสดงภาพกราฟตัวแทนจากการทดสอบ 1 ชุดการทดลอง, error bar แสดง standard error of mean (SEM)



ภาพประกอบ 32 กราฟแท่งแสดงอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์สร้างกระดูกระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบ CA/NOCC จากการทดสอบ 5 ชุดการทดลอง (แสดงความสัมพันธ์เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม คิดเป็น %control ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, , error bar แสดง standard error of mean (SEM)

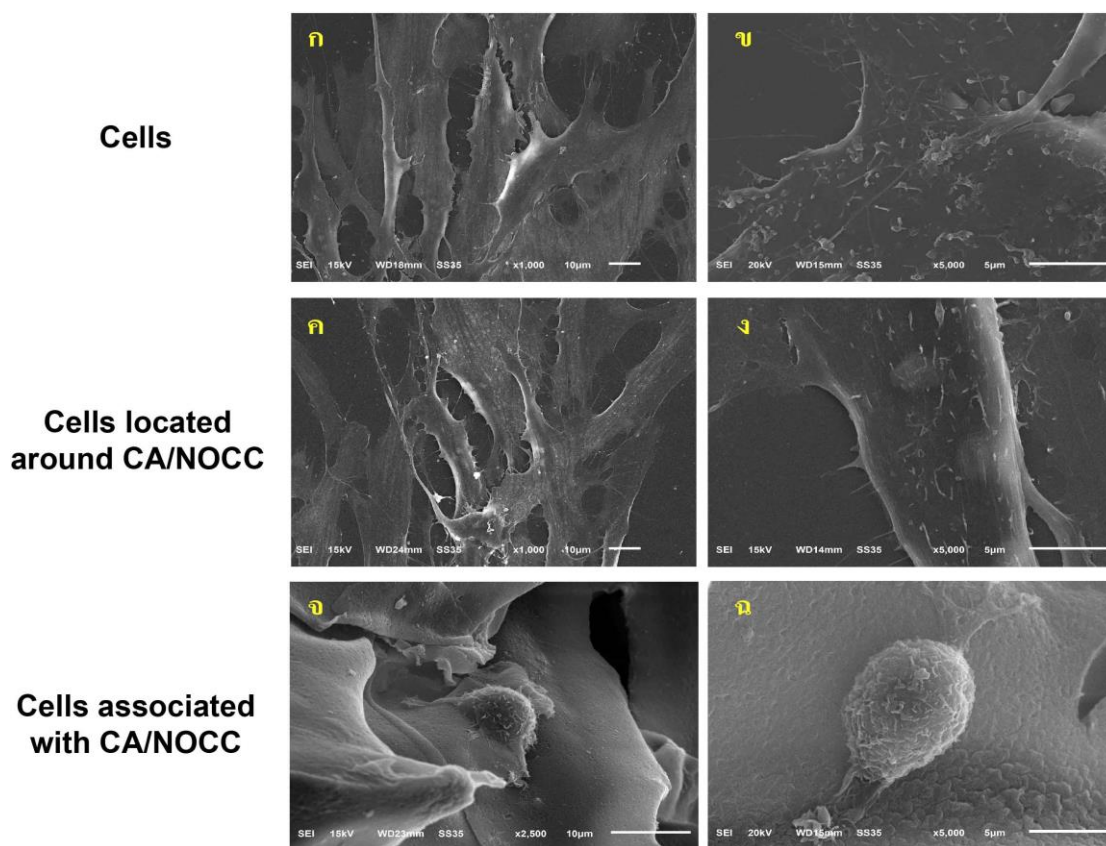
การแสดงผลของลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์สร้างกระดูก

เพื่อศึกษาลักษณะการตอบสนองของเซลล์สร้างกระดูกต่อวัสดุทดสอบ CA/NOCC ทางคณะผู้วิจัยจึงใช้วิธีการส่องกล้องแบบ SEM ในการสังเกตผลของวัสดุทดสอบ CA/NOCC ที่แสดงต่อลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์สร้างกระดูก จากภาพ SEM พบว่าวัสดุทดสอบมีลักษณะเป็นฟองน้ำที่มีรูพรุนขนาดเล็กจำนวนมาก ดังแสดงในภาพประกอบ 33



ภาพประกอบ 33 ภาพ SEM แสดงลักษณะสารทดสอบ Calcium Alginate/*N,O*-carboxymethylchitosan (CA/NOCC) ที่กำลังขยาย x25, x100, x250, x500, x1,000 และ x2,000 ตามลำดับ

หลังจากทำการเพาะเลี้ยงเซลล์สร้างกระดูกเป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่า เซลล์ส่วนใหญ่มีการกระจายตัวยึดเกาะอยู่บนแผ่นกระจกกั้นใน cover slip มากกว่าที่ยึดเกาะอยู่บนสารทดสอบ CA/NOCC และเมื่อสังเกตลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์สร้างกระดูกในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบ (เซลล์ที่ยึดเกาะอยู่รอบๆ สารทดสอบ CA/NOCC) พบว่า เซลล์มีลักษณะไม่แตกต่างกัน คือ เซลล์ส่วนใหญ่มีลักษณะยึดยาว รูปร่างทรงกระสวย ผิวค่อนข้างเรียบและแผ่ออก ดังแสดงในภาพประกอบ 34 (ก, ข แสดงลักษณะเซลล์สร้างกระดูกในกลุ่มควบคุม, และ ค, ง แสดงลักษณะเซลล์สร้างกระดูกที่ยึดเกาะรอบๆ สารทดสอบ CA/NOCC) ในขณะที่เซลล์สร้างกระดูกในกลุ่มทดสอบที่ยึดเกาะอยู่บนสารทดสอบ CA/NOCC มีลักษณะที่แตกต่างออกไป คือเซลล์มีลักษณะรูปร่างค่อนข้างกลมและมีริ้วขาค้นขนาดเล็กที่ยึดออกมายึดเกาะกับผิวของสารทดสอบ CA/NOCC ดังแสดงในภาพประกอบ 34จ และ ฉ



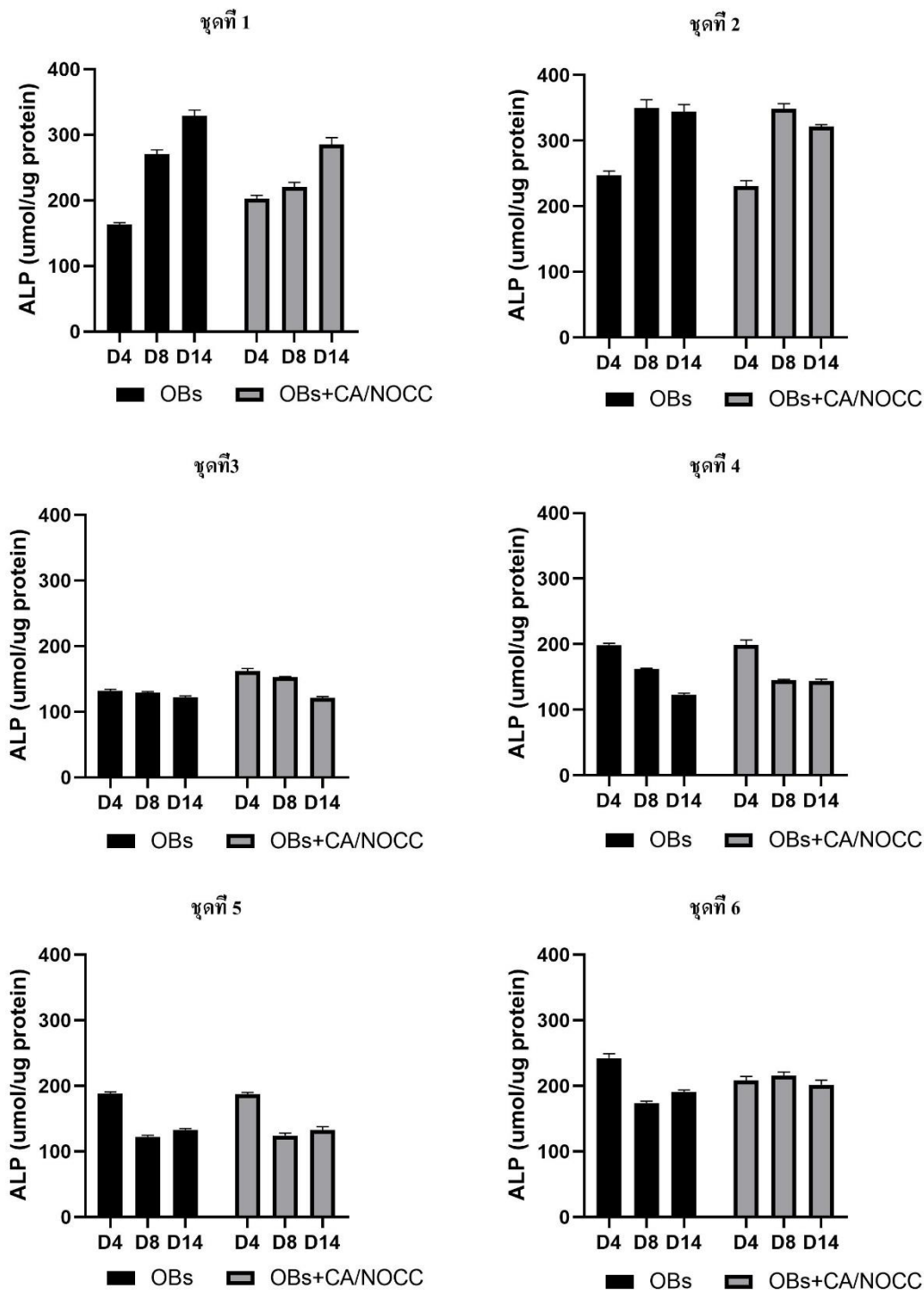
ภาพประกอบ 34 ภาพ SEM แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์สร้างกระดูก; ก และ ข แสดงลักษณะของเซลล์สร้างกระดูกในกลุ่มควบคุม ที่กำลังขยาย $\times 1,000$ และ $\times 5,000$ ตามลำดับ, ค และ ง แสดงลักษณะของเซลล์สร้างกระดูกที่ยึดเกาะอยู่รอบๆ วัสดุทดสอบ CA/NOCC กำลังขยาย $\times 1,000$ และ $\times 5,000$ ตามลำดับ, จ และ ฉ แสดงลักษณะของเซลล์สร้างกระดูกที่ยึดเกาะอยู่บน วัสดุทดสอบ CA/NOCC ที่กำลังขยาย $\times 2,500$ และ $\times 5,000$ ตามลำดับ

การแสดงผลของอัลคาไลน์ ฟอสฟาเตส (ALP activity)

เพื่อศึกษาผลของวัสดุทดสอบ CA/NOCC ต่อการทำหน้าที่ของเซลล์สร้างกระดูก ทางคณะผู้วิจัย จึงทำการทดสอบหาระดับปฏิกิริยาอัลคาไลน์ ฟอสฟาเตส ที่เกิดขึ้นของเซลล์สร้างกระดูกที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสารสกัดจากวัสดุทดสอบ CA/NOCC (กลุ่มทดสอบ) เทียบกับ เซลล์สร้างกระดูกที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ปกติ (กลุ่มควบคุม) โดยจากผลการศึกษาของเรา พบว่ารูปแบบของระดับปฏิกิริยาอัลคาไลน์ ฟอสฟาเตส ที่เกิดขึ้นของเซลล์สร้างกระดูกทั้งในกลุ่มทดสอบและกลุ่มควบคุมจาก 6 ชุดการทดลองมี 2 ลักษณะคือ เพิ่มขึ้นตามระยะเวลา และลดลงตามระยะเวลา โดยรูปแบบทั้งหมดจากทุกชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างกันระหว่างกลุ่มทดสอบและกลุ่มควบคุม ดังแสดงในภาพประกอบ 35

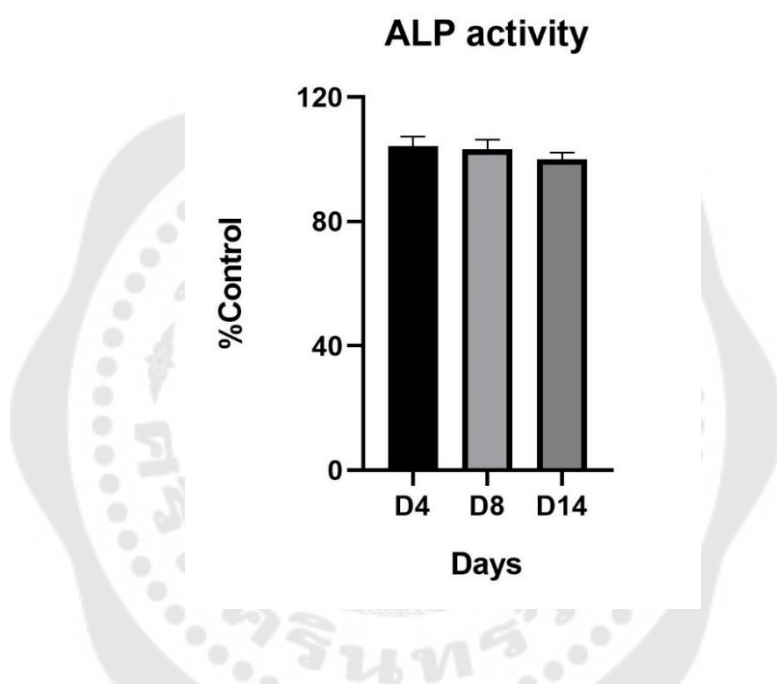


ALP activity



ภาพประกอบ 35 ภาพกราฟแท่งแสดงแนวโน้มปฏิกิริยาอัลคาไลน์ ฟอสฟาเตส (ALP activity) ระหว่างกลุ่มทดสอบและกลุ่มควบคุมจาก 6 ชุดการทดลอง, error bar แสดง standard error of mean (SEM)

และเมื่อนำผลการทดสอบข้างต้นมาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์คิดเป็น %control ต่อกลุ่มควบคุมในแต่ละช่วงเวลา (วันที่ 4, 8 และ 14) พบว่า ปรากฏริยาอัลคาไลน์ ฟอสฟาเตส ของกลุ่มทดสอบเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมมีค่าเท่ากับ 104.177, 103.164 และ 100.014 ในวันที่ 4, 8 และ 14 ตามลำดับ มีค่า P-value เท่ากับ 0.4899 หมายความว่าในแต่ละช่วงเวลาระดับปรากฏริยาอัลคาไลน์ ฟอสฟาเตสระหว่างกลุ่มทดสอบและกลุ่มควบคุมไม่แตกต่างกัน ดังแสดงในกราฟแท่งตามภาพประกอบ 36




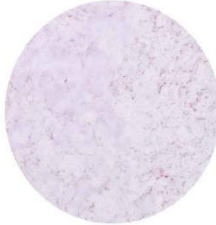



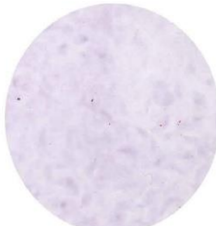


ภาพประกอบ 36 ภาพกราฟแท่งแสดงปรากฏริยาอัลคาไลน์ ฟอสฟาเตส (ALP activity) ของกลุ่มทดสอบเทียบกับกลุ่มควบคุมในวันที่ 4, 8 และ 14 จากการทดสอบ 6 ชุดการทดลอง โดยหาความสัมพันธ์เทียบกับกลุ่มควบคุมคิดเป็น %control ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, error bar แสดง standard error of mean (SEM)

การสะสมแคลเซียมภายนอกเซลล์จากการเกิดการสะสมแร่ธาตุของเซลล์สร้างกระดูก

เพื่อศึกษาผลของวัสดุทดสอบ CA/NOCC ต่อการทำหน้าที่ของเซลล์สร้างกระดูก ทางคณะผู้วิจัย จึงทำการทดสอบหาระดับแคลเซียมภายนอกเซลล์ที่เซลล์สร้างกระดูกสร้างขึ้น จากวิธีการทดสอบ การสะสมแร่ธาตุในแมทริกซ์ระหว่างเซลล์ (Matrix mineralization assay) โดยการเก็บภาพและวัด ปริมาณสีของ Alizarin red ที่ย้อมติดในเซลล์สร้างกระดูกที่ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 28 วัน ทั้งใน เซลล์สร้างกระดูกกลุ่มควบคุมที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ปกติและในเซลล์สร้างกระดูกกลุ่ม ทดสอบที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสารสกัดจากวัสดุทดสอบ CA/NOCC โดยทำการเก็บผล การทดลองทุกสัปดาห์ที่ 1, 2, 3 และ 4 จากผลการทดสอบพบว่าในทุกช่วงสัปดาห์ที่เพิ่มขึ้นระดับสี ของ Alizarin red เพิ่มขึ้นตามลำดับ แต่ยังไม่พบการสะสมของก้อนแคลเซียม (Calcium nodules) ที่ ชัดเจนเกิดขึ้น ทั้งในกลุ่มทดสอบและกลุ่มควบคุม ดังแสดงในภาพประกอบ 37 และเมื่อนำตัวอย่าง ที่เก็บได้มาสกัดเพื่อหาปริมาณของระดับแคลเซียมที่เกิดขึ้น แล้วนำมาวิเคราะห์ผลทางสถิติพบว่า ระดับแร่ธาตุที่เซลล์สร้างกระดูกสร้างขึ้นระหว่างกลุ่มทดสอบและกลุ่มควบคุมไม่แตกต่างกัน จาก การหาความสัมพันธ์ของกลุ่มทดสอบเทียบกับกลุ่มควบคุม ที่สัปดาห์ที่ 4 เทียบกับสัปดาห์ที่ 1 โดย หาค่าได้เท่ากับ 107.675% ในกลุ่มทดสอบ และ 100% ในกลุ่มควบคุม ที่ค่า P value เท่ากับ 0.3143 ดังแสดงผลตามภาพประกอบ 38

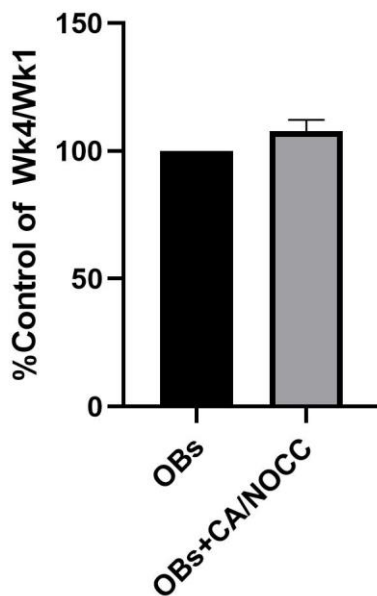
Mineralization assay : Alizarin Red staining

	Wk 1	Wk 2	Wk 3	Wk 4
OBs				
OBs + CA/NOCC				

ภาพประกอบ 37 ภาพสีย้อม Alizarin red แสดงระดับแร่ธาตุที่เซลล์สร้างกระดูกสร้างขึ้นของ เซลล์ สร้างกระดูกในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบ ในสัปดาห์ที่ 1, 2, 3 และ 4 ตามลำดับ แสดงภาพ

ตัวแทนจากการทดสอบ 1 ชุดการทดลอง

ARS quantification



ภาพประกอบ 38 กราฟแท่งแสดงความสัมพันธ์ระดับแร่ธาตุที่เซลล์สร้างกระดูกสร้างขึ้นของกลุ่มควบคุมเทียบกับกลุ่มทดสอบ ในสัปดาห์ที่ 4 เทียบกับสัปดาห์ที่ 1 จากการทดสอบ 4 ชุดการทดลอง โดยคิดเป็นค่า %control เทียบกับกลุ่มควบคุม ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, error bar แสดง standard error of mean (SEM)

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

ในการวิจัยเรื่องผลของวัสดุห้ามเลือดจากอนุพันธ์ไคโตซานต่อความมีชีวิตและการทำหน้าที่ของเซลล์สร้างกระดูกของมนุษย์ ผู้วิจัยได้ทำการประเมินความเป็นพิษของวัสดุห้ามเลือด CA/NOCC ต่อเซลล์สร้างกระดูกของมนุษย์ ทั้งในแง่ที่ส่งผลต่อความมีชีวิตและการทำหน้าที่ของเซลล์สร้างกระดูก โดยประเมินผลความมีชีวิตของเซลล์สร้างกระดูกจากการทดสอบความสามารถในการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์สร้างกระดูกผ่านวิธีทดสอบ MTT ศึกษาการตอบสนองของเซลล์สร้างกระดูกผ่านลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่เซลล์สร้างกระดูกแสดงออกจากการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) และศึกษาการทำหน้าที่ของเซลล์สร้างกระดูกจากการทดสอบปฏิกิริยาอัลคาไลน์ ฟอสฟาเตส (ALP activity) และการสะสมแคลเซียมภายนอกเซลล์จากการเกิดการสะสมแร่ธาตุของเซลล์สร้างกระดูก (Matrix mineralization assay) หลังจากได้ผลการทดลองแล้ว สามารถสรุปผลการทดลองของงานวิจัย โดยแบ่งหัวข้อในการสรุปผลได้ดังต่อไปนี้

- 1 สรุปผลการวิจัย
- 2 อภิปรายผลการวิจัย
- 3 ข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาผลของวัสดุห้ามเลือดจากอนุพันธ์ไคโตซาน Calcium alginate/*N,O*-carboxymethylchitosan (CA/NOCC) ต่อความมีชีวิตและการทำหน้าที่ของเซลล์สร้างกระดูกของมนุษย์ พบว่า วัสดุห้ามเลือด CA/NOCC ไม่ส่งผลในทางลบต่อความมีชีวิตและการทำหน้าที่ของเซลล์สร้างกระดูก โดยจากการวิจัยเซลล์สร้างกระดูกที่ทำการทดสอบร่วมกับวัสดุห้ามเลือด CA/NOCC มีความสามารถในการแบ่งตัวเพิ่มจำนวน การแสดงออกของลักษณะทางสัณฐานวิทยา ความสามารถในการสร้างปฏิกิริยาอัลคาไลน์ ฟอสฟาเตส และการสะสมแคลเซียมภายนอกเซลล์จากการเกิดการสะสมแร่ธาตุของเซลล์สร้างกระดูก ไม่แตกต่างจากเซลล์สร้างกระดูกในกลุ่มควบคุม ถึงแม้จะพบว่าเซลล์สร้างกระดูกที่ยึดเกาะอยู่บนผิวของวัสดุห้ามเลือด CA/NOCC จะมีลักษณะรูปร่างค่อนข้างกลมและพบได้จำนวนน้อยกว่า ซึ่งแตกต่างไปจากลักษณะของเซลล์สร้าง-

กระดูกที่พบอยู่รอบ ๆ วัสดุห้ามเลือด CA/NOCC ที่มีลักษณะเหมือนกับเซลล์สร้างกระดูกในกลุ่มควบคุม จึงสามารถกล่าวได้ว่า วัสดุห้ามเลือดจากอนุพันธ์ไคโตซาน CA/NOCC ไม่เป็นพิษต่อเซลล์สร้างกระดูก และไม่ส่งผลใดๆ ต่อการยึดเกาะของเซลล์สร้างกระดูก ดังนั้นวัสดุห้ามเลือด CA/NOCC จึงถือเป็นวัสดุห้ามเลือดทางเลือกที่น่าสนใจชนิดหนึ่งที่จะถูกนำมาพัฒนาเพื่อใช้เป็นวัสดุห้ามเลือดเฉพาะที่ทางทันตกรรมต่อไปในอนาคต

อภิปรายผลการวิจัย

ปัญหาเลือดออกในงานศัลยศาสตร์ช่องปากเป็นภาวะแทรกซ้อนที่พบได้บ่อย ซึ่งควรได้รับการรักษาและแก้ไขได้อย่างทันท่วงที เพื่อป้องกันอันตรายที่จะเกิดขึ้นต่อชีวิตของผู้ป่วย โดยวัสดุห้ามเลือดเฉพาะที่ถือเป็นอุปกรณ์หนึ่งที่ใช้ช่วยในการรักษาเบื้องต้นได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่อย่างไรก็ตามในปัจจุบันก็ยังไม่มียาห้ามเลือดตัวใดที่จะมีคุณสมบัติครบตามคุณสมบัติของวัสดุห้ามเลือดในอุดมคติ ดังนั้นจึงยังคงมีการพัฒนาคิดค้นวัสดุห้ามเลือดตัวใหม่ๆ ขึ้นมาเรื่อยๆ เพื่อให้ได้วัสดุห้ามเลือดที่มีคุณสมบัติครบถ้วนสมบูรณ์แบบมากที่สุด และวัสดุห้ามเลือดจากไคโตซานก็เป็นวัสดุห้ามเลือดชนิดหนึ่งที่กำลังได้รับความนิยม เนื่องจากคุณสมบัติอันโดดเด่นหลายประการของไคโตซานที่เป็นที่รู้จักกันอย่างแพร่หลาย คือ ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์บางชนิด ความไม่เป็นพิษและการเข้ากันได้ทางชีวภาพ คุณสมบัติในการห้ามเลือด และการย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ (8, 9, 13, 34, 35) เป็นต้น วัสดุห้ามเลือด Calcium alginate/N,O-carboxymethylchitosan (CA/NOCC) เป็นวัสดุห้ามเลือดที่สังเคราะห์ได้จากอนุพันธ์ของไคโตซานและอัลจินेट โดยข้อดีของคาร์บอกซิเมทิลไคโตซานซึ่งเป็นอนุพันธ์ของไคโตซานชนิดหนึ่งคือสามารถละลายน้ำได้ดีซึ่งแตกต่างจากคุณสมบัติของไคโตซานแต่เดิมที่ไม่ละลายน้ำ (36) และจากคุณสมบัติที่ดีของอัลจินेटคือ มีความเข้ากันได้ดีทางชีวภาพ สามารถย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ มีความสามารถในการดูดซับน้ำได้ดี มีคุณสมบัติในการห้ามเลือด ช่วยสนับสนุนการหายของบาดแผล และราคาไม่แพง (25) และเมื่ออัลจินेटถูกนำมาผสมเข้ากับแคลเซียมจะก่อให้เกิดคุณสมบัติการห้ามเลือดขึ้น (26, 37, 38) ผ่านทางแคลเซียมไอออนที่ถูกปล่อยออกมาในเลือด โดยความเข้มข้นของระดับแคลเซียมไอออนที่สูงขึ้น ซึ่งเปรียบเสมือนการกระตุ้น factor IV ในกระบวนการแข็งตัวของเลือด ส่งผลให้เกิดการกระตุ้นการทำงานของเกล็ดเลือดและ clotting factor VII, IX และ X ตามมา และก่อให้เกิดการแข็งตัวของเลือดในท้ายที่สุด (39, 40) ดังนั้นเมื่อนำคุณสมบัติที่ดีของสารทั้งสองอย่างมาผสมเข้าด้วยกันและสังเคราะห์เป็นวัสดุห้ามเลือด CA/NOCC ขึ้น จึงทำให้วัสดุห้ามเลือดดังกล่าวมีคุณสมบัติดูดซับน้ำได้ดี ส่งเสริมการแข็งตัวของเลือดบนบาดแผล และช่วยเร่งการสมานแผลบาดแผลได้ในเวลาเดียวกัน (29)

จากการศึกษาผลของวัสดุห้ามเลือด CA/NOCC ต่อความมีชีวิตและความสามารถในการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์สร้างกระดูก พบว่าเซลล์สร้างกระดูกมีความสามารถในการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนมากขึ้นตามระยะเวลาที่เพิ่มมากขึ้น โดยมีอัตราการเจริญเติบโตที่ไม่แตกต่างกับเซลล์สร้างกระดูกในกลุ่มควบคุม กล่าวได้ว่า วัสดุ CA/NOCC ไม่ส่งผลเป็นพิษต่อการเจริญเติบโตของเซลล์สร้างกระดูก สอดคล้องกับงานวิจัยของ Li และคณะ, 2012(41) ที่พบว่าคอม โพลีดีไมโครพาร์ทิเคิลของไคโตซานและอัลจินต (Chiosan/Alginate microparticles) ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ L929 (L929 mouse fibroblast cells) โดยเซลล์ L929 มีลักษณะการเจริญเติบโตอย่างช้าๆ ในช่วงแรก แล้วจึงค่อยเพิ่มมากขึ้นในตอนหลัง เช่นเดียวกับการศึกษาของ Shi และคณะ, 2016(42) ที่พบว่าวัสดุห้ามเลือดจากคาร์บอกซีเมธิลไคโตซาน โซเดียมอัลจินต และคอลลาเจน (CSCM) ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ไมโอบลาสต์ (myoblast cell line; L6) ในทุกความเข้มข้น โดยในการทดลองที่มีระดับความเข้มข้นของ CSCM มากกว่า พบว่าเซลล์มีอัตราการรอดชีวิตที่น้อยกว่าการทดลองที่มีระดับความเข้มข้นของ CSCM เจือจางกว่า นอกจากนี้จากการศึกษาค้นคว้าเพิ่มเติมยังพบว่าไคโตซานมีคุณสมบัติที่ช่วยส่งเสริมการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์อีกด้วย(43) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของเราที่พบว่าอัตราการเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนของเซลล์สร้างกระดูกในกลุ่มทดสอบสูงกว่าเซลล์สร้างกระดูกในกลุ่มควบคุมอยู่เล็กน้อย โดยเมื่อนำมาวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าไม่มีความแตกต่างกันของอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์สร้างกระดูกทั้งสองกลุ่ม ดังนั้นจะเห็นได้ว่าวัสดุห้ามเลือดที่มีไคโตซานและอัลจินตเป็นส่วนประกอบไม่ส่งผลเป็นพิษต่อการเจริญเติบโตของเซลล์

เมื่อศึกษาผลของวัสดุห้ามเลือด CA/NOCC ต่อลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์สร้างกระดูกผ่านกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) พบว่าเซลล์สร้างกระดูกที่เกาะอยู่บนแผ่นกระจกกันใสรอบๆ วัสดุทดสอบ CA/NOCC มีลักษณะที่ไม่แตกต่างจากเซลล์สร้างกระดูกในกลุ่มควบคุม คือ เซลล์มีลักษณะที่แผ่ขยาย ผิวค่อนข้างเรียบ และมีความสามารถในการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนพอๆ กับเซลล์สร้างกระดูกในกลุ่มควบคุม สังเกตได้จากความหนาแน่นของเซลล์ที่เกาะอยู่รอบๆ วัสดุทดสอบ CA/NOCC บนแผ่นกระจกกันใส ในขณะที่เซลล์สร้างกระดูกที่เกาะอยู่บนพื้นผิวของวัสดุทดสอบ CA/NOCC มีลักษณะที่แตกต่างออกไป คือ มีลักษณะที่ค่อนข้างกลม พบได้จำนวนน้อยกว่า แต่ยังคงมีความสามารถที่จะมีชีวิตรอดและเจริญเติบโตได้ สังเกตได้จากการที่เซลล์สามารถสร้างรยางค์เล็กๆ (pseudopodia) ไปยึดเกาะบนพื้นผิวของวัสดุทดสอบได้(27) เช่นเดียวกับการศึกษาของ He Huang และคณะ, 2019(27) ที่ทำการทดสอบวัสดุห้ามเลือดจากโซเดียมอัลจินตคาร์บอกซีเมธิลไคโตซาน และคอลลาเจน (SACC) และพบว่าวัสดุห้ามเลือดดังกล่าวมีคุณสมบัติห้ามเลือดที่ดี สามารถย่อยสลายได้เองตามธรรมชาติ และมีคุณสมบัติเข้ากันได้ดีทางชีวภาพ โดยผลจากการทดลอง SEM พบว่าเซลล์ dermal fibroblasts สามารถเจริญเติบโตบนพื้นผิวของ SACC ได้

เพราะเซลล์สามารถพัฒนารายักษ์ให้ยืดยาวออกมาและบนพื้นผิวของวัสดุ SACC ได้ ทั้งยังสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้าของ Janvikul และคณะ,2007(28) ที่พบเซลล์ไลน์ L929 สามารถยึดเกาะและเจริญเติบโตได้ดีกว่าในวัสดุ CA/NOCC ที่พื้นผิวของวัสดุมีลักษณะเรียบ มีความเป็นรูพรุนน้อย ซึ่งจะพบลักษณะดังกล่าวในวัสดุที่มีสัดส่วนของอัลจินเนตมากกว่า แต่อย่างไรก็ตาม เนื่องจากการออกแบบการทดลอง ชนิดของเซลล์ที่ใช้ จำนวนเซลล์ตั้งต้นที่ใช้ในการทดลอง และระยะเวลาในการเลี้ยงเซลล์ที่แตกต่างกันของงานวิจัยงานนี้และงานวิจัยก่อนหน้า จึงอาจทำให้ผลการวิจัยที่ออกมาไม่เหมือนกับงานวิจัยก่อนหน้าทั้งหมด แต่ก็มีแนวโน้มที่ไปในทิศทางเดียวกัน คือ เมื่อนำวัสดุ CA/NOCC มาทดสอบกับเซลล์ เซลล์ยังคงมีความสามารถในการยึดเกาะและเจริญเติบโตแบ่งตัวเพิ่มจำนวนได้ โดยมีความชอบในการยึดเกาะบนพื้นผิวที่เรียบมากกว่าพื้นผิวที่ขรุขระมีรูพรุน

จากผลการทดสอบการแสดงออกของอัลคาไลน์ ฟอสฟาเตส (ALP activity) จากชุดการทดลองทั้งหมด 6 ชุด พบว่าไม่มีความแตกต่างกันของ ALP activity ระหว่างเซลล์สร้างกระดูกกลุ่มทดสอบและกลุ่มควบคุมในทุกจุดเวลาที่ทำการทดสอบคือ วันที่ 4, 8 และ 14 โดยระดับปฏิกิริยาที่วัดค่าได้ในแต่ละชุดการทดลองมีช่วงของการแสดงออกที่แตกต่างกัน ไปอยู่ในช่วงตั้งแต่ 100 - 400 ไมโครโมล/ไมโครกรัม โปรตีน ซึ่งการแสดงออกที่แตกต่างกันดังกล่าวในแต่ละชุดการทดลองน่าจะเป็นผลมาจากพฤติกรรมการแสดงออกของเซลล์ที่แตกต่างกันในแต่ละตัวบุคคล(44, 45) และจากการทดลอง 6 ชุด พบว่า ALP activity มีรูปแบบการแสดงออกแบ่งได้เป็น 2 รูปแบบใหญ่ๆ ดังแสดงในภาพประกอบ 36 คือ ค่อยๆ เพิ่มขึ้นจนระดับของปฏิกิริยาขึ้นไปสูงสุดในวันที่ 14 (จากชุดการทดลองที่ 1 และ 2) และระดับปฏิกิริยาขึ้นไปสูงสุดตั้งแต่วันที่ 4 และค่อยๆ ลดลงในวันต่อมา (จากชุดการทดลอง 3, 4, 5 และ 6) สอดคล้องกับการศึกษามากมายเกี่ยวกับ ALP activity ที่ผ่านมาซึ่งพบว่า ALP activity มีการแสดงออกได้หลายรูปแบบ ดังเช่นจากการศึกษาของ Fernandes และคณะ, 1997(46) ที่พบว่า ALP activity ของเซลล์กระดูกขากรรไกร (alveolar bone) ของมนุษย์ขึ้นไประดับสูงสุดในวันที่ 14 ซึ่งขัดแย้งกับการศึกษาของ Perinpanayagam และคณะ,2006(47) ที่พบว่า ALP activity ของเซลล์กระดูกขากรรไกร (alveolar bone) ของมนุษย์ขึ้นไประดับสูงสุดในวันที่ 7 และการศึกษาของ Coelho และ Fernandes,2000(48) ที่พบว่า ALP activity ของเซลล์ไขกระดูก (bone marrow) ของมนุษย์ขึ้นไประดับสูงสุดในวันที่ 21 ในขณะที่การศึกษาของ Beloti และ Rosa,2005(49) พบการแสดงออกของ ALP activity ของเซลล์ไขกระดูก (bone marrow) ของมนุษย์ทั้งสองรูปแบบคือมีระดับสูงสุดในวันที่ 7 แล้วค่อยๆ ลดลงมา (ได้รับอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสม dexamethasone ตั้งแต่แรกของการเพาะเลี้ยง; primary culture) และค่อยๆ เพิ่มขึ้นจนถึงระดับสูงสุดในวันที่ 21 (ได้รับอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสม dexamethasone ในภายหลัง; first passage) โดยการ

แสดงออกทั้งสองรูปแบบนั้นขึ้นกับเงื่อนไขสภาวะแวดล้อมในการเลี้ยงเซลล์ที่ต่างกัน ดังนั้น จะเห็นได้ว่ามีปัจจัยหลายอย่างที่ส่งผลต่อพฤติกรรมการแสดงออกของเซลล์สร้างกระดูก เช่น ตำแหน่งกำเนิดแหล่งที่มาของเซลล์ (ตำแหน่ง อายุ เพศ), ชนิดของเซลล์, อาหารเลี้ยงเซลล์, ระยะเวลาในการเลี้ยงเซลล์, ฮอร์โมนเฉพาะที่, growth factor และ cytokines ที่เซลล์ได้รับหรือก็คือสภาวะที่ใช้เลี้ยงเซลล์นั่นเอง(44, 50) ทำให้คณะผู้วิจัยไม่สามารถนำผลการศึกษาที่ได้มาเทียบเคียงกับงานวิจัยที่ผ่านมาได้อย่างตรงไปตรงมา เนื่องจากเงื่อนไขของการทดลองที่แตกต่างกันในหลายๆ ปัจจัย อย่างไรก็ตาม เนื่องจากจากการแสดงออกของ ALP activity ในกลุ่มทดสอบและกลุ่มควบคุมไม่แตกต่างกัน จึงอาจทำให้กล่าวได้ว่าวัสดุทดสอบ CA/NOCC ไม่ส่งผลต่อความสามารถในการทำหน้าที่ของเซลล์สร้างกระดูก

จากการศึกษาการสะสมแคลเซียมภายนอกเซลล์จากกระบวนการสะสมแร่ธาตุของเซลล์สร้างกระดูก (Matrix mineralization assay) ทั้งจากการวิเคราะห์ทางคุณภาพและปริมาณ พบว่าไม่มีความแตกต่างกันระหว่างเซลล์สร้างกระดูกในกลุ่มทดสอบและกลุ่มควบคุม โดยจากผลการศึกษาของเราจะเห็นได้ว่าชั้นแมทริกซ์ที่เซลล์สร้างกระดูกสร้างขึ้นทั้งในกลุ่มทดสอบและกลุ่มควบคุมต่างย้อมติดสีของ Alizarin Red S เข้มขึ้นเมื่อเวลาผ่านไป โดยเข้มสุดในสัปดาห์ที่ 4 แต่อย่างไรก็ตามกลับไม่พบการสร้างก้อนแคลเซียม (Calcium nodule) ขึ้นมาอย่างชัดเจนในชั้นแมทริกซ์ของเซลล์สร้างกระดูก ซึ่งสอดคล้องกับบางการศึกษาที่พบว่าบางทีก็ไม่พบการสร้างก้อนแร่ธาตุ (nodule formation) ขึ้นในกระบวนการสะสมแร่ธาตุของเซลล์สร้างกระดูกของมนุษย์(44, 51) เนื่องจากเซลล์สร้างกระดูกตั้งต้น (primary human osteoblast) แต่ละเซลล์มีความสามารถในการพัฒนาไปทำหน้าที่ได้แตกต่างกัน อีกทั้งยังมีปัจจัยอื่นๆ อีกหลายปัจจัยที่ส่งผลต่อพฤติกรรมการแสดงออกของเซลล์ดังที่ได้กล่าวไปแล้วข้างต้น และยังมีบางการศึกษาที่ผ่านมาที่พบว่าก้อนแร่ธาตุอาจถูกสร้างขึ้นมาในระยะท้ายๆ ของระยะที่มีการสะสมแร่ธาตุของเซลล์สร้างกระดูก เช่น การศึกษาของ Stein และ Lian,1993(52) พบว่าระยะที่จะเกิดการสะสมแร่ธาตุของเซลล์ rat calvarial จะเกิดขึ้นในช่วงหลังจาก 28 ถึง 35 วันหลังการเพาะเลี้ยงเซลล์ และจากการศึกษาของ Coelho และ Fernandes,2000(48) ที่พบว่าเซลล์ไขกระดูกจะมีการสร้างก้อนแร่ธาตุขึ้นหลังจากวันที่ 28 เป็นต้นไป ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ว่าหากการศึกษาของเรามีการขยายเวลาในการเพาะเลี้ยงเซลล์สร้างกระดูกให้นานขึ้นก็อาจจะพบว่าการสร้างก้อนแคลเซียมขึ้นในเวลาต่อมา แต่เนื่องจากการศึกษาของเราทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ถึงวันที่ 28 เท่านั้นจึงทำให้ไม่สามารถยืนยันด้วยการศึกษาเหล่านี้ได้นอกจากนั้นยังพบว่ามีความเกี่ยวเนื่องกันของระดับ ALP activity กับการสร้างก้อนแคลเซียม (Calcium nodule) ในชั้นแมทริกซ์ของเซลล์สร้างกระดูก โดยระดับ ALP activity จะต้องมียกระดับสูงมากถึงจุดหนึ่งจึงจะสามารถสร้างก้อนแคลเซียมขึ้นมาได้(49) ซึ่งจากผลการศึกษาของเราที่พบว่า

เซลล์สร้างกระดูกตั้งต้นแต่ละชุดมีการแสดงออกของระดับ ALP activity ที่หลากหลาย จึงมีความเป็นไปได้ว่าบางทีระดับ ALP activity ที่เซลล์สร้างกระดูกแสดงออกมานั้นยังไม่สูงมากพอที่จะสามารถสร้างก้อนแร่ธาตุขึ้นมาได้ แต่อย่างไรก็ตามเนื่องจากยังพบว่า Alizarin Red S ยังคงมีการติดสีที่เข้มข้นเมื่อระยะเวลาผ่านไป และผลการทดสอบของเซลล์สร้างกระดูกในกลุ่มทดสอบและกลุ่มควบคุมที่ได้ไม่แตกต่างกัน จึงอาจทำให้กล่าวได้ว่าวัสดุทดสอบ CA/NOCC ไม่ส่งผลต่อการทำหน้าที่ในการสะสมแร่ธาตุของเซลล์สร้างกระดูก

จากผลการศึกษาที่กล่าวมาข้างต้นจะเห็นได้ว่าเซลล์สร้างกระดูกตั้งต้นของมนุษย์ (primary human osteoblast) ให้ผลการทดสอบออกมาโดยมีค่าระดับความแปรปรวนที่ค่อนข้างกว้างและแตกต่างกันในแต่ละชุดการทดลอง ซึ่งเกิดจากข้อจำกัดและความสามารถเฉพาะตัวในการแสดงออกของเซลล์สร้างกระดูกในแต่ละไลน์ที่ต่างกัน แต่อย่างไรก็ตามผลการทดสอบที่ได้ก็อาจยังมีความน่าเชื่อถือ เนื่องจากข้อเด่นหลักๆ ของเซลล์ตั้งต้นที่สามารถเป็นตัวแทนของประชากรทางคลินิกได้และไม่มี ความแตกต่างกันระหว่างสปีชีส์(44) ซึ่งเมื่อนำเซลล์ตั้งต้นดังกล่าวมาใช้ในการทดลอง จึงทำให้ผลการทดลองที่ได้สามารถเป็นตัวแทนของกลุ่มประชากรได้และให้ผลลัพธ์ที่ใกล้เคียงกับการตอบสนองของมนุษย์ในชีวิตจริง โดยวิธีการที่การศึกษาของเราใช้เพื่อเก็บเกี่ยวเซลล์สร้างกระดูกของมนุษย์ก็ค่อนข้างเป็นวิธีที่น่าเชื่อถือและมีการใช้กันอย่างแพร่หลายมานานแล้ว ซึ่งมีหลายการศึกษาก่อนหน้าที่ได้พิสูจน์แล้วว่า การเก็บเกี่ยวเซลล์สร้างกระดูกด้วยวิธีการดังกล่าวทำให้ได้เซลล์สร้างกระดูกที่ยังคงคุณสมบัติในการเจริญเติบโตและการทำหน้าที่ของเซลล์สร้างกระดูกไว้ดั้งเดิม(31, 45, 53, 54) เช่น จากการศึกษาของ Jonsson และคณะ, 1999(31) ที่พบเซลล์สร้างกระดูกสามารถเจริญเติบโตออกมาได้มากที่สุดจากวิธีการ explant cultures เมื่อเทียบกับวิธี collagenases-treated bone (ค่าเฉลี่ยการได้มาของเซลล์กระดูกที่นับได้เท่ากับ 3.6 และ 2.8×10^6 เซลล์ ตามลำดับ) โดยเมื่อนำมาวิเคราะห์พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ เช่นเดียวกับการศึกษาของ Marolt และคณะ, 2014(45) ที่พบว่าผลของเซลล์สร้างกระดูกที่ได้โดยวิธี explant cultures และ collagenase digestion cultures ไม่แตกต่างกัน นอกจากนี้การศึกษายังได้เลือกใช้เซลล์สร้างกระดูกในรุ่นที่ 1 – 3 เท่านั้นมาใช้ในการทดลอง เนื่องจากมีการศึกษาที่ยืนยันแล้วว่าเซลล์สร้างกระดูกตั้งต้นที่อยู่ในรุ่นที่ 1 – 3 จะยังคงสภาพของความเป็นเซลล์สร้างกระดูกและการทำหน้าที่ของเซลล์สร้างกระดูกดั้งเดิมไว้ได้อยู่(45) ทำให้ผลการทดลองที่ได้ยังมีความน่าเชื่อถือเพิ่มมากขึ้น

และเนื่องจากวัสดุห้ามเลือด CA/NOCC นี้มีคุณสมบัติและกลไกการทำงานในการห้ามเลือดที่เฉพาะตัว ซึ่งเป็นผลมาจากส่วนประกอบ สัดส่วนและขั้นตอนกรรมวิธีการผลิตที่แตกต่างจากวัสดุห้ามเลือดตัวอื่นที่เคยมีมาก่อน ส่งผลให้ไม่สามารถนำผลการศึกษาที่ได้จากการทดสอบวัสดุดังกล่าวไปเปรียบเทียบกับการศึกษาของวัสดุห้ามเลือดอื่นๆ ที่เคยมีมาก่อนได้อย่างตรงไปตรงมา

แต่จากผลการศึกษาก่อนหน้านี้เกี่ยวกับวัสดุห้ามเลือด CA/NOCC และผลการศึกษาของเราจะเห็นได้ว่าวัสดุห้ามเลือด CA/NOCC เป็นวัสดุที่มีคุณสมบัติในการห้ามเลือดได้อย่างมีประสิทธิภาพ ไม่เป็นพิษทั้งต่อเซลล์ผิวหนังของร่างกายและเซลล์สร้างกระดูกในช่องปาก และไม่ส่งผลกระทบต่อทำหน้าที่ของเซลล์สร้างกระดูก ซึ่งหากมีโอกาสที่จะนำวัสดุห้ามเลือด CA/NOCC นี้มาทำการทดสอบเพิ่มเติมในด้านอื่นๆ ต่อทั้งในระดับหลอดทดลอง คือ การทดสอบกับเซลล์ชนิดอื่นๆ ในช่องปาก และในระดับสัตว์ทดลอง คือ การทดสอบประสิทธิภาพการห้ามเลือดและการหายของแผลในเข่า-พื้นของสัตว์ทดลอง และผลการทดสอบที่ออกมายังคงแสดงแนวโน้มของผลลัพธ์ที่ดี วัสดุห้ามเลือดนี้จึงจะมีโอกาสที่จะถูกนำมาพัฒนาเป็นวัสดุห้ามเลือดที่ใช้ในกระดูกขากรรไกรและช่องปากของมนุษย์ต่อไปในอนาคต

ข้อเสนอแนะ

จากผลการศึกษาของเราที่ได้ทดสอบวัสดุ CA/NOCC ต่อความมีชีวิตและการทำหน้าที่ของเซลล์สร้างกระดูกในช่องปากเท่านั้น ซึ่งในความเป็นจริงแล้วหากเราจะนำวัสดุ CA/NOCC มาใช้เพื่อห้ามเลือดเฉพาะที่ในช่องปากต่อไปในอนาคต ย่อมมีบริเวณเนื้อเยื่อส่วนอื่นในช่องปากที่นอกเหนือไปจากกระดูกที่ต้องสัมผัสกับวัสดุโดยตรง เช่น เนื้อเยื่อบริเวณเหงือก และเนื้อเยื่อเอ็นยึดปริทันต์ ที่พบได้ทั่วไปในช่องปาก เป็นต้น โดยเซลล์ของเนื้อเยื่อเหล่านี้ก็จะมีพฤติกรรมการแสดงออกในการตอบสนองต่อวัสดุ CA/NOCC เฉพาะตัวที่อาจแตกต่างไปจากการตอบสนองของเซลล์สร้างกระดูกก็เป็นได้ ดังนั้นเพื่อให้บรรลุเป้าหมายที่ต้องการพัฒนาวัสดุ CA/NOCC เพื่อนำมาใช้เป็นวัสดุห้ามเลือดเฉพาะที่ในงานศัลยกรรมช่องปากต่อไปในอนาคต จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงผลของวัสดุ CA/NOCC ต่อเซลล์ของเนื้อเยื่อในช่องปากชนิดอื่นร่วมด้วย



ภาคผนวก

เลขที่รับรอง DENTSWU-EC03/2561



เอกสารรับรองโครงการวิจัยที่เกี่ยวกับงานวิจัยในมนุษย์
คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

ชื่อโครงการ (ชื่อภาษาไทย) การศึกษาความเป็นพิษของวัสดุห้ามเลือดจากอนุพันธ์ไคโตซานต่อเซลล์จากเนื้อเยื่อในช่องปากของมนุษย์

(ชื่อภาษาอังกฤษ) Cytotoxicity of a Chitosan-derived Hemostatic Agent on Human Primary Cells from Tissues of the Oral Cavity

ชื่อหัวหน้าโครงการ ผศ.ดร.ทพญ.มานิสา ศรีชลเพชร

สังกัดหน่วยงาน ภาควิชาศัลยศาสตร์และเวชศาสตร์ช่องปาก คณะทันตแพทยศาสตร์ มศว

ระยะเวลารับรอง เดือน มีนาคม 2561 – เดือน กุมภาพันธ์ 2562

เอกสารที่รับรอง

1. แบบข้อเสนอโครงการวิจัย
2. หนังสือให้ความยินยอมเข้าร่วมในโครงการ
3. Information sheet สำหรับผู้ยินยอมตน

รับรองโดย คณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมในการทำวิจัย ประจำคณะทันตแพทยศาสตร์

ลงนาม.....

(ผศ.ดร.ทพญ.ปรมาภรณ์ จิวพัฒนกุล แก้วมณี)

ประธานคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมในการทำวิจัย

คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

วันที่ 14 มี.ค. 2561

ลงนาม.....

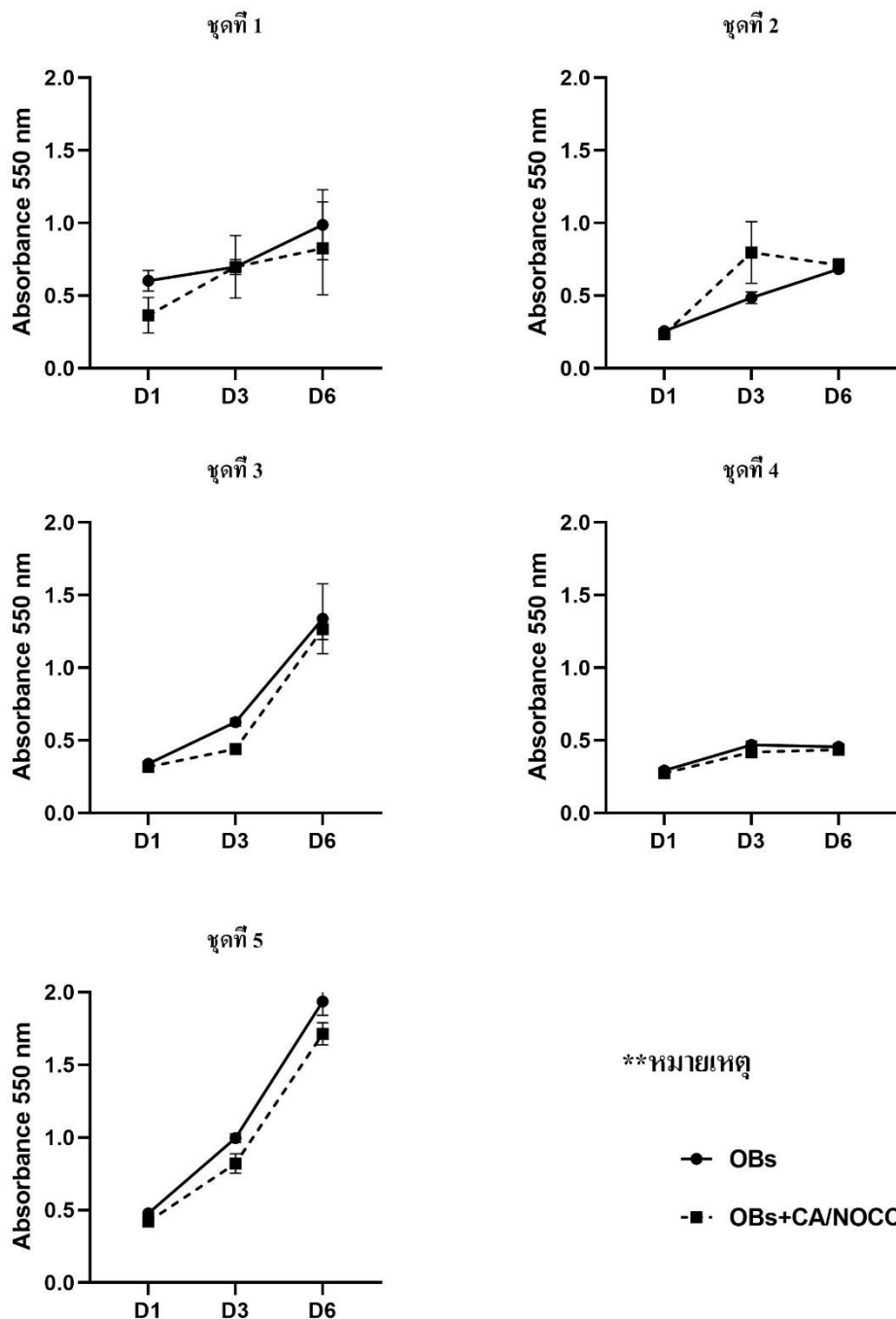
(ผศ.ดร.ทพ.ณัฐธ แก้วสุทธา)

คณบดีคณะทันตแพทยศาสตร์

วันที่ 14 มี.ค. 2561

หมายเลขรับข้อเสนอ dentswu-ec-in 012/2561

Cell Proliferation of Primary human osteoblasts



ภาพประกอบ 39 กราฟเส้นแสดงความสามารถในการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์สร้างกระดูก ระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบ CA/NOCC ในวันที่ 1, 3 และ 6 จากการทดสอบ 6 ชุดการ

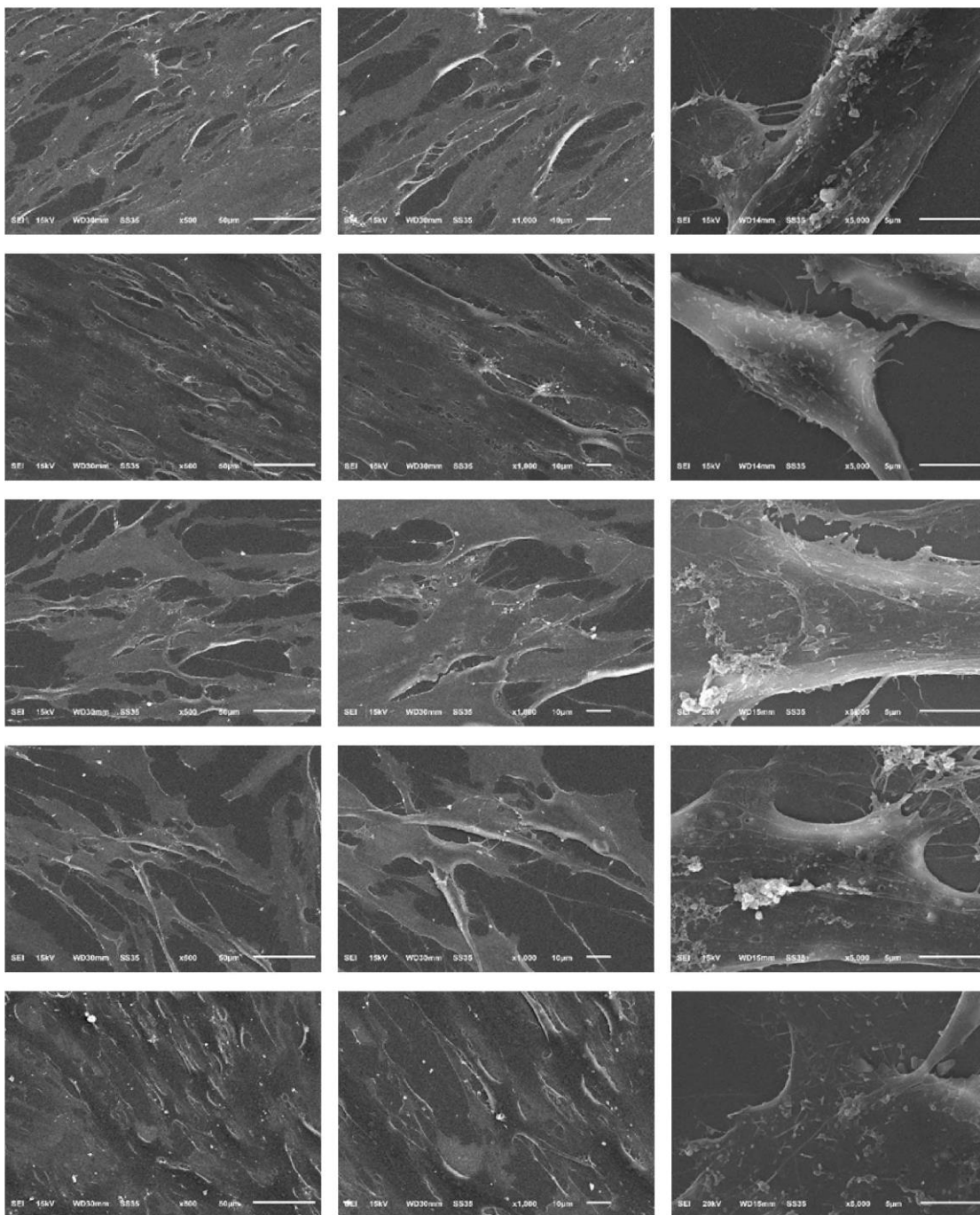
ทดลอง, error bar แสดง standard error of mean (SEM)

Cells (OBs)

500X

1,000X

5,000X



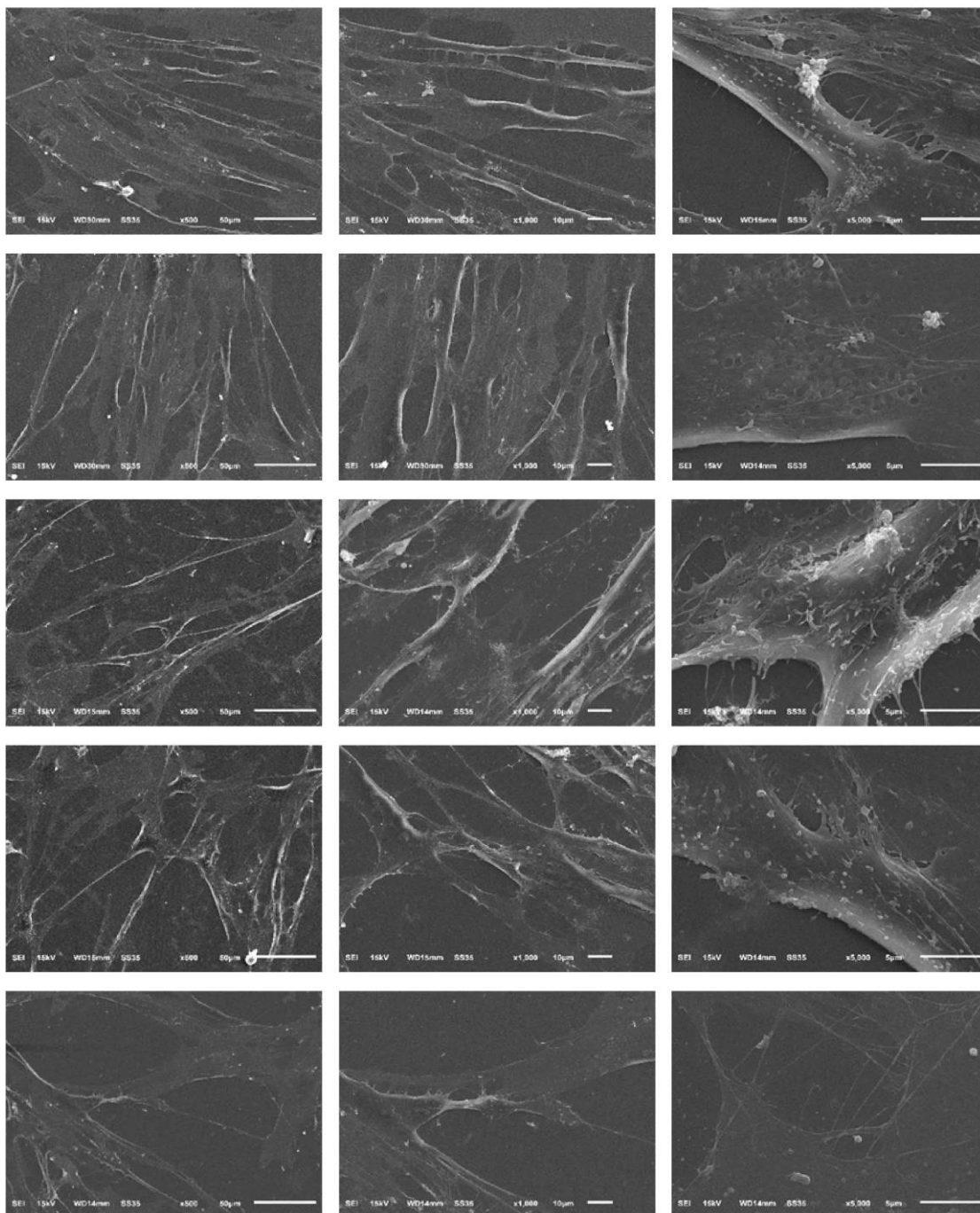
ภาพประกอบ 40 ภาพ SEM แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์สร้างกระดูกในกลุ่มควบคุม ที่กำลังขยาย 500X, 1,000X และ 5,000X ตามลำดับ

Cells located around CA/NOCC (OBs+CA/NOCC)

500X

1,000X

5,000X



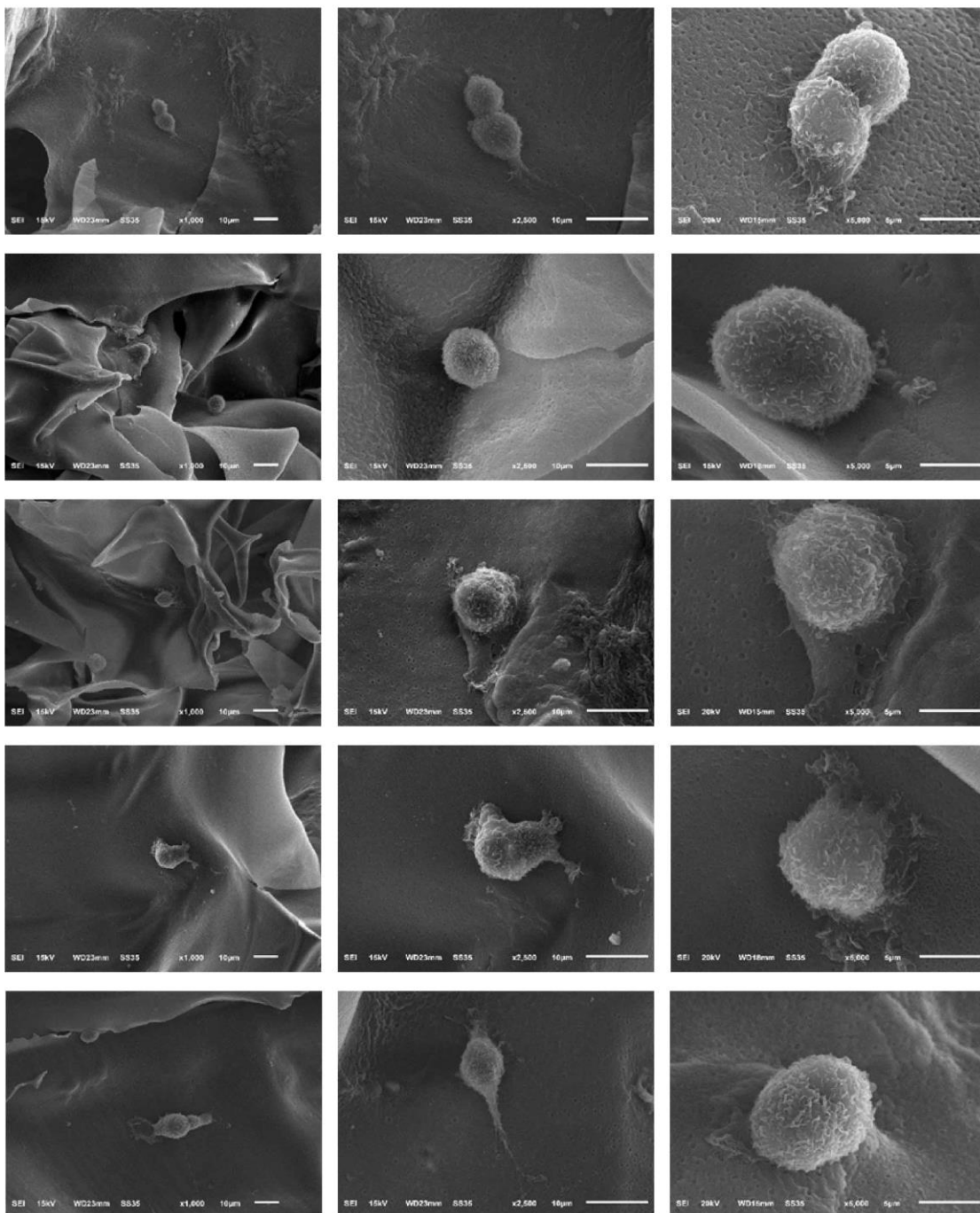
ภาพประกอบ 41 ภาพ SEM แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์สร้างกระดูกที่เกาะอยู่บนแผ่นกระดูกสันหลังรอบๆ วัสดุทดสอบ CA/NOCC (เซลล์สร้างกระดูกกลุ่มทดสอบ) ที่กำลังขยาย 500X, 1,000X และ 5,000X ตามลำดับ

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

1,000X

2,500X

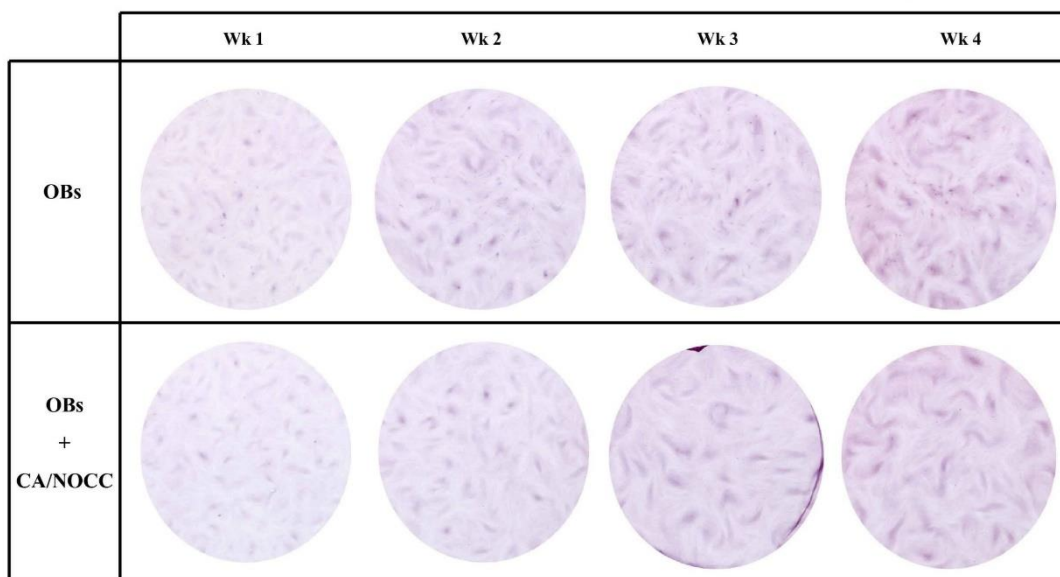
5,000X



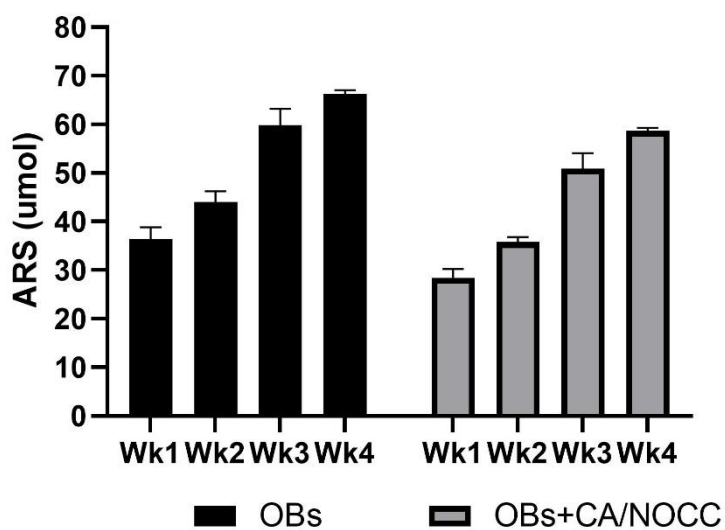
ภาพประกอบ 42 ภาพ SEM แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์สร้างกระดูกที่เกาะอยู่บน
พื้นผิวที่มีรูพรุนของวัสดุทดสอบ CA/NOCC (เซลล์สร้างกระดูกกลุ่มทดสอบ) ที่กำลังขยาย

1,000X, 2,500X และ 5,000X ตามลำดับ

Matrix Mineralization assay : Alizarin Red staining (ชุดที่ 1)

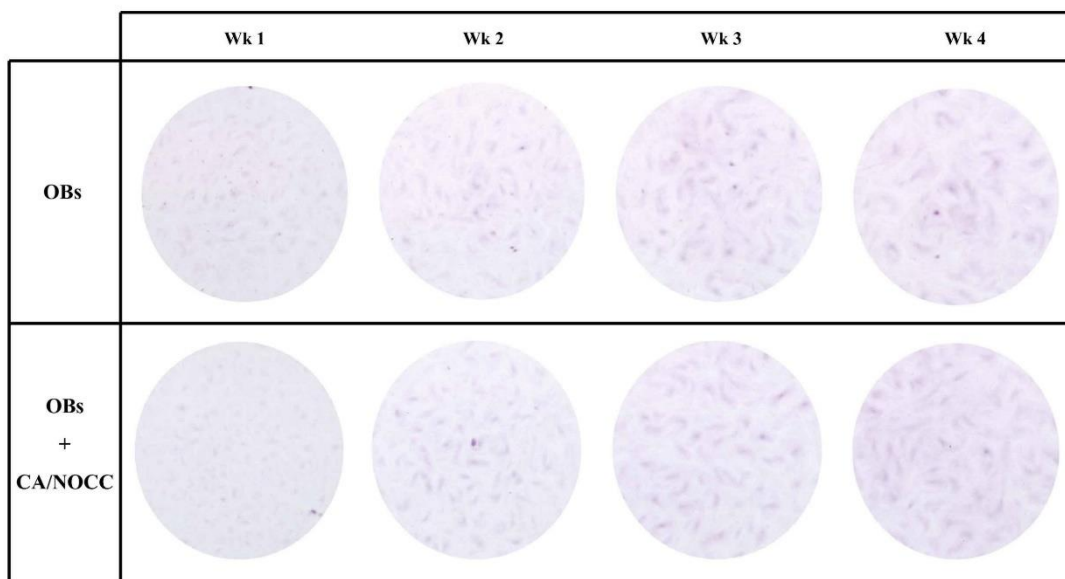


ชุดที่ 1

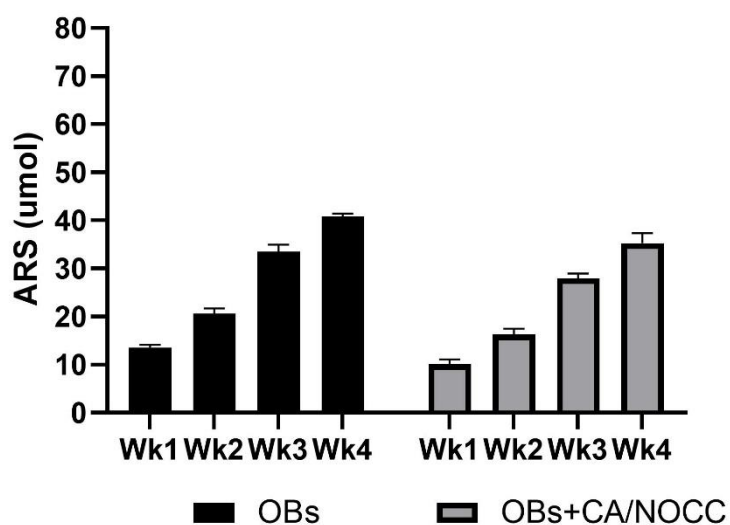


ภาพประกอบ 43 การแสดงออกของการสะสมแร่ธาตุภายนอกเซลล์ของเซลล์สร้างกระดูกชุดที่ 1 (ภาพสีย้อม Alizarin red แสดงระดับแร่ธาตุที่เซลล์สร้างกระดูกสร้างขึ้น และกราฟแท่งเปรียบเทียบปริมาณของระดับของสีย้อม Alizarin red ที่สกัดได้ ของเซลล์สร้างกระดูกในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบ ในสัปดาห์ที่ 1, 2, 3 และ 4 ตามลำดับ), error bar แสดง standard error of mean (SEM)

Matrix Mineralization assay : Alizarin Red staining (ชุดที่ 2)

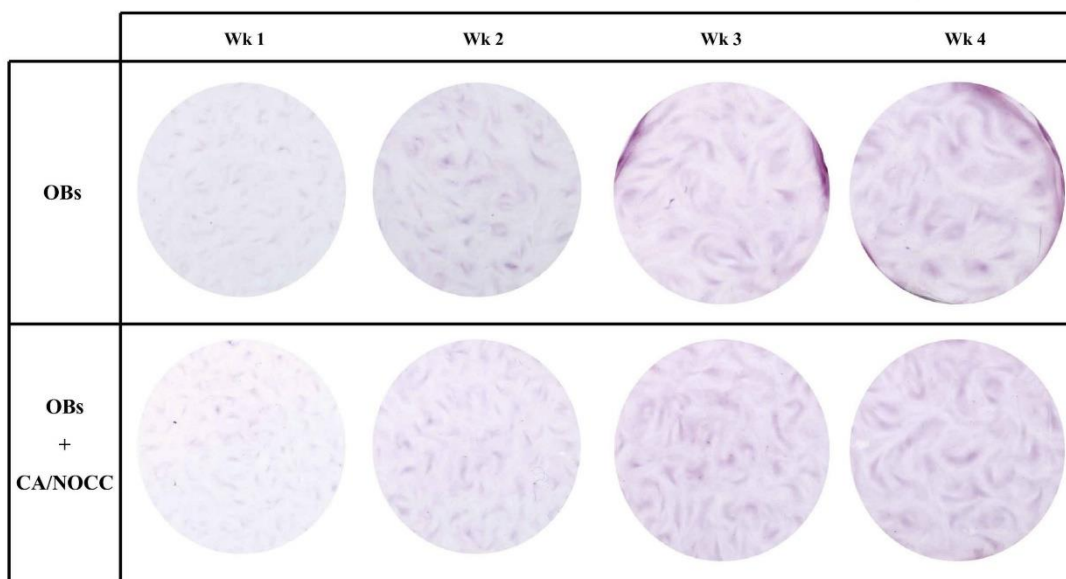


ชุดที่ 2

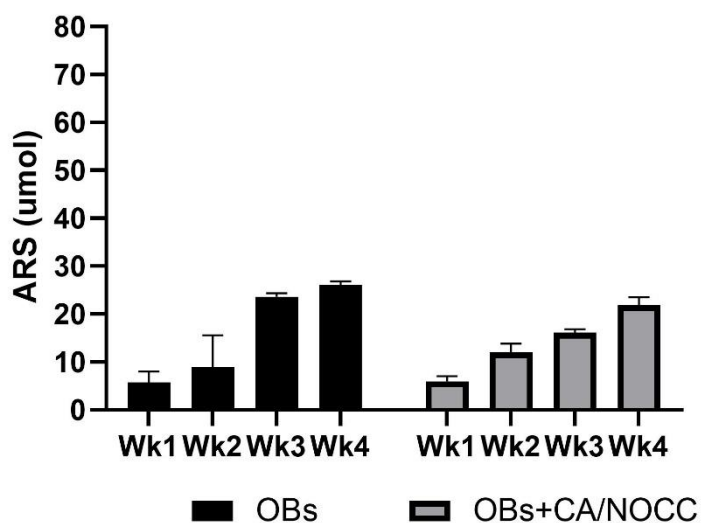


ภาพประกอบ 44 การแสดงออกของการสะสมแร่ธาตุภายนอกเซลล์ของเซลล์สร้างกระดูกชุดที่ 2 (ภาพสีย้อม Alizarin red แสดงระดับแร่ธาตุที่เซลล์สร้างกระดูกสร้างขึ้น และกราฟแท่งเปรียบเทียบปริมาณของระดับของสีย้อม Alizarin red ที่สกัดได้ ของเซลล์สร้างกระดูกในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบ ในสัปดาห์ที่ 1, 2, 3 และ 4 ตามลำดับ), error bar แสดง standard error of mean (SEM)

Matrix Mineralization assay : Alizarin Red staining (ชุดที่ 3)

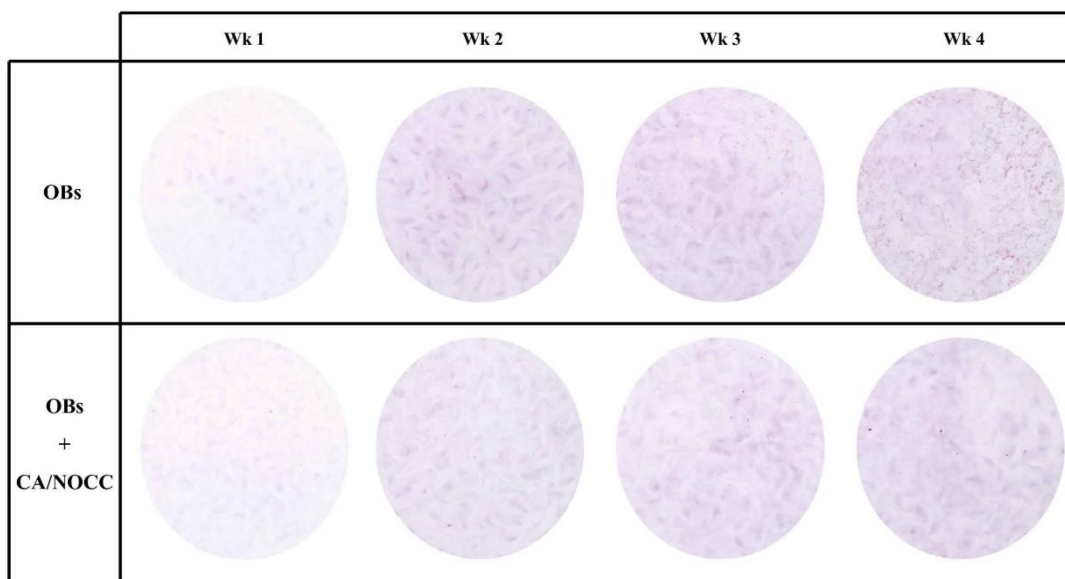


ชุดที่ 3

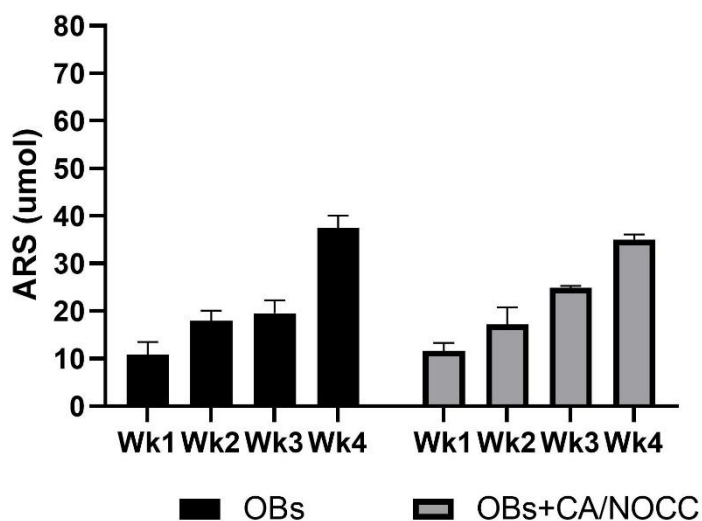


ภาพประกอบ 45 การแสดงออกของการสะสมแร่ธาตุภายนอกเซลล์ของเซลล์สร้างกระดูกชุดที่ 3 (ภาพสีย้อม Alizarin red แสดงระดับแร่ธาตุที่เซลล์สร้างกระดูกสร้างขึ้น และกราฟแท่งเปรียบเทียบปริมาณของระดับของสีย้อม Alizarin red ที่สกัดได้ ของเซลล์สร้างกระดูกในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบ ในสัปดาห์ที่ 1, 2, 3 และ 4 ตามลำดับ), error bar แสดง standard error of mean (SEM)

Matrix Mineralization assay : Alizarin Red staining (ชุดที่ 4)



ชุดที่ 4



ภาพประกอบ 46 การแสดงออกของการสะสมแร่ธาตุภายนอกเซลล์ของเซลล์สร้างกระดูกชุดที่ 4 (ภาพสีย้อม Alizarin red แสดงระดับแร่ธาตุที่เซลล์สร้างกระดูกสร้างขึ้น และกราฟแท่งเปรียบเทียบปริมาณของระดับของสีย้อม Alizarin red ที่สกัดได้ ของเซลล์สร้างกระดูกในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบ ในสัปดาห์ที่ 1, 2, 3 และ 4 ตามลำดับ), error bar แสดง standard error of mean (SEM)

บรรณานุกรม

1. Janvikul W, Thavornyutikarn B, Kosorn W, Surattanawanich P. Clinical study of chitosan-derivative-based hemostat in the treatment of split-thickness donor sites 2013. 385-95 p.
2. 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.
3. Wedmore I, McManus JG, Pusateri AE, Holcomb JB. A special report on the chitosan-based hemostatic dressing: experience in current combat operations. *J Trauma.* 2006;60(3):655-8.
4. 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.
5. Santhosh Kumar MP. Local hemostatic agents in the management of bleeding in oral surgery 2016.
6. ชัชวาลย์ ศ. การห้ามเลือด (HEMOSTASIS). กรุงเทพฯ: ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล; 2555.
7. Thavornyutikarn B, Kosorn W, Surattanawanich P, Wongparami U, Janvikul W. Chitosan Derivative-based Hemostat: Irritation, Hypersensitivity and Absorbability Study 2013. 49-52 p.
8. Pogorielov M, Kalinkevich O, Deineka V, Garbuzova V, Solodovnik A, Kalinkevich A, et al. Haemostatic chitosan coated gauze: in vitro interaction with human blood and in-vivo effectiveness. *Biomaterials Research.* 2015;19:22.
9. Wang X, Wang G, Liu L, Zhang D. The mechanism of a chitosan-collagen composite film used as biomaterial support for MC3T3-E1 cell differentiation. *Scientific Reports.* 2016;6:39322.
10. Surattanawanich P, Janvikul W, Thavornyutikarn 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, January - April;1(1):2-8.
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 2011. 61-9 p.
12. Rao SB, Sharma CP. Use of chitosan as a biomaterial: studies on its safety and hemostatic potential. *Journal of biomedical materials research.* 1997;34(1):21-8.

13. Huang X, Sun Y, Nie J, Lu W, Yang L, Zhang Z, et al. Using absorbable chitosan hemostatic sponges as a promising surgical dressing. *International journal of biological macromolecules*. 2015;75:322-9.
14. Ong SY, Wu J, Moochhala SM, Tan MH, Lu J. Development of a chitosan-based wound dressing with improved hemostatic and antimicrobial properties. *Biomaterials*. 2008;29(32):4323-32.
15. Pippi R, Santoro M, Cafolla A. The effectiveness of a new method using an extra-alveolar hemostatic agent after dental extractions in older patients on oral anticoagulation treatment: an inpatient study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2015;120(1):15-21.
16. Kumar KR, Kumar J, Sarvagna J, Gadde P, Chikkaboriah S. Hemostasis and Post-operative Care of Oral Surgical Wounds by Hemcon Dental Dressing in Patients on Oral Anticoagulant Therapy: A Split Mouth Randomized Controlled Clinical Trial. *Journal of clinical and diagnostic research : JCDR*. 2016;10(9):Zc37-zc40.
17. Okamoto Y, Yano R, Miyatake K, Tomohiro I, Shigemasa Y, Minami S. Effects of chitin and chitosan on blood coagulation 2003. 337-42 p.
18. Lootsik MD, Bilyy R, Lutsyk MM, Stoika RS. Preparation of chitosan with high blood clotting activity and its hemostatic potential assessment 2015. 32-40 p.
19. Pippi R, Santoro M, Cafolla A. The Use of a Chitosan-Derived Hemostatic Agent for Postextraction Bleeding Control in Patients on Antiplatelet Treatment. *J Oral Maxillofac Surg*. 2017;75(6):1118-23.
20. 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.
21. Janvikul W, Uppanan P, Kosorn W, Phusuksombati D, Prateepasen R. Evaluation of Efficacy of Chitosan Derivative Based Hemostat: In Vitro and In Vivo Studies. *Proceedings of the 2nd International Symposium on Biomedical Engineering (ISBME 2006)*. 2006, November 8-10:281-3.
22. Larry J. Peterson, Edward Ellis, James R. Itupp, R. Tucker. M. *Contemporary Oral and Maxillofacial Surgery*. 1988.
23. Rojwanakan M., S. R. *Principle of Oral Surgery*. 1994(1):40-54.

24. Loescher AR, Robinson PP. The effect of surgical medicaments on peripheral nerve function. *The British journal of oral & maxillofacial surgery*. 1998;36(5):327-32.
25. Aderibigbe BA, Buyana B. Alginate in Wound Dressings. *Pharmaceutics*. 2018;10(2):42.
26. Szekalska M, Pucikowska A, Szymańska E, Ciosek P, Winnicka K. Alginate: Current Use and Future Perspectives in Pharmaceutical and Biomedical Applications. *International Journal of Polymer Science*. 2016;2016:1-17.
27. 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.
28. Janvikul W, Uppanan P, Thavornyutikarn B, Prateepasen R. Calcium Alginate, N,O carboxymethylchitosan and Their Blends: In Vitro Biocompatibility and Biodegradability. *The World Congress on Bioengineering 2007 (WACBE)*. 2007.
29. Janvikul W, Thavornyutikarn B. New Route to the Preparation of Carboxymethylchitosan Hydrogels. *Journal of Applied Polymer Science - J APPL POLYM SCI*. 2003;90:4016-20.
30. Dhanesuan N, Srisuparb D, Tiranathanagul S, Rungsiyanont S. The in vitro effect of royal jelly, *apis mellifera*, on proliferation of human gingival, periodontal ligament fibroblasts and human bone cells. *Thai Pharmaceutical and Health Science Journal*. 2554;2011, June 3:182-7.
31. Jonsson KB, Frost A, Nilsson O, Ljunghall S, Ljunggren O. Three isolation techniques for primary culture of human osteoblast-like cells: a comparison. *Acta orthopaedica Scandinavica*. 1999;70(4):365-73.
32. de Souza Costa CA, Hebling J, Scheffel DL, Soares DG, Basso FG, Ribeiro AP. Methods to evaluate and strategies to improve the biocompatibility of dental materials and operative techniques. *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials*. 2014;30(7):769-84.
33. Montazerolghaem M, Ning Y, Engqvist H, Karlsson Ott M, Tenje M, Mestres G. Simvastatin and zinc synergistically enhance osteoblasts activity and decrease the acute response of inflammatory cells. *J Mater Sci Mater Med*. 2016;27(2):23.
34. Ciccìu M, Fiorillo L, Cervino G. Chitosan Use in Dentistry: A Systematic Review of Recent Clinical Studies. *Marine drugs*. 2019;17(7):417.

35. Qasim SB, Zafar MS, Najeeb S, Khurshid Z, Shah AH, Husain S, et al. Electrospinning of Chitosan-Based Solutions for Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Int J Mol Sci*. 2018;19(2):407.
36. Liu L, Lv Q, Zhang Q, Zhu H, Liu W, Deng G, et al. Preparation of Carboxymethyl Chitosan Microspheres and Their Application in Hemostasis. *Disaster Medicine and Public Health Preparedness*. 2017;11(6):660-7.
37. Hattori H, Amano Y, Nogami Y, Takase B, Ishihara M. Hemostasis for severe hemorrhage with photocrosslinkable chitosan hydrogel and calcium alginate. *Annals of biomedical engineering*. 2010;38(12):3724-32.
38. 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. *Turkish Journal of Trauma and Emergency Surgery*. 2013;19(3):195-9.
39. Austin SK. Haemostasis. *Medicine*. 2017;45(4):204-8.
40. Li J, Cao W, Lv XX, Jiang L, Li YJ, Li WZ, et al. Zeolite-based hemostat QuikClot releases calcium into blood and promotes blood coagulation in vitro. *Acta pharmacologica Sinica*. 2013;34(3):367-72.
41. Li D, Li P, Zang J, Liu J. Enhanced hemostatic performance of tranexamic acid-loaded chitosan/alginate composite microparticles. *J Biomed Biotechnol*. 2012;2012:981321-.
42. Shi X, Fang Q, Ding M, Wu J, Ye F, Lv Z, et al. Microspheres of carboxymethyl chitosan, sodium alginate and collagen for a novel hemostatic in vitro study. *J Biomater Appl*. 2016;30(7):1092-102.
43. Howling GI, Dettmar PW, Goddard PA, Hampson FC, Dornish M, Wood EJ. The effect of chitin and chitosan on the proliferation of human skin fibroblasts and keratinocytes in vitro. *Biomaterials*. 2001;22(22):2959-66.
44. Czekanska EM, Stoddart MJ, Richards RG, Hayes JS. In search of an osteoblast cell model for in vitro research. *European cells & materials*. 2012;24:1-17.
45. Marolt D, Rode M, Kregar-Velikonja N, Jeras M, Knezevic M. Primary human alveolar bone cells isolated from tissue samples acquired at periodontal surgeries exhibit sustained proliferation and retain osteogenic phenotype during in vitro expansion. *PloS one*. 2014;9(3):e92969-e.

46. Fernandes MH, Costa MA, Carvalho GS. Mineralization in serially passaged human alveolar bone cells. *J Mater Sci Mater Med.* 1997;8(2):61-5.
47. Perinpanayagam H, Martin T, Mithal V, Dahman M, Marzec N, Lampasso J, et al. Alveolar bone osteoblast differentiation and Runx2/Cbfa1 expression. *Arch Oral Biol.* 2006;51(5):406-15.
48. Coelho MJ, Fernandes MH. Human bone cell cultures in biocompatibility testing. Part II: effect of ascorbic acid, beta-glycerophosphate and dexamethasone on osteoblastic differentiation. *Biomaterials.* 2000;21(11):1095-102.
49. Beloti MM, Rosa AL. Osteoblast differentiation of human bone marrow cells under continuous and discontinuous treatment with dexamethasone. *Brazilian Dental Journal.* 2005;16:156-61.
50. Chavassieux PM, Chenu C, Valentin-Opran A, Merle B, Delmas PD, Hartmann DJ, et al. Influence of experimental conditions on osteoblast activity in human primary bone cell cultures. *J Bone Miner Res.* 1990;5(4):337-43.
51. Siggelkow H, Rebenstorff K, Kurre W, Niedhart C, Engel I, Schulz H, et al. Development of the osteoblast phenotype in primary human osteoblasts in culture: comparison with rat calvarial cells in osteoblast differentiation. *J Cell Biochem.* 1999;75(1):22-35.
52. Stein GS, Lian JB. Molecular mechanisms mediating proliferation/differentiation interrelationships during progressive development of the osteoblast phenotype. *Endocrine reviews.* 1993;14(4):424-42.
53. Pradel W, Mai R, Gedrange T, Lauer G. Cell passage and composition of culture medium effects proliferation and differentiation of human osteoblast-like cells from facial bone. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society.* 2008;59 Suppl 5:47-58.
54. Gruber R, Baron M, Busenlechner D, Kandler B, Fuerst G, Watzek G. Proliferation and osteogenic differentiation of cells from cortical bone cylinders, bone particles from mill, and drilling dust. *J Oral Maxillofac Surg.* 2005;63(2):238-43.

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	ทญ.กัลดิมาศ แพวพาลา
วัน เดือน ปี เกิด	2 พฤศจิกายน 2533
สถานที่เกิด	พะเยา
วุฒิการศึกษา	ปริญญาตรีทันตแพทยศาสตรบัณฑิต จากมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ พ.ศ. 2558
ที่อยู่ปัจจุบัน	300/43 หมู่บ้านกาญจกนก 8 ถนน ช้างเผือก ตำบล ช้างเผือก อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่ 50300

