

การศึกษาเพื่อเปรียบเทียบองค์ประกอบทางชีวภาพในน้ำเลือดที่อุดมไปด้วย
เกล็ดเลือดที่ได้จากการปั่นด้วยชุดปั่นแยกชนิดที่มีเจลกันและไม่มีเจลกัน
โดยใช้หลอดชุดปั่นสำเร็จรูปที่มีขายตามท้องตลาด

จักรวินท์ ดำรงค์วัฒนโกสิน

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาการชะลอวัยและฟื้นฟูสุขภาพ วิทยาลัยการแพทย์บูรณาการ
มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิตย์

พ.ศ. 2563

**Comparison of bioactive proteins in Platelet-rich plasma (PRP) obtained
from gel particles and non-gel particles by using
a commercial centrifuge column kit**

Akarawin Damrongwattanapokin

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science
Department of Anti-aging and Regenerative Medicine
College of Integrative Medicine, Dhurakij Pundit University**

2020

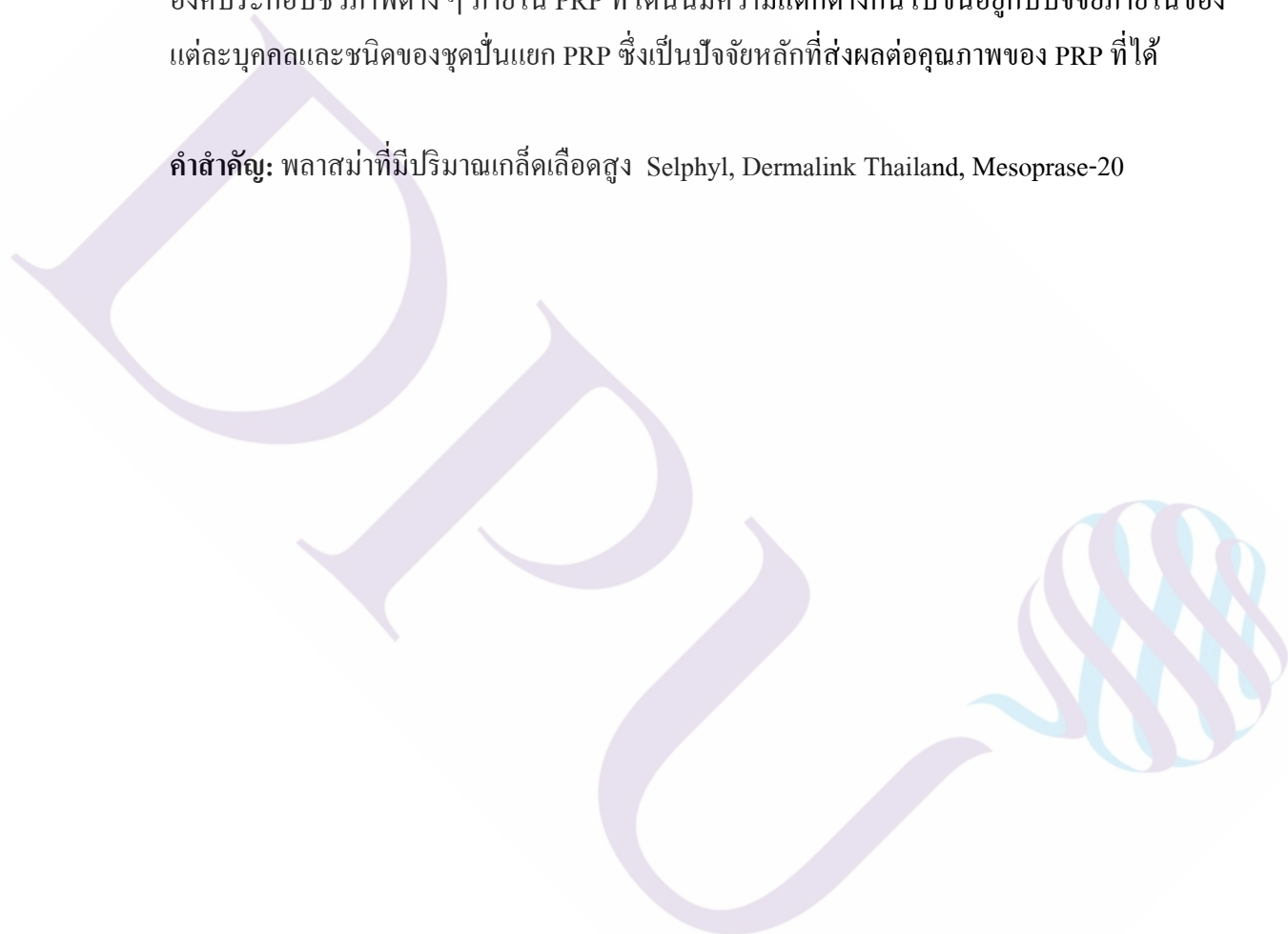
หัวข้อวิทยานิพนธ์	การศึกษาเพื่อเปรียบเทียบของค์ประกอบทางชีวภาพในน้ำเลือดที่อุดมไปด้วยเกล็ดเลือดที่ได้จากการปั่นด้วยชุดปั่นแยกชนิดที่มีเจลกันและไม่มีเจลกัน โดยใช้หลอดชุดปั่นสำเร็จรูปที่มีขายตามท้องตลาด
ชื่อผู้เขียน	อัครวินท์ คำรงค์วัฒน โภคิน
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นพ.พัฒนา เต็งอำนวย
สาขาวิชา	วิทยาการชะลอวัยและฟื้นฟูสุขภาพ
ปีการศึกษา	2563

บทคัดย่อ

การศึกษานี้เป็นการศึกษาเชิงทดลองเพื่อวิเคราะห์และเปรียบเทียบปริมาณองค์ประกอบทางชีวภาพหลังการปั่นแยก PRP โดยทำการเจาะเลือดจากกลุ่มอาสาสมัครเพศชายอายุระหว่าง 20 – 30 ปี จำนวน 5 คน โดยอาสาสมัคร 1 คน จะทำการปั่นแยกส่วนประกอบของ PRP โดยใช้ชุดปั่นแยก 2 ชนิด คือ ชนิดมีเจล Sodium Citrate Gel Separator tube (Selphyl, Dermalink Thailand) และชนิดไม่มีเจล Sodium Citrate column (Mesoprase-20, Celtac Thailand) ทำการปั่นแยกแล้วตรวจหาปริมาณองค์ประกอบชีวภาพภายใน PRP ได้แก่ เกล็ดเลือด เม็ดเลือดแดง และเม็ดเลือดขาว รวมทั้งปริมาณสารโปรตีนชีวภาพ (Growth factors Profile) ได้แก่ Platelet-derived growth factor-BB (PDGF-BB), Epidermal growth factor (EGF), Fibroblast growth factor-2 (FGF-2), Hepatocyte Growth factor (HGF) และสารบ่งชี้สภาวะการอักเสบ (Inflammatory profile) ได้แก่ Interlukine-8 (IL-8) โดยใช้หลักการ Magnetic Bead Immuno Chemiluminescence Assay ด้วยเครื่อง Luminex magpix (MERCK, Thailand) จากผลการทดลองพบว่า Selphyl สามารถปั่นแยก PRP แล้วมีจำนวนเม็ดเลือดขาวน้อยกว่า Mesoprase-20 (mean, 0.05 vs. 0.10, $p=0.028$) อย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่จำนวนเม็ดเลือดแดงและเกล็ดเลือดนั้นไม่มีความแตกต่างกัน ผลการเปรียบเทียบปริมาณสารโปรตีนชีวภาพใน PRP ทั้ง 2 ชนิด พบว่าระดับ PDGF-BB, HGF และ IL-8 ไม่มีความแตกต่างกัน ในขณะที่ระดับ EGF และ FGF-2 มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และพบว่าระดับ FGF-2 ไม่มีความสอดคล้องกับจำนวนเกล็ดเลือดที่ตรวจนับได้ โดยจำนวนเกล็ดเลือดใน PRP ที่ปั่นแยกได้จาก Selphyl มีค่าน้อยกว่า Mesoprase-20 (210.6 ± 58.95 vs. 261.8 ± 67.58 , $p = 0.140$) ตามลำดับ แต่กลับมีระดับ FGF-2 ที่สูงกว่า Mesoprase-20 (137.17 ± 11.77 vs. 127.28 ± 13.89 , $p = 0.034$) ตามลำดับ แต่เมื่อพิจารณาในระดับ EGF พบว่ามีความสอดคล้องกับจำนวนเกล็ดเลือดที่ตรวจวัดใน PRP ที่ปั่นแยกได้จากชุดปั่นแยกทั้ง 2 ชนิด (261.80 ± 126.7 vs.

392.10±158.72, $p = 0.040$) ตามลำดับ จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าชุดปั่นแยก PRP ของ Selphyl นั้นสามารถปั่นแยก PRP แล้วได้ องค์ประกอบทางชีวภาพที่สามารถตรวจพบได้ภายใน PRP โดยมีปริมาณของเม็ดเลือดขาวที่น้อยกว่าชุดปั่น Mesoprase-20 และมีจำนวนเกล็ดเลือด และเม็ดเลือดแดง รวมถึงสารโปรตีนชีวภาพ Cytokine, Chemokine Profiles และ Inflammatory maker นั้น มีความแตกต่างเล็กน้อยเมื่อเทียบกับ Mesoprase-20 และยังสามารถทำการเตรียมปั่นแยกสกัด PRP ได้จาก Whole blood โดยไม่ยุ่งยาก สะดวก รวดเร็วและเป็นระบบปิดอย่างสมบูรณ์ แต่อย่างไรก็ตาม องค์ประกอบชีวภาพต่าง ๆ ภายใน PRP ที่ได้ นั้นมีความแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับปัจจัยภายในของแต่ละบุคคลและชนิดของชุดปั่นแยก PRP ซึ่งเป็นปัจจัยหลักที่ส่งผลต่อคุณภาพของ PRP ที่ได้

คำสำคัญ: พลาสมาที่มีปริมาณเกล็ดเลือดสูง Selphyl, Dermalink Thailand, Mesoprase-20



Thesis Title	Comparison of bioactive proteins in Platelet-rich plasma (PRP) obtained from Gel particles and non-gel particles by using a commercial centrifuge column kit.
Author	Damrongwattanapokin Akarawin
Thesis Advisor	Teng-umnuay P., Asst. Prof. Dr. M.D.
Department	Anti-aging and Regenerative Medicine
Academic Year	2020

ABSTRACT

Evaluation of bioactive proteins in platelet-rich plasma after preparation, by using commercial centrifuge kits. Method: Peripheral blood samples were drawn from 5 healthy male donors, aged 20-30 and processed with 2 types of commercial centrifugation column kits; a gel separator column kit (Selphyl, Dermalink Thailand) and a non-gel separator column kit (Mesoprase-20, Celtac Thailand). The completed blood count was measured by an automated machine. Additionally, the bioactive proteins were examined with the help of a cytokine chemokine profile and inflammatory marker such as: Platelet-derived growth factor-BB (PDGF-BB), Epidermal growth factor (EGF), Fibroblast growth factor-2 (FGF-2), Hepatocyte Growth factor (HGF) and Interleukin-8 (IL-8). All results were analysed by the Magnetic Bead Immuno Chemiluminescence Assay method by Luminex magpix (Merck, Thailand). The results indicated that white blood cells in Selphyl showed significant differences in comparison to Mesoprase-20 values (mean, 0.05 vs. 0.10, $p = 0.028$), whereas the values of red blood cells and platelets showed no considerable deviations for both centrifuge kits. The cytokine chemokine profile and inflammatory marker analysis indicated no significant differences, except for EGF and FGF-2. When we compared the levels of EGF and FGF-2 with the ones of the recovered platelets, it became evident that these did not correlate with the concentration of platelets. The platelets count isolated from Selphyl was lower than from Mesoprase-20 (210.6 ± 58.95 vs. 261.8 ± 67.58 respectively, $p = 0.140$), other than the FGF-2 level that turned out to be higher (137.17 ± 11.77 vs. 127.28 ± 13.89 , $p = 0.034$). When we considered the EGF level, both PRP Kits correlated with platelets count (261.80 ± 126.7 vs. 392.10 ± 158.72 , $p = 0.040$). The experiment showed that Selphyl is more

efficient than Mesoprase-20 when isolating PRP with less white blood cells. Regardless, red blood cells, platelets and bioactive proteins showed slightly significant differences as compared to Mesoprase-20. It also became evident that Selphyl was more useful, practical, convenient and completely closed systemic when collecting and isolating PRP from whole blood. However, the variation of bioactive proteins in platelet-rich plasma depended on individual variations as it directly affected the quality of platelet-rich plasma.

Keywords: Platelet-rich Plasma, Selphyl, Dermalink Thailand, Mesoprase-20



กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้อย่างสมบูรณ์ด้วยความกรุณาและความช่วยเหลืออย่างดียิ่งจาก ดร.นพ.พัฒนา เต็งอำนวย อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก และ นพ. ญัฐวุฒิ วงษ์ดีไทย อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม และ ผศ.ดร.ธิภูริรัตน์ ทิพรส อาจารย์วิชาการทางสถิติ และนาย เทพพิทักษ์ คำเมือง ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำและข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์และผู้ช่วยการเรียนการสอนทุก ๆ ท่านของสาขาเวชศาสตร์ชะลอวัย และฟื้นฟูสุขภาพสำหรับความรู้ คำสั่งสอน คำแนะนำและความช่วยเหลือตลอดระยะเวลาศึกษาจนกระทั่งวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณอาสาสมัครทุก ๆ ท่านที่มีความยินดีและเต็มใจเข้าร่วมงานวิจัย และอนุเคราะห์เวลาสำหรับเข้าร่วมการศึกษาวิจัย ขอกราบขอบพระคุณ คุณขวัญฤทัย คำรงค์วัฒน โภคิน ผู้บริหารและกรรมการผู้จัดการ บริษัท รมย์รวินท์ คลินิก และผู้บริหารและกรรมการผู้จัดการ บริษัทเชล สำหรับความร่วมมือ อำนวยความสะดวกและสนับสนุนการศึกษาวิจัยให้สำเร็จลุล่วงเป็นอย่างดี

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา สำหรับการอบรมสั่งสอนและคำแนะนำ การสนับสนุนและกำลังใจ ทำให้การทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้อย่างสมบูรณ์

ผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่า วิทยานิพนธ์ฉบับนี้จะเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาวิจัยในขั้นต่อ ๆ ไปไม่มากนักน้อย ผู้วิจัยขอขอบคุณประโยชน์นี้ให้แก่บิดา มารดา คณาจารย์และผู้ช่วยการเรียนการสอน อาสาสมัคร และผู้ให้ความร่วมมือในการทำวิทยานิพนธ์ทุก ๆ ท่าน

อักรวินท์ คำรงค์วัฒน โภคิน

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ฅ
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ช
สารบัญตาราง	ญ
สารบัญภาพ	ฎ
บทที่	
1. บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	4
1.3 สมมติฐานของการวิจัย	4
1.4 ขอบเขตของการวิจัย	4
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย.....	4
1.6 นิยามศัพท์เฉพาะในการวิจัย	7
1.7 กรอบแนวคิดในการวิจัย.....	6
2. แนวคิด ทฤษฎี และผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	8
2.1 แนวคิดและทฤษฎีเกี่ยวกับสรีรวิทยาของเกล็ดเลือดและโกรทแฟกเตอร์.....	8
2.2 แนวคิดและทฤษฎีเกี่ยวกับ Platelet-Rich Plasma	20
2.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	28
3. ระเบียบวิธีวิจัย.....	30
3.1 เครื่องมือที่ใช้ในการเก็บรวบรวมข้อมูลประชากรและตัวอย่าง	30
3.2 วิธีการเก็บรวบรวมข้อมูล.....	31
3.3 วิธีการวิเคราะห์ข้อมูลหรือสถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล	44
4. ผลการวิเคราะห์ข้อมูล	45
4.1 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางด้านโลหิตวิทยา	45
4.2 ผลการวิเคราะห์ Cytokines และ Chemokines	47

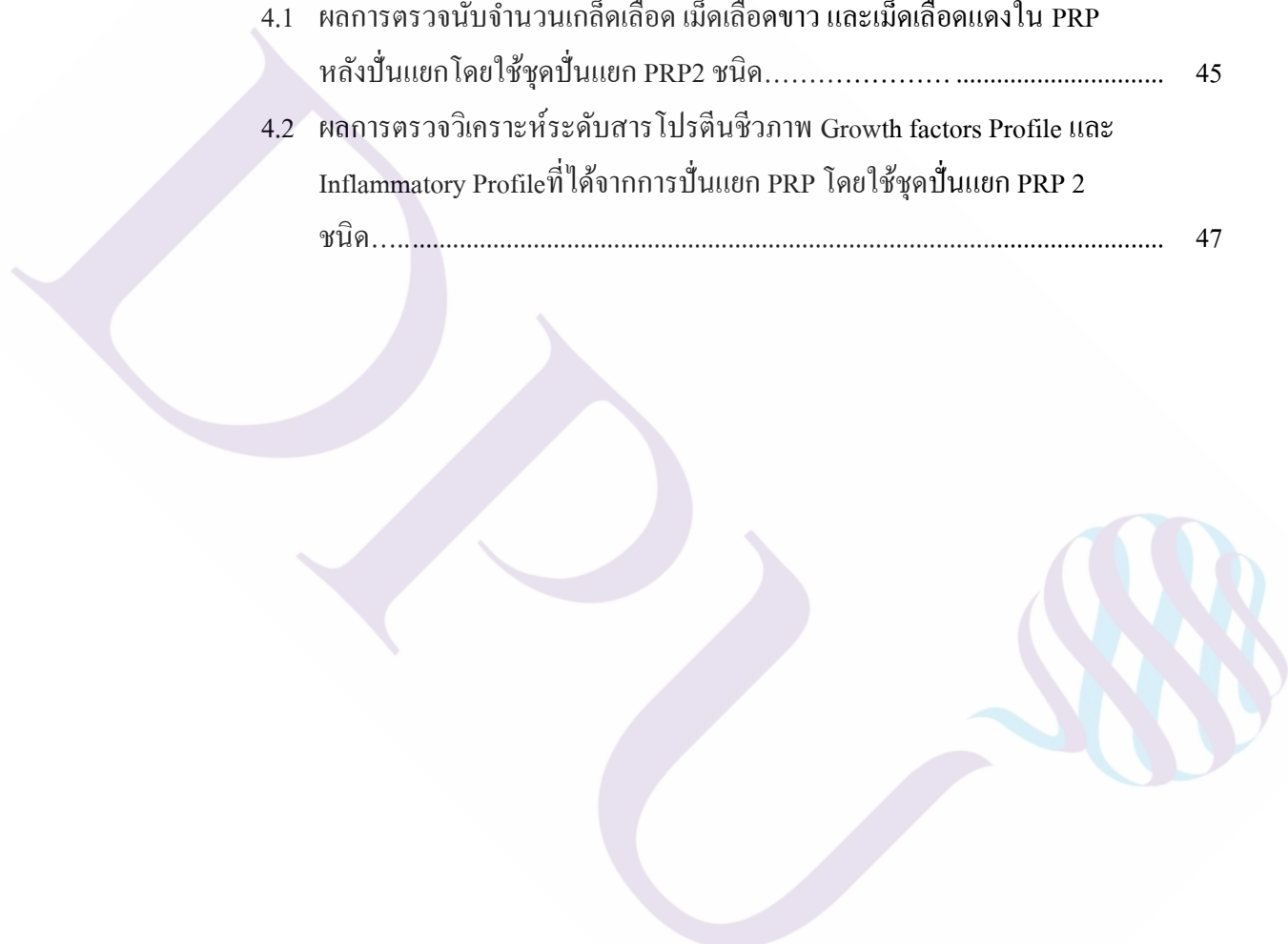
สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
5. สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ	50
5.1 สรุปผลการวิจัย.....	50
5.2 อภิปรายผลการวิจัย.....	50
5.3 ข้อเสนอแนะ.....	52
บรรณานุกรม.....	53
ประวัติผู้เขียน	59



สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 แหล่งที่มาและหน้าที่ทางชีวภาพของโกรทแฟคเตอร์ ของเกล็ดเลือด	11
2.2 ชนิดและลักษณะเฉพาะของโกรทแฟคเตอร์ ของเกล็ดเลือด	15
2.3 ชนิดและลักษณะเฉพาะของ Interleukin	17
4.1 ผลการตรวจนับจำนวนเกล็ดเลือด เม็ดเลือดขาว และเม็ดเลือดแดงใน PRP หลังปั่นแยกโดยใช้ชุดปั่นแยก PRP2 ชนิด.....	45
4.2 ผลการตรวจวิเคราะห์ระดับสาร โปรตีนชีวภาพ Growth factors Profile และ Inflammatory Profileที่ได้จากการปั่นแยก PRP โดยใช้ชุดปั่นแยก PRP 2 ชนิด.....	47

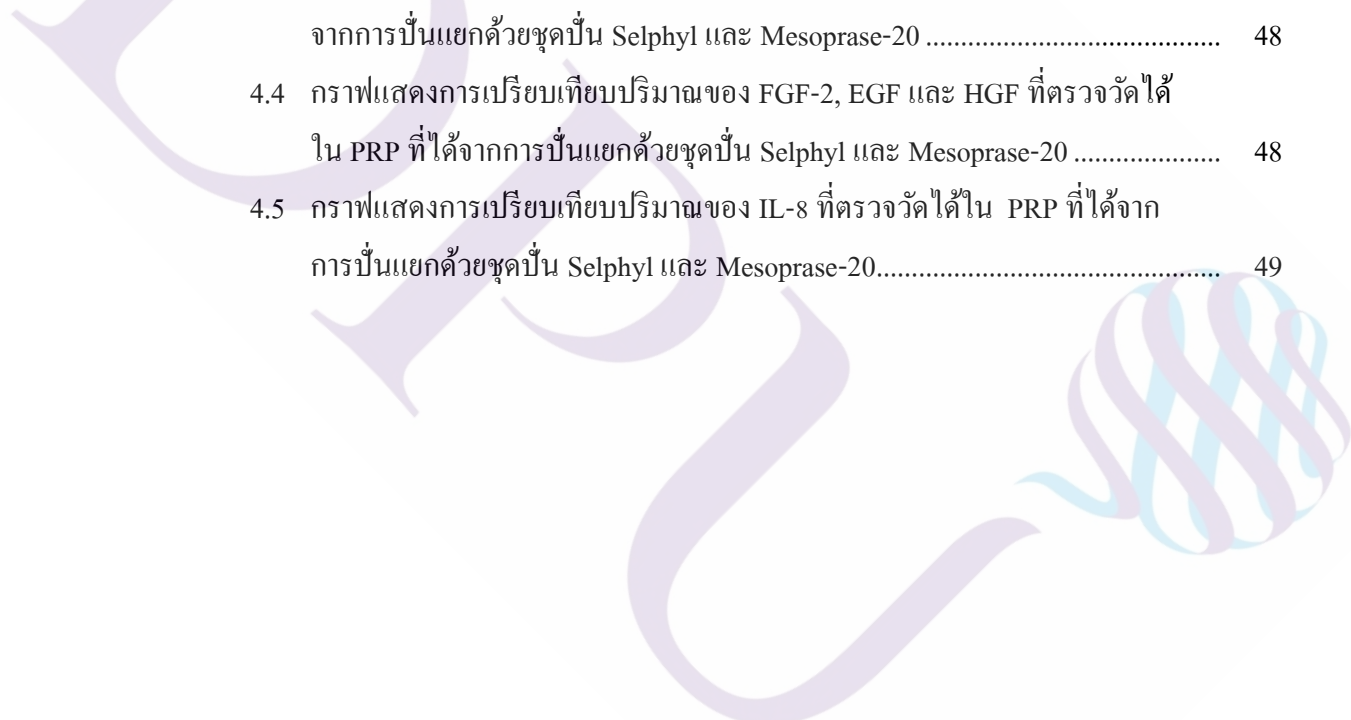


สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1.1 แสดงผลการปั่นแยก PRP	6
1.2 กรอบแนวคิดในการวิจัย	7
2.1 แสดงที่มาของเซลล์เลือดและเม็ดเลือดชนิดต่าง ๆ จากเซลล์ต้นกำเนิดในไขกระดูก (totipotent marrow stem cells)	8
2.2 เซลล์เลือดออกมาจากเซลล์เมกาคาริโอไซต์.....	9
2.3 โครงสร้างของเซลล์เลือดโดยพบแกรนูลหลายแบบที่อยู่ภายใน	9
2.4 ภาพแสดงถึงโครงสร้างของ HGF และ ตัวรับของ HGF.....	20
2.5 วิธีการเตรียม PRP	23
2.6 เปรียบเทียบโปรโตคอลต่าง ๆ และผล Platelet ที่ได้.....	25
3.1 รูปแสดงการแยก PRP โดยใช้ชุดปั่นแยกทั้ง 2 ชนิด แสดงให้เห็นถึงชั้น PRP Buffy coat และ RBC หลังปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง	33
3.2 รูปแสดงเครื่องปั่นและอุปกรณ์ชุดปั่นแยก PRP ยี่ห้อ Selphyl.....	34
3.3 รูปแสดงรายละเอียดของอุปกรณ์ชุดปั่นแยก PRP ยี่ห้อ Selphyl.....	35
3.4 รูปแสดงรายละเอียดขั้นตอนการปั่นแยก PRP โดยชุดปั่นแยกยี่ห้อ Selphyl.....	36
3.5 รูปแสดงเครื่องปั่นและอุปกรณ์ชุดปั่นแยก PRP ยี่ห้อ Mesoprax-20.....	37
3.6 รูปแสดงรายละเอียดขั้นตอนการปั่นแยก PRP ยี่ห้อ Mesoprax-20	38
3.7 รูปแสดงหลักการในการตรวจวัดด้วยเครื่อง Luminex magpix 200.....	39
3.8 รูป A แสดงการทำงานภายในเครื่อง Luminex magpix 200 และรูป B แสดงหลักการในการจับระหว่างเม็ดแม่เหล็กที่ถูกโค้ดไว้ด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะกับ Cytokines หรือ Chemokines	40
3.9 รูปแสดงเครื่อง Luminex magpix 200	41
3.10 รูปแสดงตัวอย่างชุดตรวจ Human Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel - Immunology Multiplex Assay (A) และ Human Circulating Cancer Biomarker Magnetic Bead Panel 4 - Cancer Multiplex Assay (B).....	41
3.11 รูปแสดงเครื่องตรวจวัดอัตโนมัติสำหรับตรวจหาค่าความสมบูรณ์ของเม็ดเลือด (Completed blood count, CBC) ยี่ห้อ Firmer BC 5300.....	42

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
3.12 รูปแสดงถึงหลักการการตรวจวัดหาค่าความสมบูรณ์ของเม็ดเลือด (Completed blood count, CBC).....	42
3.13 รูปแสดงถึงหลักการทำงานของเครื่อง Flow cytometry.....	43
4.1 กราฟแสดงการเปรียบเทียบจำนวนเกล็ดเลือดที่ตรวจวัดได้ใน PRP ที่ได้จากการปั่นแยกด้วยชุดปั่น Selphyl และ Mesoprase-20.....	46
4.2 กราฟแสดงการเปรียบเทียบจำนวนเม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาวที่ตรวจวัดได้ใน PRP ที่ได้จากการปั่นแยกด้วยชุดปั่น Selphyl และ Mesoprase-20	46
4.3 กราฟแสดงการเปรียบเทียบปริมาณของ PDGF-BB ที่ตรวจวัดได้ใน PRP ที่ได้จากการปั่นแยกด้วยชุดปั่น Selphyl และ Mesoprase-20	48
4.4 กราฟแสดงการเปรียบเทียบปริมาณของ FGF-2, EGF และ HGF ที่ตรวจวัดได้ใน PRP ที่ได้จากการปั่นแยกด้วยชุดปั่น Selphyl และ Mesoprase-20	48
4.5 กราฟแสดงการเปรียบเทียบปริมาณของ IL-8 ที่ตรวจวัดได้ใน PRP ที่ได้จากการปั่นแยกด้วยชุดปั่น Selphyl และ Mesoprase-20.....	49



บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

Platelets (เกล็ดเลือด) หรืออีกชื่อหนึ่งคือ Thrombocytes คือ ชิ้นส่วนของ cytoplasm ที่ถูกพัฒนามาจากเซลล์ต้นกำเนิดเกล็ดเลือดที่ชื่อว่า Megakaryocyte (เมกกาคาริโอไซต์) มีขนาดประมาณ 2 ไมครอน (μm) โดยมีโครงสร้างที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์เช่น Mitochondria (ไมโทคอนเดรีย) Microtubules (ไมโครทิวบูล) Ribosome (ไรโบโซม) และ Granules (แกรนูล) 3 ชนิด ได้แก่ Alpha Granules (อัลฟาแกรนูล) Dense Granules (เดนส์แกรนูล) และ Lysosome (ไลโซโซม) โดยอัลฟาแกรนูลเป็นแกรนูลที่มีจำนวนมากที่สุดในเกล็ดเลือด (Braun et al, 2014) และนอกจากนี้ยังประกอบไปด้วยสาร Bioactive Proteins (โปรตีนชีวภาพ) ต่าง ๆ อันได้แก่ Growth Factors (โกรทแฟกเตอร์) Cytokines (ไซโตไคน์) Chemokines (เคโมไคน์) Adhesion Molecules (สารยึดเกาะ) และโมเลกุลอื่น ๆ ซึ่งล้วนแล้วแต่มีบทบาทสำคัญในการ Homeostasis (สร้างสมดุลของร่างกาย) และ Tissue Remodeling (การสร้างใหม่ของเนื้อเยื่อ) (Harrison et al, 1993) จากการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณสารโปรตีนชีวภาพใน เกล็ดเลือดแสดงให้เห็นว่าการตอบสนองของ เกล็ดเลือดจากการกระตุ้นด้วยทรอมบิน (Thrombin) นั้นจะทำให้เกล็ดเลือดหลั่งสารโปรตีนชีวภาพออกมา มากกว่า 300 ชนิด (Sánchez-González et al, 2012) ซึ่งสารโปรตีนชีวภาพเหล่านี้จะก่อให้เกิดกระบวนการซ่อมแซมเซลล์ของเซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (Mesenchymal cells) (Angel et al, 2006; Latalski et al, 2011; Gaissmaier et al, 2005) และนอกจากนี้ไซโตไคน์และเคโมไคน์ที่พบได้ใน Plasma (พลาสมา) ที่มีปริมาณเกล็ดเลือดเข้มข้น (Platelets-Rich Plasma/PRP) นั้นสามารถลดการ Inflammation (อักเสบ) และยังสามารถเสริมสร้างกระบวนการฟื้นฟูและซ่อมแซมส่วนต่าง ๆ ของร่างกาย ได้ อีก ด้วย (Regenerative processing) (Lucarelli et al, 2003; Corps et al, 2002; Goldring et al, 2011; Rutgers et al, 2010; Fedorczyk et al, 2010) การใช้ PRP เพื่อเป็นแหล่งของสารโปรตีนชีวภาพนั้นได้ถูกใช้เป็นครั้งแรกเพื่อเสริมให้กับโครงสร้างของไฟบรินในร่างกาย (Allogeneic fibrin glue) (Braun et al, 2014) แต่อย่างไรก็ตามการได้มาซึ่งสารโปรตีนชีวภาพในเกล็ดเลือดเข้มข้น (Platelets concentrated) เป็นที่น่าสนใจอย่างมากนอกจากจะสามารถกระตุ้นการรักษา ฟื้นฟูและซ่อมแซมเนื้อเยื่อได้แล้ว ยังเป็นทางเลือกหนึ่งที่มีต้นทุนต่ำ (Alsousou et al, 2009) และมีประสิทธิภาพในการรักษา นอกจากนี้สารที่นำมาใช้เตรียมเป็น PRP นั้น เป็นสารที่สามารถเตรียมได้

โดยการกำจัด Red blood cell (เม็ดเลือดแดง) และ White blood cell (เม็ดเลือดขาว) ออก คงเหลือไว้เฉพาะเกล็ดเลือดที่มีขนาดเล็กและน้ำหนักเบาละลายอยู่ในพลาสมาเท่านั้น

PRP คือ พลาสมาที่มีความเข้มข้นของเกล็ดเลือดมากกว่าค่าอ้างอิงปกติ โดยปกติแล้วค่าอ้างอิงของ เกล็ดเลือดอยู่ที่ 200,000 เซลล์ต่อไมโครลิตร (cells/ μ L) หลังจากผ่านกระบวนการทำให้เข้มข้นขึ้นความเข้มข้นของเกล็ดเลือดจะอยู่ที่ 1,000,000 cells/ μ L ซึ่งมากกว่าถึง 5 เท่า (Marx RE, 2004; Wasterlain et al, 2013) PRP ที่ได้จากการเตรียมเลือดของตนเอง (Autologous PRP) ถือว่าปลอดภัยสำหรับใช้ในทางคลินิก เนื่องจากไม่ทำให้เกิดปฏิกิริยากับผู้รับแล้วยังไม่มีโรคติดต่ออีกด้วย (Angel et al, 2006; Anitua et al, 2006) แต่อย่างไรก็ตามการใช้ PRP ยังคงมีปัจจัยบางอย่างที่ไม่สามารถควบคุมได้และส่งผลกระทบต่อคุณภาพและประสิทธิภาพของ PRP เช่น การเตรียม PRP ที่เตรียมได้จากเลือดของผู้ป่วยที่มีโรคระบบภูมิคุ้มกัน (Immune diseases) หรือโรคที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ (Inflammatory diseases) เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีการศึกษาและวิจัยไม่มากนักที่ระบุถึงผลกระทบของการนำ PRP มาใช้ในการรักษา การประยุกต์ใช้ PRP ในทางคลินิกหรือแม้กระทั่งองค์ประกอบทางชีวภาพภายในของ PRP ที่เตรียมใช้ในผู้ป่วย (Dohan Ehrenfest et al, 2009) นอกจากนี้ยังไม่มีข้อมูลที่แน่ชัดเกี่ยวกับประสิทธิภาพของ PRP ในการรักษา ระยะเวลา ผลข้างเคียง อุบัติการณ์รวมถึงอาการไม่พึงประสงค์จากการใช้ PRP ทั้งนี้การเตรียม PRP ยังไม่มีสูตรและวิธีการเตรียมต่าง ๆ ที่เหมาะสมเพื่อให้สอดคล้องกับองค์ประกอบที่มีอยู่ใน PRP (Wasterlain et al, 2013; Dohan Ehrenfest et al, 2009; Taylor et al, 2011)

PRP ถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายในการรักษาและเสริมสร้างกระบวนการฟื้นฟูและซ่อมแซมส่วนต่าง ๆ ของร่างกายโดยเฉพาะอย่างยิ่งทางด้านศัลยกรรมกระดูก เวชศาสตร์การกีฬา และทันตกรรม มีนักวิจัยหลายท่านได้ประยุกต์ใช้ PRP ในการต่อกระดูกเร่งการรักษาบาดแผลของเนื้อเยื่อเช่น เส้นเอ็น (Ligaments) กล้ามเนื้อ (Muscles) หรือกระดูกอ่อน (Tendons) (Latalski et al, 2011; Gott et al, 2011; Schettino et al, 2011; Gómez-Caro et al, 2011; Sampson et al, 2008) แต่อย่างไรก็ตามยังคงมีข้อถกเถียงถึงผลเสียของการใช้ PRP เพื่อการรักษาโดยให้ผลการรักษาในทางลบอยู่ (De Jonge et al, 2011; Mishra et al, 2009; De Vos et al, 2010)

อีกหนึ่งประเด็นที่น่าสนใจคือการพบการปนเปื้อนของเม็ดเลือดแดงใน PRP สามารถบ่งบอกถึงประสิทธิภาพของ PRP และความสำเร็จหรือความล้มเหลวของการรักษาโดยใช้ PRP ได้ อีกทั้งยังมีรายงานจากงานวิจัยพบว่า เม็ดเลือดแดงที่ปนเปื้อนใน PRP ที่เตรียมสำหรับใช้ทำหัตถการฉีดข้อเข่า (Intraarticular Injection) นั้น สามารถนำไปสู่การระคายเคืองบริเวณเยื่อหุ้ม Synovial ได้ แต่ในขณะเดียวกันการปนเปื้อนของเม็ดเลือดขาวนั้น อาจมีผลเกี่ยวข้องกับการป้องกันเนื้อเยื่อและการอักเสบที่จะเกิดขึ้นได้ (Latalski et al, 2011) แต่ในความเป็นจริงแล้วการพบการปนเปื้อนของ

เม็ดเลือดขาวแสดงให้เห็นถึงการเพิ่มขึ้นของสารชักนำการอักเสบ (Inflammatory cytokines) อย่างมีนัยสำคัญและส่งผลก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสัณฐานภาพและประสิทธิภาพของการฟื้นฟูซ่อมแซมเนื้อเยื่อของ PRP (Wasterlain et al, 2013; Sundman et al, 2011) รวมถึงอาการปวดและเป็นการจำกัดประสิทธิภาพการใช้งานของ PRP อีกด้วย ในทางตรงกันข้ามบางงานวิจัยพบว่าการปนเปื้อนของเม็ดเลือดขาวใน PRP อาจมีประโยชน์เป็นผลทำให้เกิดการป้องกันและยับยั้งแบคทีเรียใน PRP ได้ (Braun et al, 2014)

ปัจจุบันมีวิธีการเตรียม PRP จากเลือดครบส่วน (Whole blood) มีหลายวิธีด้วยกัน (Anitua et al, 2006; Dohan Ehrenfest et al, 2009) แต่วิธีที่นิยมเตรียมและมีประสิทธิภาพมากที่สุดคือ วิธีระบบเปิด (Open method) โดยใช้หลอดพลาสติก (Columns) ที่มีอยู่ในชุดปั่นแยก PRP สำเร็จรูปทำการปั่นแยกส่วนประกอบของเลือดจาก Whole blood แล้วดูดส่วนที่เป็น Plasma มาเตรียมเป็น PRP (De Vos et al, 2010) อย่างไรก็ตามชุดปั่นแยก PRP สำเร็จรูปเหล่านั้นไม่สามารถระบุได้อย่างชัดเจนถึงองค์ประกอบภายในของ PRP ที่สกัดได้จาก Whole blood

ในประเทศไทยยังคงมีงานวิจัยที่ศึกษาถึงข้อมูลและอธิบายถึงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ สาร โปรตีน ชีวภาพ Cytokines Chemokine Profiles และ Inflammatory markers และองค์ประกอบทางชีวภาพภายในของ PRP ยังคงมีอยู่อย่างจำกัด ทั้งนี้ผู้วิจัยมีความสนใจที่จะศึกษาถึงองค์ประกอบทางชีวภาพภายใน PRP และคุณภาพของ PRP โดยการปั่นแยกด้วยชุดปั่นแยก PRP ที่แตกต่างกัน 2 ชนิด เพื่อเปรียบเทียบพร้อมทั้งหาความสัมพันธ์ขององค์ประกอบและสาร โปรตีนชีวภาพภายใน PRP ก่อนและหลังปั่นแยกโดยใช้ชุดปั่นแยก PRP ชนิดไม่มีเม็ดเจลกั้น (Non-gel separator) โดยใช้ Sodium Citrate Tube (Mesoprax-20, Celtac) และชุดปั่นแยก PRP ชนิดมีเม็ดเจลกั้น (Gel Separator) โดยใช้ Sodium Citrate Gel Separator tube (Selphyl, Dermalink) ในการปั่นแยกและสกัด PRP จาก Whole blood แล้วทำการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างเลือดก่อนและเปรียบเทียบถึงองค์ประกอบทางชีวภาพของ PRP โดยทำการศึกษาหาความสัมพันธ์ของจำนวนเกล็ดเลือด (Platelet count) เม็ดเลือดขาวและเม็ดเลือดแดงก่อนและหลังปั่น รวมถึงปริมาณของสาร โปรตีนชีวภาพ Cytokines Chemokine Profiles) ได้แก่ Platelet-derived growth factor-BB (PDGF-BB) Epidermal growth factor (EGF) Fibroblast growth factor-2 (FGF-2) Hepatocyte Growth factor (HGF) และ Leptin สารบ่งชี้สภาวะการอักเสบ (Inflammatory markers) ได้แก่ Interlukine-8 (IL-8) หลังปั่นแยก PRP

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อเปรียบเทียบและอธิบายผลการตรวจวิเคราะห์จำนวนเกล็ดเลือด เม็ดเลือดแดง และเม็ดเลือดขาว ใน PRP ก่อนและหลังปั่นแยก ระหว่างชุดปั่นแยก PRP ชนิดไม่มีเม็ดยก (Non-gel separator) Mesoprase-20, Celtac และชุดปั่นแยก PRP ชนิดมีเม็ดยก (Gel Separator) Selphyl, Dermalink

2. เพื่อเปรียบเทียบจำนวนของเกล็ดเลือดมีผลต่อปริมาณของ Cytokine Chemokine Profiles และ Inflammatory makers หลังการปั่นแยก PRP ระหว่างชุดปั่นแยก PRP ชนิดไม่มีเม็ดยก (Non-gel separator) Mesoprase-20 Celtac และชุดปั่นแยก PRP ชนิดมีเม็ดยก (Gel Separator) Selphyl Dermalink

1.3 สมมติฐานของการวิจัย

1. ผลการตรวจวิเคราะห์จำนวนเกล็ดเลือด เม็ดเลือดแดง และเม็ดเลือดขาว ใน PRP ก่อนและหลังปั่นแยกมีความแตกต่างกัน ระหว่างชุดปั่นแยก PRP ชนิดไม่มีเม็ดยก (Non-gel separator) Mesoprase-20, Celtac และชุดปั่นแยก PRP ชนิดมีเม็ดยก (Gel Separator) Selphyl, Dermalink

2. จำนวนของเกล็ดเลือดมีผลต่อปริมาณของ Cytokine Chemokine Profiles และ Inflammatory makers หลังการปั่นแยก PRP มีความแตกต่างกัน ระหว่างชุดปั่นแยก PRP ชนิดไม่มีเม็ดยก (Non-gel separator) Mesoprase-20, Celtac และชุดปั่นแยก PRP ชนิดมีเม็ดยก (Gel Separator) Selphyl, Dermalink

1.4 ขอบเขตของการวิจัย

กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัย

กลุ่มตัวอย่างเป็นอาสาสมัครเพศชายจำนวน 5 คน ที่มีอายุเฉลี่ย 20-30 ปี โดยไม่มีโรคหรือประวัติทางพันธุกรรมเกี่ยวกับเกล็ดเลือด หรือการแข็งตัวของเลือด และไม่มีประวัติเคยติดเชื้อหรือใช้ยาต้านการอักเสบหรือยาต้านการแข็งตัวของเลือดเช่น Warfarin Heparin อย่างน้อย 10 วัน ก่อนทำการตรวจวิเคราะห์

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

จากการวิจัยในครั้งนี้ ทำให้ทราบถึงความแตกต่างของปริมาณองค์ประกอบทางชีวภาพ หลังการปั่นแยก PRP ของชุดปั่นแยก 2 ชนิดคือ ชนิดมีเจล Sodium Citrate Gel Separator tube

(Selphyl Dermalink Thailand) และชนิดไม่มีเจล Sodium Citrate column (Mesoprase-20 Celtac Thailand) โดยสามารถนำไปเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการดำเนินยุทธศาสตร์ปรับเปลี่ยนในการเตรียม PRP เพื่อใช้ในการรักษาคนไข้ และยังสามารถคุ้มค่าใช้จ่ายในการรักษาเพื่อประโยชน์สูงสุดในการรักษาคนไข้

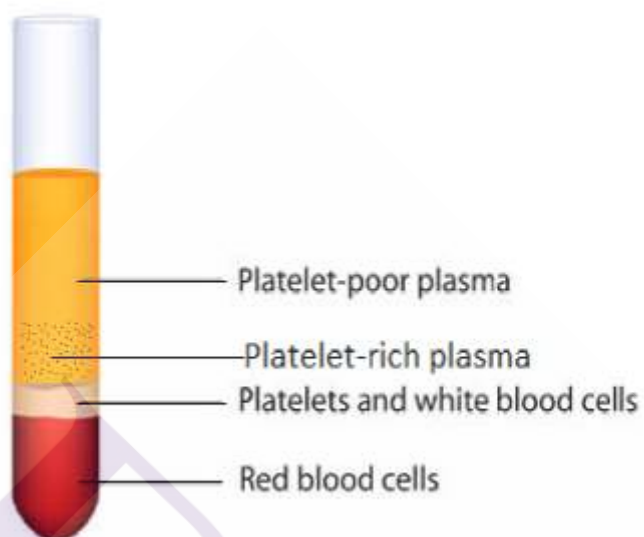
1.6 นิยามศัพท์เฉพาะในการวิจัย

พลาสมา (Plasma) หมายถึงน้ำเลือดที่มีลักษณะเป็นของเหลว สีเหลือง ใส โดยมีการเติมสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด (Anti-coagulant) ลงไปเพื่อให้คงสภาพความเป็นของเหลว โดยพลาสมาจะคิดเป็นสัดส่วน 55 % ของส่วนประกอบของเลือดที่เป็นของเหลวในเลือดทั้งหมดในร่างกาย ที่ได้จากการนำเลือดไปปั่นแยกเอาส่วนที่เป็นของเหลวออกจากส่วนประกอบอื่น ๆ ของเลือดที่เป็นของแข็งอันได้แก่ เม็ดเลือดแดง เม็ดเลือดขาวและ เกล็ดเลือด ในพลาสมายังมีโปรตีนหลายชนิด ได้แก่ ไฟบริโนเจน (Fibrinogen) แอลบูมิน (Albumin) โกลบูลิน (Globulin) เป็นต้น (Alves et al, 2017)

เกล็ดเลือด (Platelets) คือส่วนของของเหลวภายในเซลล์หรือที่เรียกว่าไซโตพลาสซึม (Cytoplasm) ของเซลล์เมกาคาริโอไซต์ (Megakaryocyte) ที่เป็นระยะหนึ่งของเมกาคาริโอ بلاสต์ (Megakaryoblast) ซึ่งถูกสร้างขึ้นมาจากไขกระดูก (Bone marrow) เกล็ดเลือดมีรูปร่างไม่แน่นอนและมีอายุเฉลี่ย 9-12 วัน หลังจากนั้นจะถูกทำลายที่ม้าม ในเลือดของคนมีปริมาณเกล็ดเลือดประมาณ 150,000-500,000 เซลล์ต่อไมโครลิตร โดยจำนวน 1/3 ของทั้งหมดจะอยู่ที่ม้าม และอวัยวะที่เกี่ยวข้องกับการไหลเวียนโลหิต (Alves et al, 2017)

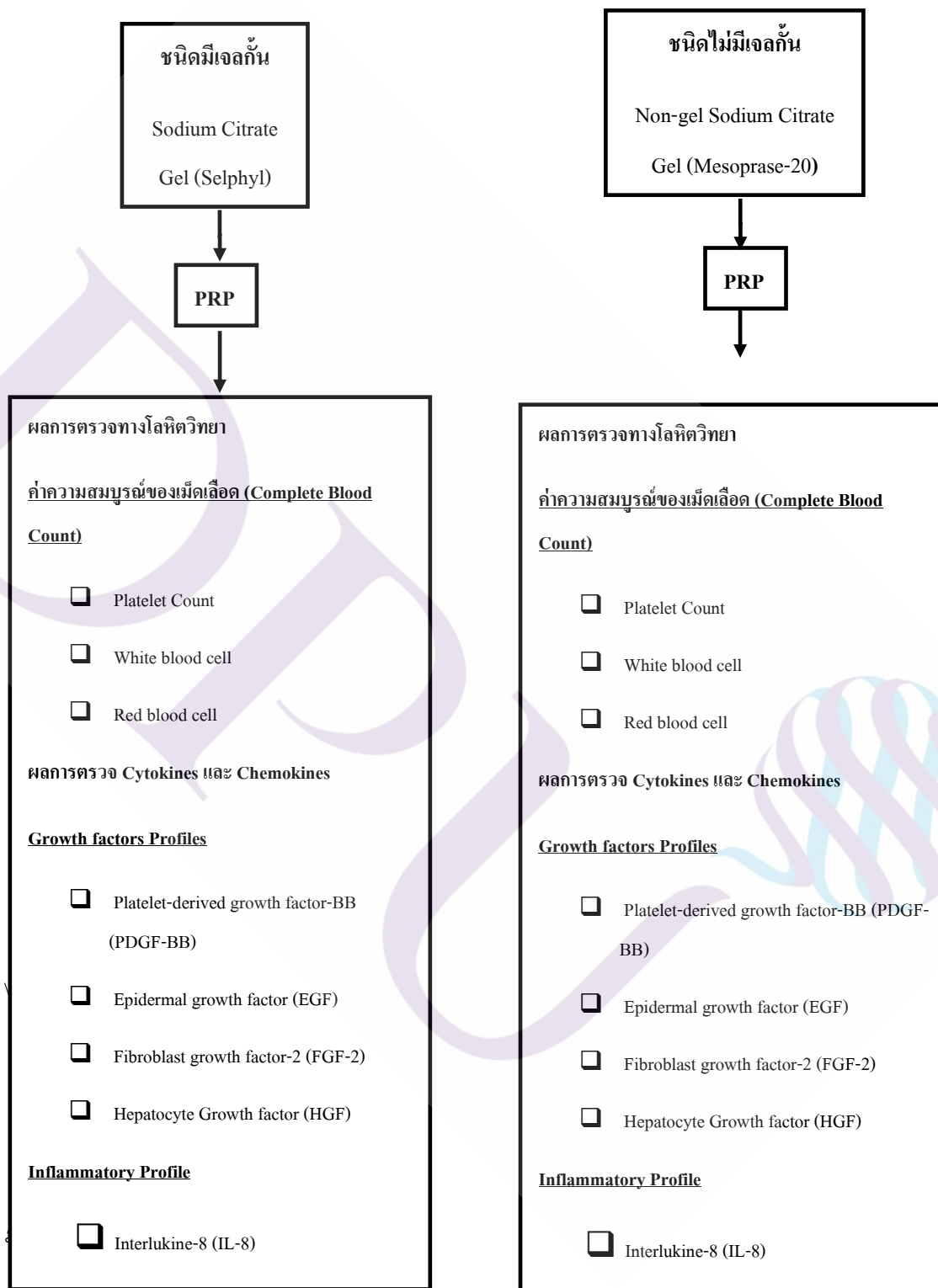
โกรทแฟกเตอร์ (Growth Factors) หมายถึงโปรตีนที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติในสิ่งมีชีวิตทุกชนิด สามารถกระตุ้นให้เซลล์มีการเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนและการพัฒนาการของเซลล์ได้ ซึ่ง โกรทแฟกเตอร์นี้มีหลายชนิด และยังจำเป็นต่อการดำรงชีพของสิ่งมีชีวิตและมีบทบาทสำคัญในการสร้างสมดุลของร่างกาย (Homeostasis) มีความจำเพาะต่อเซลล์หรืออวัยวะต่าง ๆ ในร่างกาย เช่น โกรทแฟกเตอร์ที่ผิวหนัง กระตุ้นการเจริญเติบโตของผิวหนัง Erythropoietin เป็นโกรทแฟกเตอร์ที่กระตุ้นการสร้างเม็ดเลือดแดง เป็นต้น (King, 2018)

PRP (Platelet-rich plasma) คือเกล็ดเลือดเข้มข้นที่เตรียมได้จากการปั่นแยกเม็ดเลือดแดงออกจาก Whole blood ของผู้ป่วย เกล็ดเลือดที่เตรียมได้จะมีความเข้มข้นกว่าเกล็ดเลือดในกระแสโลหิตทั่วไป 3-4 เท่า ซึ่งเหมาะกับการนำมาใช้ในการฉีดกลับไปให้ผิวของคนไข้เอง เพื่อช่วยฟื้นฟูให้ผิวคนไข้ที่เสื่อมสภาพตามอายุนั้นกลับมาเยาว์วัยอีกครั้ง มีการสร้างคอลลาเจนเพิ่มขึ้น และมีความยืดหยุ่นดีขึ้นดังเดิม (Alves et al, 2017)



ภาพที่ 1.1 แสดงชั้นของส่วนประกอบของเลือดหลังทำการปั่นด้วยเครื่องปั่น
ที่มา: Alves et al, 2017

1.7 กรอบแนวคิดวิจัย

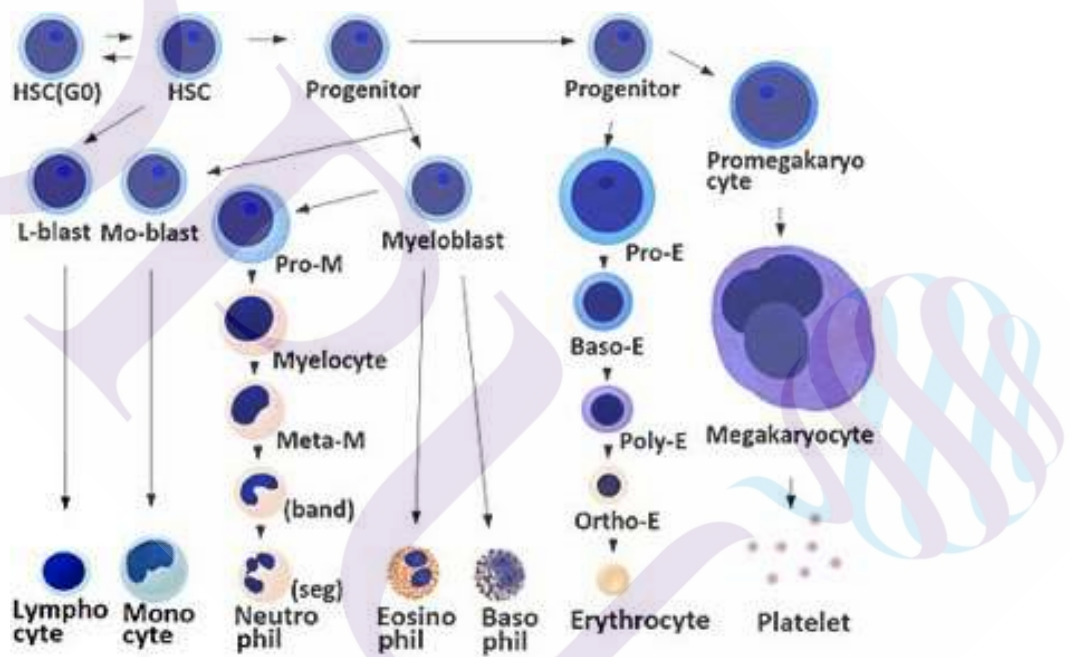


บทที่ 2

แนวคิด ทฤษฎี และผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

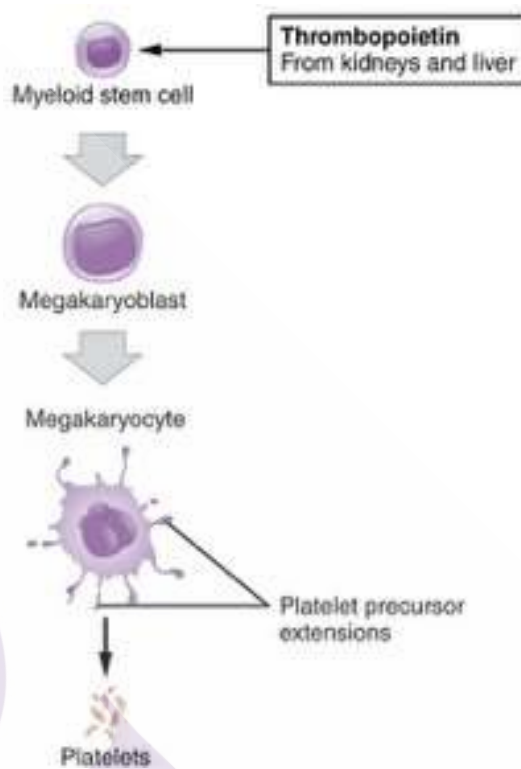
2.1 แนวคิดและทฤษฎีเกี่ยวกับสรีรวิทยาของเกล็ดเลือดและโกรทแฟคเตอร์

เกล็ดเลือดเป็นส่วนของไซโตพลาสซึมของเซลล์เมกาคาริโอไซต์ ที่สร้างมาจากไขกระดูก (Rachita Dhurat, 2014) ซึ่งมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 2 ไมโครเมตร รูปร่างของเกล็ดเลือดมีลักษณะคล้ายจานและมีขนาดประมาณหนึ่งในสามของเม็ดเลือดแดง (2-4 ไมโครเมตร) ในเลือดปกติมีเกล็ดเลือดประมาณ 150,000 - 400,000 ล้านเซลล์ต่อลิตร (Alves et al, 2017)

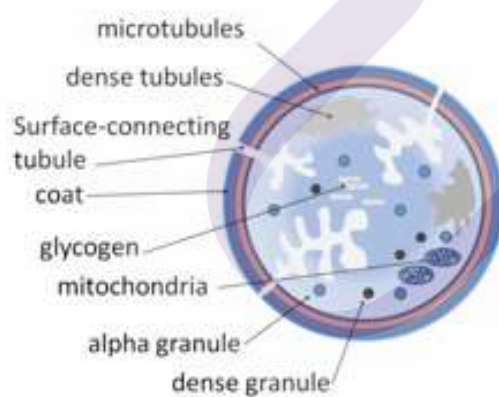


ภาพที่ 2.1 แสดงที่มาของเกล็ดเลือดและเม็ดเลือดชนิดต่าง ๆ จากเซลล์ต้นกำเนิดในไขกระดูก (totipotent marrow stem cells)

ที่มา: <https://en.wikipedia.org/wiki/Platelet>



ภาพที่ 2.2 เกิดเลือดออกจากเซลล์เมกาคารีโอไซต์
ที่มา: <https://en.wikipedia.org/wiki/Platelet>



ภาพที่ 2.3 โครงสร้างของเกล็ดเลือดโดยพบแกรนูลหลายแบบที่อยู่ภายใน
ที่มา: <https://en.wikipedia.org/wiki/Platelet>

ในเกล็ดเลือดมีโปรตีนชีวภาพอยู่มากกว่า 30 ชนิด ซึ่งมีบทบาทพื้นฐานสำคัญในกระบวนการแข็งตัวของเลือดและในการหายของบาดแผล (Conley, 2004) โปรตีนโกรทแฟกเตอร์พื้นฐาน 7 ชนิดจะถูกหลั่งออกมาจาก เกล็ดเลือดตั้งแต่แรกเริ่มในกระบวนการการหายของบาดแผล ดังตารางที่ 2.1.1 ซึ่ง PRP จะประกอบไปด้วย 3 โปรตีนในเลือดที่รู้จักกันในนามของโมเลกุลยึดเกาะเซลล์ (Cell adhesion molecules) ซึ่งได้แก่ Fibrin Fibronectin และ Vitronectin

ใน PRP เกล็ดเลือดที่ถูกกระตุ้นจะหลั่งโปรตีนชีวภาพมากมายสำหรับดึงดูด Macrophage และเซลล์ต้นกำเนิด mesenchyme ภายในเกล็ดเลือด มีเกรนูล 2 ชนิด คือ alpha granules และ dense bodies โดย alpha granules ซึ่งประกอบไปด้วยโกรทแฟกเตอร์ และสารที่ช่วยการแข็งตัวของเลือด ซึ่งจะถูกหลั่งในกระบวนการหายของแผล โดยปกติในภาวะพัก เกล็ดเลือดต้องการการกระตุ้นเพื่อทำงานและกลายเป็นตัวช่วยในกระบวนการซ่อมแซมบาดแผลและการแข็งตัวของเลือด สารโกรทแฟกเตอร์ และไซโตไคน์ อื่น ๆ ใน เกล็ดเลือด ได้แก่ PDGF, TGF, FGF, IGF-1, IGF-2, VEGF, EGF, Interleukin 8, Keratinocyte growth factor และ connective tissue growth factor (Graziani F, 2006)

โกรทแฟกเตอร์ที่สร้างจากเกล็ดเลือดเป็นหนึ่งในหลาย ๆ โกรทแฟกเตอร์ หรือ โปรตีน ที่ควบคุมการเจริญเติบโตและการแบ่งตัวของเซลล์ (Cho, 2011) โดยเฉพาะมีบทบาทสำคัญในการสร้างเส้นเลือดใหม่และการสร้างเส้นเลือดจากเนื้อเยื่อเส้นเลือดที่มีอยู่ก่อนแล้ว VEGF เป็นสัญญาณทางเคมีที่ผลิตโดยเซลล์ซึ่งกระตุ้นการเจริญเติบโตของเส้นเลือดใหม่และเป็นส่วนหนึ่งของระบบที่ทำให้ก๊าซออกซิเจนที่มายังเนื้อเยื่อได้เมื่อระบบไหลเวียนเลือดผิดปกติ (King, 2018)

Platelet-rich plasma เป็นการเตรียม เกล็ดเลือดของตัวเองในพลาสมาที่เข้มข้น แม้ว่าความเข้มข้นของ เกล็ดเลือดใน PRP ในอุดมคติยังบอกได้ไม่ชัดเจน วิธีการในปัจจุบันรายงานว่าสามารถเตรียม PRP ได้เข้มข้น 300-700% ซึ่งได้จำนวน เกล็ดเลือดมากกว่า 1,000,000 เกล็ดเลือดต่อไมโครลิตร (μl) (Landesberg R, 2000) สารโกรทแฟกเตอร์ต่าง ๆ ซึ่งได้แก่ PDGF TGF VEGF IGF ถูกหลั่งจากแอลฟาเกรนูล (α -granules) ของ เกล็ดเลือดเข้มที่ถูกกระตุ้น โดย Aggregation inducers สารโกรทแฟกเตอร์ เหล่านี้ใช้ควบคุมกระบวนการต่าง ๆ ในร่างกาย เช่น การเคลื่อนย้ายเซลล์ การเกาะติดกันระหว่างเซลล์ การเพิ่มจำนวนเซลล์และการสะสมของ extracellular matrix (ECM) โดยการจับกับตัวรับจำเพาะบนพื้นผิวเซลล์ (Freymler EG, 2004) เนื่องจากสารโกรทแฟกเตอร์ที่ได้มีความเข้มข้นสูงมาก PRP จึงถูกใช้อย่างกว้างขวางในการผ่าตัดต่าง ๆ และการรักษาทางคลินิก รวมทั้งการรักษาแผลที่หายยากและกระดูกโอบหน้าและช่องปาก

ตารางที่ 2.1 แหล่งที่มาและหน้าที่ทางชีวภาพของโกรทแฟคเตอร์ ของเกล็ดเลือด

ชนิดของ Growth factor	แหล่งที่มาของ Growth factor	หน้าที่ทางชีวภาพ
Platelet derived growth factor (a และ b)	Platelet, osteoblasts, endothelial cells, macrophages, monocytes, smooth muscle cells	ช่วยในการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสของเซลล์มีเซนไคม์ (mesenchymal cells) และเซลล์กระดูก (osteoblasts), กระตุ้นการเคลื่อนตัวของ white blood cell (chemotaxis) และการแบ่งเซลล์ใน fibroblast/glial/smooth muscle cells, ควบคุมการหลั่งของ collagenase และการสร้างคอลลาเจน, กระตุ้นการเคลื่อนตัวของ white blood cell แมคโครฟาจ (macrophage) และ นิวโทรฟิล (neutrophil)
Transforming growth factor, TGF (alpha และ beta)	Platelets, extracellular matrix of bone, cartilage matrix, activated TH1 cells and natural killer cells, macrophages/ monocytes, and neutrophils	กระตุ้นการเพิ่มจำนวนเซลล์มีเซนไคม์; ควบคุมการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสของเซลล์ endothelial, fibroblast, osteoblast; ควบคุมการสร้างคอลลาเจนและการหลั่งคอลลาจีเนส (collagenase); ควบคุมผลของการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสของ growth factor; กระตุ้นการเคลื่อนตัวของ white blood cell ที่ผนังหลอดเลือด และการสร้างหลอดเลือด; ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของแมคโครฟาจและลิมโฟไซต์ (lymphocyte)
Vascular endothelial growth factor (VEGF)	Platelets, endothelial cells	ช่วยเพิ่มการสร้างหลอดเลือดและการยอมให้สารผ่านเส้นเลือด; กระตุ้นการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสของเซลล์บุผนังหลอดเลือด

ตารางที่ 2.1 (ต่อ)

ชนิดของ Growth factor	แหล่งที่มาของ Growth factor	หน้าที่ทางชีวภาพ
Epidermal growth factor (EGF)	Platelets, macrophages, monocytes	กระตุ้นการเคลื่อนตัวของ White blood cell บนผนังหลอดเลือดและการสร้างหลอดเลือด; ควบคุมการหลั่งของ collagenase; กระตุ้นการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสของเซลล์บุผนังหลอดเลือดและเซลล์มีเซนไคม์
Fibroblast growth factor (FGF)	Platelets, macrophages, mesenchymal cells, chondrocytes, osteoblasts	สนับสนุนการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงของเซลล์กระดูกอ่อนและเซลล์กระดูก; การแบ่งเซลล์แบบไมโทเจเนซิสของเซลล์มีเซนไคม์, เซลล์กระดูกอ่อนและเซลล์กระดูก
Connective tissue growth factor (CTGF)	Platelets through endocytosis from extracellular environment in bone marrow	สนับสนุนการสร้างหลอดเลือด, การสร้างใหม่ของกระดูกอ่อน, การสร้างพังผืดและการเกาะตัวของ Platelet
Insulin like growth factor-1 (IGF-1)	Plasma, epithelial cells, endothelial cells, fibroblasts, smooth muscle cells, osteoblasts, bone matrix	การเคลื่อนตัวของเซลล์ไฟโบรบลาสต์และกระตุ้นการสร้างโปรตีน; เพิ่มการสร้างกระดูกโดยการเพิ่มจำนวนและการเปลี่ยนแปลงของเซลล์กระดูก

ที่มา: Rachita Dhurat, MS Sukesh. (2014). Principles and methods of preparation of platelet-rich plasma: A review and author's perspective. JCAS. 7(4): 189-197.

ในเกล็ดเลือดการกระตุ้นทำให้แกรนูโลที่อยู่ใน เกล็ดเลือดไปรวมตัวกับเยื่อหุ้มเซลล์ (เรียกว่า degranulation) ที่ซึ่ง โปรตีนที่หลั่งออกมา (เช่น PDGF, TGF- β) (Kevy, 2004) ถูกเปลี่ยนไปอยู่ในภาวะที่ถูกกระตุ้น โดยการเติมสารคาร์โบไฮเดรตและ โปรตีนฮิสโตน โปรตีนที่อยู่

ในภาวะถูกกระตุ้นนี้จะถูกหลั่งออกมาและจับกับตัวรับที่อยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์เป้าหมายซึ่งได้แก่ เซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ (mesenchymal stem cell) เซลล์กระดูก เซลล์ไฟโบรบลาสต์ เซลล์เยื่อผนังหลอดเลือดและเซลล์หนังกำพร้า จากนั้นตัวรับที่อยู่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์จะกระตุ้นโปรตีนที่ส่งสัญญาณภายในเซลล์ทำให้เกิดการแสดงออกของลำดับยีนซึ่งส่งผลโดยตรงต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ การสร้างเมทริกซ์ การสร้างกระดูก การสร้างคอลลาเจน เป็นต้น กระตุ้นให้เกิดการซ่อมแซมเนื้อเยื่อและการสร้างเนื้อเยื่อใหม่ (Dhurat, Sukesh, 2014)

การหลั่งของโกรทแฟกเตอร์ที่ถูกกระตุ้นโดยเกล็ดเลือดเหล่านี้ จะเกิดขึ้นใน 10 นาทีหลังถูกกระตุ้น และมากกว่า 95% ของสารโกรทแฟกเตอร์ ที่ถูกสร้างไว้ก่อนจะถูกหลั่งภายใน 1 ชั่วโมง (Marx RE, 2001)

โกรทแฟกเตอร์ (growth factor) คือกลุ่มของโปรตีนหรือเปปไทด์ซึ่งมีหน้าที่หลากหลายซึ่งเกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตและการแบ่งตัวของเนื้อเยื่อโกรทแฟกเตอร์ถูกสร้างจากเซลล์หลายชนิดและจะถูกปล่อยออกมาในกระแสเลือดเพื่อจับกับตัวรับที่จำเพาะบนผิวของเซลล์เพื่อกระตุ้นการทำงานของเนื้อเยื่อเป้าหมายที่แตกต่างกัน (Michael W King, 2018)

Platelet-derived growth factor (PDGF)

เป็นหนึ่งในปัจจัยการเจริญเติบโตที่ควบคุมการเจริญเติบโตของเซลล์และการแบ่งตัว โดยเฉพาะอย่างยิ่ง PDGF มีบทบาทสำคัญในการสร้างหลอดเลือด การเจริญเติบโตของหลอดเลือดจากเนื้อเยื่อหลอดเลือดที่มีอยู่แล้ว และการแบ่งตัว เช่น ช่วยในการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสของเซลล์มีเซนไคม์ (mesenchymal cells) และเซลล์กระดูก (osteoblasts) กระตุ้นการเคลื่อนตัวของเม็ดเลือดขาว (chemotaxis) และการแบ่งเซลล์ใน fibroblast/glia/smooth muscle cells ควบคุมการหลั่งของ collagenase และการสร้างคอลลาเจน กระตุ้นการเคลื่อนตัวของเม็ดเลือดขาวแมโครฟาจ (macrophage) และนิวโทรฟิล (neutrophil) (Pochini, 2016) PDGF มีลักษณะเป็นไกลโคโปรตีนโมเลกุลคู่ ซึ่งอาจจะประกอบด้วย หน่วยย่อย A สองหน่วย (PDGF-AA) หน่วยย่อย B สองหน่วย (PDGF-BB) หน่วยย่อย C สองหน่วย (PDGF-CC) หน่วยย่อย D สองหน่วย (PDGF-DD) หรืออย่างละหนึ่งหน่วย (PDGF-AB) โดยที่ทั้งหมดนี้จะจับกับตัวรับที่ชื่อว่า PDGFR α และ PDGFR β เพื่อทำให้เกิดการเติมหมู่ฟอสเฟสเพื่อกระตุ้นการทำงานในกระบวนการต่อไป (Pochini AC, 2016)

PDGF สามารถพบได้ในเนื้อเยื่อมนุษย์หลายส่วน โดยที่ PDGF-A พบมากที่สุด หัวใจ กล้ามเนื้อลาย และตับอ่อน PDGF-B พบมากในหัวใจและรก ส่วนในอวัยวะอื่นพบมากพอพอกัน PDGF-C พบมากใน หัวใจ ต่อมหมวกไต และตับอ่อน ส่วนน้อยพบในตับและรังไข่ และไม่พบ

เลยในม้ามและลำไส้ใหญ่ ส่วนของ PDGF-D สามารถพบได้ในหัวใจ ตับอ่อนและรังไข่ และไม่พบในสมอง ปอดและกล้ามเนื้อลาย (Pochini, 2016)

Transforming growth factor beta (TGF- β)

TGF- β เป็น ไซโตไคน์ที่ทำหน้าที่หลายอย่างด้วยกันกระตุ้นการเพิ่มจำนวน mesenchymal cells สามารถพบได้ตั้งแต่ในสัตว์ชั้นต่ำจนถึงสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ความสำคัญหลักหลัก คือควบคุมการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสของเซลล์ endothelial, fibroblast, osteoblast ตั้งแต่ระยะตัวอ่อนควบคุมการสร้างคอลลาเจนและการหลั่งคอลลาจีเนส; ควบคุมผลของการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสของโกรทแฟกเตอร์ และยังช่วยรักษาความสมดุลในร่างกาย (Homeostasis) กระตุ้นการเคลื่อนตัวของเม็ดเลือดขาวที่ผนังหลอดเลือดและการสร้างหลอดเลือด; ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของแมคโครฟาจและลิมโฟไซต์ (lymphocyte) โดยที่ TGF- β สามารถแบ่งโมเลกุลย่อยย่อยได้ดังนี้คือ TGF- β sensu stricto, bone morphogenetic proteins (BMP) and activins TGF- β ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมจะประกอบด้วยสามฟอร์มเป็นส่วนใหญ่คือ TGF- β 1 TGF- β 2 TGF- β 3 โดยที่ตัวรับของแต่ละตัวจะแตกต่างกันไปดังนี้ TGF- β 1 จะเป็น activating receptor like kinases (ALK) 1-7 ซึ่งส่วนใหญ่จะประกอบด้วย เซอรินและทรีโอนีนไคเนส TGF- β 2 จะเป็น TGF- β type II receptor (T β RII) Activin type II receptor (ActRII) Activin type II receptor B (ActRIIB) BMP type II receptor (BMPRII) และ anti-Müllerian hormone receptor (AMHR) ส่วน TGF- β 3 จะจับกับ The type III TGF- β receptor (T β RIII) Endoglin RGMa, DRAGON (RGMb) และ hemojuvelin/HFE2 (RGMc) ซึ่ง TGF- β สามารถพบได้ในเกล็ดเลือดบริเวณนอกเนื้อเยื่อหุ้มเซลล์ กระดูกอ่อนและในกระดูกของเม็ดเลือดขาวทุกชนิด (Pochini, 2016)

Fibroblast growth factor (FGF)

Fibroblast growth factor (FGF) ทั้งหมดมีทั้งหมด 22 ยีนส์แต่มีเพียง 18 ยีนส์ ที่สามารถผลิตโกรทแฟกเตอร์ ทั้งหมดจะจับกับ FGF receptor โดยมีจำนวน receptor ทั้งหมด 5 ชนิด FGF แบ่งได้ออกได้เป็น 6 กลุ่มด้วยกัน โดยแยกจากความคล้ายคลึงโดยแบ่งได้ดังนี้

- Family 1 (FGF1 subfamily): FGF1 and FGF2
- Family 2 (FGF7 subfamily): FGF3, FGF7, FGF10, and FGF22
- Family 3 (FGF4 subfamily): FGF4, FGF5, and FGF6
- Family 4 (FGF8 subfamily): FGF8, FGF17, and FGF18
- Family 5 (FGF9 subfamily): FGF9, FGF16, and FGF20

- Family 6 (FGF19 subfamily): FGF19, FGF21, and FGF23

หน้าที่ของ FGF จะเกี่ยวข้องกับการขยายตัวของจำนวนเซลล์ต่าง ๆ คัดแยกการเจริญเติบโตของ stem cell และกระตุ้น mesoderm เพื่อที่จะรวมตัวเป็น embryos (King, 2018)

Epidermal Growth Factor (EGF)

EGF เป็นโพลีเปปไทด์ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 53 ตัว เกี่ยวข้องกับการควบคุมและการเจริญเติบโตของเซลล์ EGF จะจับกับ receptor ของมันที่เชื่อมกับเซลล์ ทำให้เกิดกระบวนการ autophosphorylation ซึ่ง receptor นี้ชื่อว่า SH2 ซึ่งเมื่อจับกันแล้วจะกระตุ้น EGF และ phosphatidylinositol pathway ส่งผลให้เกิดการกระตุ้นของ protein kinase ทำให้ Ca^{2+} ภายในเซลล์มีมากขึ้น ซึ่งกระบวนการเหล่านี้ทำให้เกิดการกระตุ้นการสร้าง mesenchymal glial และ epithelial cells EGF ส่วนมากพบใน submaxillary gland Brunners gland (King, 2018) จากตารางข้างล่างแสดงให้เห็นถึง common growth factor ต่าง ๆ ว่าพบมากที่ส่วนไหนและมีหน้าที่อย่างไร

ตารางที่ 2.2 ชนิดและลักษณะเฉพาะของโกรทแฟคเตอร์ ของเกล็ดเลือด

Factor	Principal Source	Primary Activity
EGF	Submaxillary gland, Brunners gland	Promotes proliferation of mesenchymal, Glial and epithelial cells
Erythropoietin	kidney	promotes proliferation and differentiation of erythrocytes
FGF	wide range of cells; protein is associated with the ECM	promotes proliferation of many cells; inhibits some stem cells; induces mesoderm to form in early embryos
IGF-1	primarily liver	promotes proliferation of many cell types
IGF-2	variety of cells	promotes proliferation of many cell types primarily of fetal origin
NGF	mast cells, eosinophils, bone marrow stromal cells, keratinocytes	promotes neurite outgrowth and neural cell survival

ตารางที่ 2.2 (ต่อ)

Factor	Principal Source	Primary Activity
PDGF	platelets, endothelial cells, placenta	promotes proliferation of connective tissue, glial and smooth muscle cells
TGF- α	macrophages, keratinocytes, hypothalamic astrocytes; commonly expressed by transformed cells	important for normal wound healing, cellular proliferation, female reproductive maturation, embryogenesis
TGF- β	activated Th1 cells (T-helper) and natural killer (NK) cells	anti-inflammatory (suppresses cytokine production and class II MHC expression), promotes wound healing, inhibits macrophage and lymphocyte proliferation

ที่มา: Michael W King. Growth Factors. (2018, September 13).

<https://themedicalbiochemistrypage.org/growth-factors.php>

ไซโตไคน์ (Cytokines) เป็นโกรทแฟคเตอร์ ที่มีลักษณะเฉพาะ ส่วนใหญ่จะถูกสร้างมาจากเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันเพื่อสื่อสารกันระหว่างเซลล์ไซโตไคน์ที่สร้างจาก lymphocytes ที่เรียกว่า lymphokines ได้แก่ interleukin (IL) และ interferon ส่วนที่สร้างจาก monocytes และ macrophage เรียกว่า monokines โดย ไซโตไคน์ที่หลั่งออกมาอาจทำหน้าที่เรียกเซลล์เม็ดเลือดขาวให้มารวมกันที่ตำแหน่งที่มีสิ่งแปลกปลอม กระตุ้นการเพิ่มจำนวนเซลล์ ทำให้เซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันมีการเปลี่ยนแปลงและทำลายเซลล์

ตารางที่ 2.3 ชนิดและลักษณะเฉพาะของ Interleukin

Interleukins	Principal Source	Primary Activity
IL-1- α and - β	macrophages and other antigen presenting cells (APCs)	co-stimulation of APCs and T cells, inflammation and fever, acute phase response, hematopoiesis
IL-2	activated Th1 cells, NK cells	proliferation of B cells and activated T cells, NK functions
IL-3	activated T cells	growth of hematopoietic progenitor cells
IL-4	Th2 and mast cells	B cell proliferation, eosinophil and mast cell growth and function, IgE and class II MHC expression on B cells, inhibition of monokine production
IL-5	Th2 and mast cells	eosinophil growth and function
IL-6	activated Th2 cells, APCs, other somatic cells such as hepatocytes and adipocytes	acute phase response, B cell proliferation, thrombopoiesis, synergistic with IL-1 β and TNF on T cells
IL-7	thymic and marrow stromal cells	T and B lymphopoiesis
IL-8	macrophages, other somatic cells	chemoattractant for neutrophils and T cells
IL-9	T cells	hematopoietic and thymopoietic effects
IL-10	activated Th2 cells, CD8 ⁺ T and B cells, macrophages	inhibits cytokine production, promotes B cell proliferation and antibody production, suppresses cellular immunity, mast cell growth

ตารางที่ 2.3 (ต่อ)

Interleukins	Principal Source	Primary Activity
IL-11	bone marrow stromal cells	synergistic hematopoietic and thrombopoietic effects
IL-12	B cells, T cells, macrophages, dendritic cells	proliferation of NK cells, INF- γ production, promotes cell-mediated immune functions
IL-13	Th2 cells, B cells, macrophages	stimulates growth and proliferation of B cells, inhibits production of macrophage inflammatory cytokines
IL-14	T cells and malignant B cells	regulates the growth and proliferation of B cells
IL-15	monocytes, thyroid, lymph nodes, myocytes	induces production of NK cells
IL-16	eosinophils, CD8 ⁺ T cells, lymphocytes, epithelial cells	chemoattractant for CD4 ⁺ cells
IL-17: six isoforms all from different genes; IL-17A, B, C, D, E, and F (IL-17E also called IL-25)	A and F forms only expressed in a subset of T cells; B expressed in leukocytes and peripheral tissues; C up regulated during inflammation; D expressed in nervous system and skeletal muscle; E expressed in peripheral tissues	increases production of inflammatory cytokines, angiogenesis, affects endothelial and epithelial cells

ตารางที่ 2.3 (ต่อ)

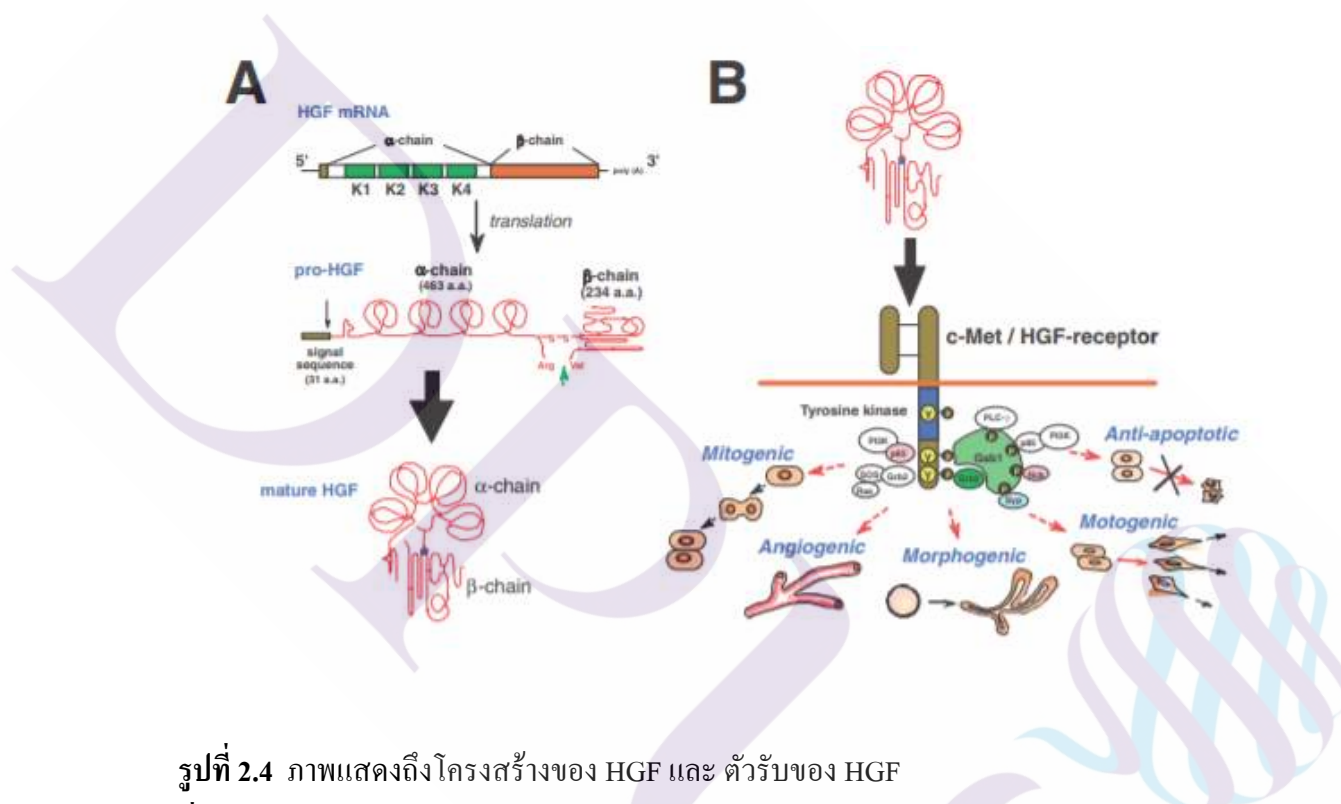
Interleukins	Principal Source	Primary Activity
IL-18	Macrophages	increases NK cell activity, induces production of INF- γ
INF- α and - β	macrophages neutrophils and some somatic cells	antiviral effects, induction of class I MHC on all somatic cells, activation of NK cells and macrophages
INF- γ	activated Th1 and NK cells	induces of class I MHC on all somatic cells, induces class II MHC on APCs and somatic cells, activates macrophages, neutrophils, NK cells, promotes cell-mediated immunity, antiviral effects

ที่มา: Michael W King. Growth Factors. (2018, September 13).

<https://themedicalbiochemistrypage.org/growth-factors.php>

Hepatocyte growth factor (HGF)

HGF ผลิตจาก mesenchymal cells ทำหน้าที่หลักกับ epithelial cells และ endothelial cells แต่ก็มีบางส่วนที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับเซลล์ตระกูลของเม็ดเลือด โดยจะกระตุ้นการพัฒนาอวัยวะในตัวอ่อน การสร้างเซลล์กล้ามเนื้อ การรักษาบาดแผลและเนื้อเยื่อต่าง ๆ HGF ทำหน้าที่เกี่ยวข้องทั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ การเคลื่อนไหวเซลล์ และรูปร่างของเซลล์ โดยที่จะกระตุ้น tyrosine kinase หลังจากที่จับกับ proto-oncogenic c-Met ดังภาพที่แสดงด้านล่าง (NAKAMURA, 2010)



รูปที่ 2.4 ภาพแสดงถึงโครงสร้างของ HGF และ ตัวรับของ HGF

ที่มา: Toshikazu N., Shin YM. (2010). The discovery of Hepatocyte Growth Factor (HFG) and its significance for cell biology, life sciences and clinical medicine. Jpn. Acad. Ser. 86:588-610

2.2 แนวคิดและทฤษฎีเกี่ยวกับ Platelet-Rich Plasma

โดยจำกัดความของ PRP จะมีจำนวนเกล็ดเลือด 10^6 cell/ml ใน 5 ml ของ PRP (Marx, 2001) ซึ่งอยู่บนพื้นฐานของหลักฐานทางวิทยาศาสตร์เกี่ยวกับการเพิ่มการหายของบาดแผลของเนื้อเยื่อและกระดูก ยังมีการศึกษาบ่อยมากที่จะบอกความเข้มข้นเมื่อการกระตุ้นที่เหมาะสมเกิดขึ้น Rughetti et al. ได้ศึกษาเกี่ยวกับความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ เกล็ดเลือดในเจล เกล็ดเลือดและการเปลี่ยนแปลงของผลทางหน้าที่ของเซลล์เยื่อผนังหลอดเลือดของมนุษย์ พบว่าการเพิ่มจำนวน การเคลื่อนย้ายและการแทรกแซงของเซลล์เยื่อผนังหลอดเลือดเกิดขึ้นในรูปแบบ

กราฟระฆังคว่ำ โดยการกระตุ้นเพื่อการแบ่งเซลล์ของเซลล์เยื่อผนังหลอดเลือดจะมีค่าสูงสุดที่ 1.25×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และการสร้างหลอดเลือดจะมีค่าสูงสุดที่ 1.5×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่งผลให้จำนวนเกล็ดเลือดใน PRP 1 ล้านตัวต่อซีซีกลายเป็นค่าจำกัดความของ PRP ที่ใช้ในทางการรักษา

2.2.1 การแบ่งชนิดของ PRP

วรรณกรรมเกี่ยวกับ PRP มีจำนวนมาก แต่ที่มีการตีพิมพ์ออกมายังมีความขัดแย้งกันอยู่ เป็นการยากที่จะตีความข้อมูลที่มีอยู่เนื่องจากเทคนิคในการเตรียม ศัพท์ที่ใช้ รูปแบบของวัสดุที่ใช้ และรายการประยุกต์ใช้มีจำนวนมากมาย

การแบ่งชนิดของ PRP ที่ถูกเสนอโดย Ehrenfest (Ehrenfest et al, 2009) มีการเตรียมอยู่ 4 แบบขึ้นกับส่วนประกอบและ โครงสร้างเส้นใยไฟบรินภายในเซลล์

1. Pure Platelet-Rich Plasma (P-PRP) or leucocyte-poor PRP เป็นการเตรียม PRP ที่ปราศจาก leucocytes แต่มีเครือข่ายเส้นใยไฟบรินที่มีความหนาแน่นต่ำหลังจากถูกกระตุ้น (Ehrenfest et al, 2009)

2. Leucocyte- and PRP (L-PRP) เป็นการเตรียม PRP ที่มี leucocytes และมีเครือข่ายเส้นใยไฟบรินที่มีความหนาแน่นต่ำหลังจากถูกกระตุ้น ซึ่ง PRP ชนิดนี้ถูกใช้มากที่สุดในระบบการทำการทดลองและการค้าขายที่มีอยู่ปัจจุบัน โดยเฉพาะหลายโปรโตคอลอัตโนมัติได้ถูกพัฒนาขึ้นในหลายปีที่ผ่านมา ซึ่งต้องใช้เครื่องมือเฉพาะที่ใช้ตัวอย่างของเลือดน้อยที่สุดและมีมาตรฐานการเตรียมที่ดีที่สุด (Ehrenfest et al, 2009)

3. Pure Platelet-Rich Fibrin (P-PRF) or Leucocyte-Poor Platelet-Rich Fibrin เป็นการเตรียม PRP ที่ปราศจาก leucocytes แต่มีเครือข่ายเส้นใยไฟบรินที่มีความหนาแน่นสูง (Ehrenfest et al, 2009)

4. Leucocyte- and Platelet-Rich Fibrin (L-PRF) or second-generation PRP เป็นการเตรียม PRP ที่มี leucocytes และมีเครือข่ายเส้นใยไฟบรินที่มีความหนาแน่นสูง (Ehrenfest et al, 2009)

2.2.2 การเตรียม PRP

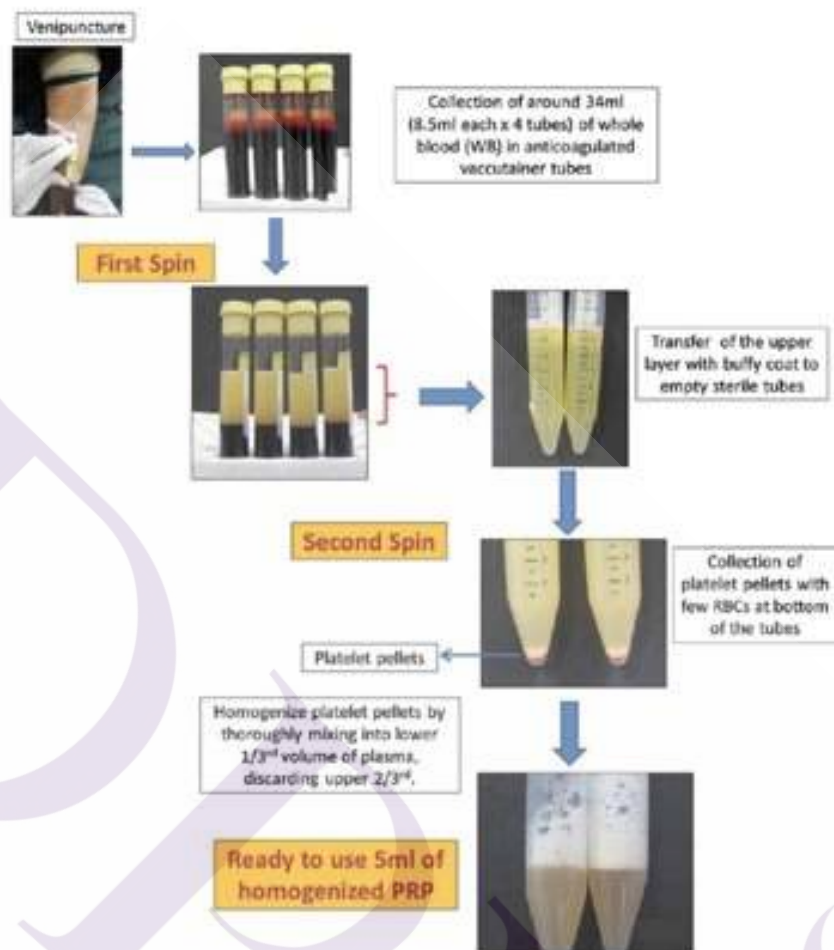
PRP ได้จากเลือดของผู้ป่วยโดยการเจาะเลือดจากเส้นเลือดดำปริมาณ 30 มิลลิลิตรซึ่งจะได้ PRP ปริมาณ 3-5 มิลลิลิตรขึ้นกับบรรทัดฐานจำนวนเกล็ดเลือดของแต่ละบุคคล เครื่องมือที่ใช้ และเทคนิคที่ใช้ เลือดที่เจาะออกมาได้จะถูกเติมสารต้านการแข็งตัวของเกล็ดเลือด เช่น citrate dextrose A เพื่อป้องกันการที่ เกล็ดเลือด ถูกกระตุ้นก่อนการใช้จริง (Rachita Dhurat, 2014) PRP ถูกเตรียมกระบวนการที่เรียกว่า differential centrifugation ซึ่งในกระบวนการนี้จะมีแรงเร่งเพื่อที่จะ

ตกตะกอนส่วนของเซลล์ที่จำเพาะโดยขึ้นกับความถ่วงจำเพาะที่แตกต่างกัน วิธีการเตรียม PRP มีหลากหลายวิธี สามารถเตรียมโดย PRP method หรือ buffy-coat method (Dhurat, 2014)

2.2.2.1 PRP method

การปั่นแยกของเหลวเริ่มต้นเพื่อแยกเม็ดเลือดแดงออก แล้วปั่นแยกของเหลวครั้งที่สองเพื่อทำให้ เกล็ดเลือดเข้มข้นซึ่ง เกล็ดเลือดจะแขวนลอยอยู่ในปริมาตรของพลาสมาหรือน้ำเลือดตอนท้ายสุด ดังแสดงในภาพที่ 2.1 เลือดหรือ whole blood (WB) จะถูกเก็บใส่หลอดที่บรรจุสารต้านการแข็งตัวของเลือดแล้วนำไปปั่นด้วยความเร่งคงที่เพื่อแยกเม็ดเลือดแดงออกมาก่อน ซึ่งหลังการปั่นแยกของเหลวครั้งแรก เลือดจะถูกแยกออกเป็น 3 ชั้น โดยชั้นบนสุดจะประกอบด้วยเกล็ดเลือดเป็นส่วนใหญ่และเม็ดเลือดขาว ชั้นกลางจะเป็นชั้นบาง ๆ ที่เรียกว่า buffy coat ซึ่งเต็มไปด้วยเม็ดเลือดขาวและชั้นล่างสุดประกอบด้วยเม็ดเลือดแดงเป็นส่วนใหญ่ สำหรับ pure PRP (P-PRP) ชั้นบนสุดและชั้นบนของ buffy coat จะถูกเปลี่ยนถ่ายไปยังหลอดใหม่ สำหรับ leucocyte rich PRP (L-PRP) ชั้น buffy coat และอาจจะมีพลาสมาปริมาณเล็กน้อยจะถูกเปลี่ยนถ่ายไปยังหลอดใหม่ แล้วขั้นตอนการปั่นแยกของเหลวครั้งที่สองจึงเริ่มขึ้น คำ “๒” สำหรับการปั่นแยกของเหลวครั้งที่สองควรจะเพียงพอที่จะทำให้เม็ดเลือดแดงและเกล็ดเลือดไปตกอยู่ที่ก้นหลอด ในส่วนของปริมาณด้านบนเป็น PPP ส่วน 1/3 ของปริมาตรด้านล่าง (5 ซีซีของน้ำเลือด) ซึ่งมีเกล็ดเลือดและเม็ดเลือดแดง กระจายอยู่ทั่วกันจะถูกใช้เป็น PRP (Dhurat, 2014)





ภาพที่ 2.5 วิธีการเตรียม PRP

ที่มา: Rachita Dhurat, MS Sukesh. (2014). Principles and methods of preparation of platelet-rich plasma: A review and author's perspective. *J Cutan Aesthet Surg* . 7(4): 189-197.

2.2.2.2 Buffy coat method

เลือดหรือ whole blood จะถูกปั่นแยกที่ความเร็วสูงและเก็บเป็น buffy coat ออกมา ซึ่งประกอบด้วย leucocytes ที่มีความเข้มข้นสูงชั้นบาง ๆ ของ buffy coat ได้จากปริมาณเลือดเพียงเล็กน้อย (10 มล) ความยากคือการแยกชั้นบาง ๆ ของ buffy coat ซึ่งประกอบด้วยเม็ดเลือดขาวเป็นหลักและ เกล็ดเลือดออกจากชั้นของเม็ดเลือดแดง ด้านล่าง

2.2.3 กระบวนการทำ PRP

2.2.3.1 PRP method

- เจาะเลือดจากเส้นเลือดดำใส่ในหลอด Acid citrate dextrose

- ห้ามแช่เย็นเลือดไม่ว่าก่อนหรือระหว่างกระบวนการแยกเกล็ดเลือด
- ปั่นแยกเลือดโดยใช้ระดับความเร็วต่ำ ๆ (soft spin)
- เปลี่ยนถ่ายน้ำเลือดที่ลอยอยู่ด้านบนซึ่งประกอบด้วยเกล็ดเลือดไปยังหลอดปลอดเชื้อ

อันใหม่ที่ปราศจากสารด้านการแข็งตัวของเลือด

- ปั่นหลอดเลือดใหม่ด้วยระดับความเร็วที่สูงขึ้น (hard spin)
- หลังการปั่นพบว่า ที่ด้านล่าง 1/3 ของหลอดคือ PRP และด้านบน 2/3 ของหลอดเป็น

PPP

- เอาของเหลวด้านบนที่เป็น PPP ออกและแขวนลอยเกล็ดเลือดที่อยู่ในน้ำเลือดจำนวนน้อยโดยการ เขย่าหลอดเบา ๆ

2.2.3.2 Buffy coat method

- เลือดควรจะถูกเก็บที่อุณหภูมิ 20 ถึง 24 องศาเซลเซียสก่อนการปั่นแยก
- ปั่นแยกเลือดที่ระดับความเร็วสูง
- เลือดถูกปั่นแยกออกเป็น 3 ชั้นตามความหนาแน่น โดยที่ชั้นล่างสุดประกอบด้วยเม็ดเลือดแดง ชั้นกลางประกอบด้วย เกล็ดเลือดและเม็ดเลือดขาวและชั้นบนเป็นชั้นของ PPP
- เอาน้ำเลือดที่ลอยอยู่ด้านบนออก
- เปลี่ยนย้ายชั้น buffy coat ออกไปยังหลอดปลอดเชื้อหลอดใหม่
- ปั่นแยกด้วยระดับความเร็วต่ำ ๆ เพื่อแยกเม็ดเลือดขาวออกหรือใช้ตัวกรองเพื่อกรองเม็ดเลือดขาว ออก

ไม่มีมติสรุปว่า เกล็ดเลือดจะต้องถูกกระตุ้นก่อนการใช้หรือไม่ บางความเห็นว่าการกระตุ้น เกล็ดเลือดด้วยทรอมบิน (thrombin) หรือแคลเซียมแต่บางความเห็นให้ใช้เกล็ดเลือดโดยไม่ต้องการกระตุ้นก่อน ซึ่งถกเถียงกันว่าแบบใดจะให้ผลลัพธ์ที่ดีกว่า (Scherer et al, 2012)

2.2.4 PRP kits ที่มีขายในท้องตลาด

มีระบบการทำ PRP จำนวนมากในท้องตลาดซึ่งช่วยให้การเตรียมสารแขวนลอย เกล็ดเลือดเข้มข้นแบบพร้อมใช้ที่ทำงานง่ายและสามารถทำได้ซ้ำ ๆ ทุกกระบวนการจะใช้เลือดที่เจาะออกมาปริมาณน้อย (20-60 ซีซี) และใช้หลักการของการปั่นแยกของเหลว ระบบ PRP เหล่านี้แตกต่างกันในด้านความสามารถในการเก็บและการทำให้เกล็ดเลือดเข้มข้น โดยขึ้นกับวิธีและระยะเวลาในการปั่นแยกของเหลว ดังนั้นจึงได้สารแขวนลอยในระดับความเข้มข้นของเกล็ดเลือดและเม็ดเลือดขาวที่แตกต่างกัน ความแตกต่างในความเข้มข้นของ platelet และ white blood cell มีอิทธิพลต่อความหลากหลายของความเข้มข้นของสาร โกรทแฟกเตอร์ แต่เป็นการยากที่จะประเมินว่าเครื่องมือในการเตรียม PRP แบบไหนดีกว่า แบบไหนแยกกว่า เครื่องมือในการทำ PRP สามารถแบ่งได้เป็น

2 แบบ คือระบบต่ำ (2.5-3 เท่าของความเข้มข้นมาตรฐาน) เช่น Arthrex ACP (2-3×), Cascade PPR therapy (1-1.5×), and PRGF by Boitech Institute Vitoria, Spain (2-3×). Regen PRP (Regen Laboratory, Mollens, Switzerland) และระบบสูง (5-9 เท่าของความเข้มข้นมาตรฐาน) เช่น Biomet GPS II and III (platelet count 3-8×); Harvest SmartPREP 2 APC⁺ (4-6×); Arterio Cyte-Medtronic Magellan (3-7×) (Kevy, 2004)

2.2.5 การเปรียบเทียบการเตรียม PRP

PRP ถูกเตรียมโดยการปั่นแยกของเหลวด้วยแรงปั่นแยก อุณหภูมิและระยะเวลาต่าง ๆ กัน และการปั่นแยกทำเป็นสองขั้นตอนเพื่อให้ได้ผลลัพธ์ที่สูงสุด มีหลายโปรโตคอลในวรรณกรรมปัจจุบันที่บรรยายภาวะต่าง ๆ สำหรับการปั่นแยก ดังภาพที่ 2.6

Study	Volume of WB (mL)	1 st Centrifugation		2 nd Centrifugation		Platelet count rise
		Force (RCF)	Time (min)	Force (RCF)	Time (min)	
Amabile et al.	4.5	300	5	700	17	1.4×10 ⁹ to 1.9×10 ⁹ 5.4-fold to 7.3-fold
Amada et al.	3.5	100	10	400	10	1.222±166×10 ⁹ 5-fold
Khan et al.	478	3731	4	—	—	8.3×10 ⁹
Slichter and Harber	250-450	1000	9	3000	20	80% Recovery
Landroberg et al.	5	200	10	200	10	5.57 to 9.35×10 ⁹
Do et al.	9	900	8	1500	15	633.2±91.6×10 ⁹ 4.2 times
Bausset	10	250	15	250	15	3.9% times
Tamini et al.	6.5	160	10	400	10	630.2×10 ⁹
Mazzocca et al.	27	1500 rpm	5	6300 rpm	20	472×10 ⁹
Arntz et al.	4.5	460	8	Single spin only	—	2.67 times
Araki et al.	7.5	270	10	2300	10	189.6×10 ⁹
Kececi et al.	9	250	10	750	10	479.9×10 ⁹

RCF: Relative centrifugal force, WB: Whole blood

ภาพที่ 2.6 เปรียบเทียบโปรโตคอลต่างๆ และผล Platelet ที่ได้

ที่มา: Rachita Dhurat, MS Suresh. (2014). Principles and methods of preparation of platelet-rich plasma: A review and author's perspective. J Cutan and Aest Surg. 7(4): 189-197.

อย่างไรก็ตาม โปรโตคอลต่าง ๆ เหล่านี้ขึ้นกับตัวแปรต่าง ๆ ของกระบวนการ เช่น ปริมาณและตัวอย่างของเลือดที่ใช้ จำนวนรอบการหมุน ระยะเวลาของการปั่นแยกของเหลวและช่วงของความเร็วที่ใช้ในการปั่นแยก เมื่อพิจารณาความซับซ้อนของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากตัวเราเอง เช่น PRP และความต้องการควบคุมคุณภาพในการประยุกต์ใช้ในทางคลินิก จึงมีความจำเป็นที่จะทำให้กระบวนการผลิต PRP นี้ได้มาซึ่งผลลัพธ์ที่คงที่ ปัจจัยอื่น ๆ ที่มีผลต่ออัตราความเข้มข้นของเกล็ดเลือด เช่น ขนาดของเกล็ดเลือด ความแตกต่างทางชีวภาพที่ต่างกันในแต่ละคนและความผันแปรของฮีมาโตคริต (Hematocrit) เป็นต้น

2.2.6 PRP ที่ใช้ในด้านการความงาม

การใช้ PRP ในเวชศาสตร์ความงามเป็นแนวคิดใหม่ ในทางเวชศาสตร์ความงามและตจวิทยา PRP ถูกใช้ในการรักษาสิว แผลเป็น และภาวะผมร่วง โดยเฉพาะที่พบในผู้หญิง และ PRP ยังให้ผลลัพธ์ที่ดีในด้านการฟื้นฟูผิวให้อ่อนเยาว์และกระชับผิวรอบดวงตา (Neerja,2015) ก่อนการฉีด PRP เพื่อรักษาภาวะผมร่วงนั้น จะมีการใช้ลูกกลิ้งที่มีเข็มแหลม ๆ เพื่อกระตุ้นหนังศีรษะบริเวณที่มีผมบาง ซึ่งเป็นการส่งสัญญาณไปยังรากขนให้เริ่มเกิดกระบวนการฟื้นฟูหรือสมานบาดแผล (Healing Process) จากนั้นก็ฉีด PRP ในบริเวณหนังศีรษะที่มีปัญหาเพื่อกระตุ้นเซลล์ต้นกำเนิดในรูขุมขนต่อไป PRP จะถูกฉีดลงไปใต้ชั้นหนังแท้ปริมาณเล็กน้อยหลาย ๆ จุด โดยอาจจะมีการใช้ยาชาชนิดทาที่ผิวก่อนฉีดหรือไม่ก็ได้ (Metha , 2008) การใช้ยาชาชนิดทาที่เพียงพอที่จะทำให้กระบวนการดังกล่าวไม่รู้สึกรู้เจ็บ เมื่อ PRP ถูกฉีดไปในบริเวณที่มีปัญหา จะเกิดการกระตุ้นการสร้างเนื้อเยื่อ ทำให้เกิดการอักเสบที่จะเกิดการกระตุ้นให้เกิดกระบวนการฟื้นฟูหรือสมานบาดแผลต่อไป ผลลัพธ์ที่ตามมาคือเส้นใยคอลลาเจนใหม่จะถูกสร้างขึ้น และเมื่อเส้นใยคอลลาเจนเจริญเติบโตเต็มที่ ก็จะเริ่มหดตัวและทำให้ผิวหนังแน่นและแข็งแรงขึ้น โดยลักษณะผิวและคุณภาพผิวจะสังเกตเห็นได้ว่าดีขึ้นภายใน 3 สัปดาห์ และผลลัพธ์เต็มที่ของการสร้างใหม่ของเส้นใยคอลลาเจนจะใช้เวลา 3 เดือน (Knighton ,1982) การรักษาด้วย PRP สามารถใช้ได้กับทุกสีผิว ผลข้างเคียงที่อาจเกิดขึ้นหลังทำได้แก่ การบวมเล็กน้อย การช้ำจากการฉีดและอาจมีรอยแดงในช่วง 12-24 ชั่วโมงแรก การช้ำที่ตำแหน่งเข็มฉีดอาจจะเห็นได้ 2-3 วัน เมื่อหลายสัปดาห์ผ่านไปเกล็ดเลือดจะกระตุ้นโกรทแฟกเตอร์ซึ่งช่วยการกระตุ้นเส้นใยคอลลาเจนมากขึ้น ผลการรักษาที่ได้แตกต่างกัน แต่ในคนใช้ส่วนใหญ่ผลการรักษาอยู่ได้นาน 18 เดือน (Knighton, 1982)

PRP ถูกใช้สำหรับกระตุ้นผิวชั้นหนังแท้ทั้งในชั้นต้นและชั้นลึก สำหรับการกระตุ้นในชั้นต้น PRP จะถูกฉีดในผิวหนังชั้นต้น เมื่อจะใช้ PRP ในลักษณะเดียวกับฟิลเลอร์ PRP จะถูกฉีดในผิวหนังแท้ชั้นลึกหรือเนื้อเยื่อใต้ชั้นหนังแท้ การฉีดชั้นต้นจะทำในลักษณะเดียวกับเทคนิคเมโสเทอราปีเพื่อที่จะปรับปรุงฟื้นฟู ปริมาตรผิวและความชุ่มชื้นของผิว เทคนิคการฉีดทำได้ง่าย และไม่มีผลข้างเคียงที่รุนแรง อาจพบรอยช้ำเพียงเล็กน้อยได้หรืออาการบวมเป็นครั้งคราวจนถึงการติดเชื้อที่พบได้ไม่บ่อยนัก เปรียบเทียบกับวิธีการดูแลผิววิธีอื่น ๆ PRP ทำให้ผิวอ่อนเยาว์และเป็นการเติมปริมาณผิวหน้าโดยรวมได้อย่างดี มีความปลอดภัยและเห็นผลได้ทันที ผลลัพธ์ทางปริมาณเห็นได้ในระยะยาวรวมทั้งให้ความเป็นธรรมชาติ การฉีด PRP ปีละ 2 ครั้ง จะช่วยทำให้ผลลัพธ์คงอยู่ยาวนาน กลยุทธ์ในการฉีดเริ่มต้น ให้ฉีดอย่างน้อย 3 ครั้ง ภายในระยะเวลา 6 เดือน โดยห่างกัน 2-3 สัปดาห์ ปัจจัยสำคัญที่อาจทำให้เซลล์ต้นกำเนิดหลังลดลง ได้แก่ การสูบบุหรี่และการดื่มแอลกอฮอล์ การหลีกเลี่ยงปัจจัยเหล่านี้ ทำให้การฉีด PRP ได้ผลลัพธ์ที่ดี Platelet ทำงานโดยทำให้

เกิดปฏิกิริยาการอักเสบ ถ้าปฏิกิริยาการอักเสบนี้ลดลง ผลลัพธ์ทางคลินิกก็จะแย่ง ด้วยเหตุผลนี้ จึงไม่แนะนำให้ใช้ยาต้านการอักเสบเป็นเวลา 1-2 สัปดาห์ ฝ่ายที่ต่อต้านการใช้ PRP ให้ความเห็นว่า ผลลัพธ์ทางคลินิกด้านลบเกี่ยวข้องกับวิธีการเก็บหรือความเข้มข้นของ PRP ที่ไม่มีคุณภาพด้วยการใช้เครื่องมือที่ไม่ได้มาตรฐาน และมีข้อสังเกตว่า จำนวนเปอร์เซ็นต์ของจำนวนเกล็ดเลือด ที่นับได้ คือความอคติทางการตลาดเพราะว่ามีความผันแปรที่สำคัญในแต่ละบุคคลปรากฏอยู่ในความเข้มข้นของเกล็ดเลือดของพลาสมาของมนุษย์ (Cho, 2012) ความผันแปรในเทคนิคการทำให้เกล็ดเลือดเข้มข้นอาจจะเปลี่ยนแปลงลักษณะจำนวนเกรนูลของเกล็ดเลือด ซึ่งมีผลต่อผลลัพธ์ทางคลินิก มีการใช้ PRP มากมายในทางเวชศาสตร์ความงาม ดังนี้

1. PRP ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสำคัญบริเวณใบหน้า การเปลี่ยนถ่ายไขมันร่วมกับการใช้ PRP เป็นการรวมวิธีการฉีดพลาสมาของผู้ป่วยเองที่มีโกรทแฟกเตอร์ร่วมกับการฉีดไขมันของตัวเองเพื่อเติมปริมาตรผิวที่หายไปและแก้ไขริ้วรอยบนใบหน้า

2. PRP อาจจะใช้ร่วมกับการเปลี่ยนถ่ายไขมันหรือการเซาะพังผืดเพื่อทำให้ปริมาตรผิวเพิ่มขึ้นหรือแก้ไขแผลเป็นชนิดหลุมจากสิวหรือบาดแผลจากอุบัติเหตุ (Whitman, 1997) การเซาะพังผืดทางการศัลยกรรมเป็นการลดการดึงรั้งของแผลเป็นจากภายใน และยังกระตุ้นการตอบสนองต่อการหายของแผลของร่างกายเพื่อจะสร้างเซลล์ผิวที่ปราศจากเม็ดสี การทำ PRP ร่วมกับการเปลี่ยนถ่ายไขมันทำให้ลักษณะของแผลเป็นหลุมดีขึ้น

ประโยชน์ที่ผู้ป่วยได้รับจากกระบวนการนี้คือ ไม่ต้องพักฟื้นหลังทำและผลลัพธ์ที่ได้อยู่ยาวนานมากกว่าหนึ่งปี ผลลัพธ์ของการยกกระชับใบหน้าได้จากผลการฉีดสารเติมเต็มและ PRP การฉีดสารเติมเต็มทำให้เกิดผลการเติมเต็มหรือการแก้ไขปริมาตรบนผิว ส่วน PRP ซึ่งฉีดเนื้อสารเติมเต็มทำให้เกิดกระบวนการสร้างเซลล์ผิวซึ่งเกิดขึ้นในทันที ผู้ป่วยสามารถเห็นและรู้สึกถึงผลลัพธ์ภายในไม่กี่นาทีหลังทำเพราะผิวที่ดึงและเรียบเนียนขึ้น การใช้ PRP กับสารเติมเต็มไม่เพียงทำให้ความตึงผิวและลักษณะพื้นผิวดีขึ้น แต่ยังทำให้ผลการแก้ด้วยสารเติมเต็มยาวนานกว่า 3-6 เดือน ซึ่งนานกว่าการใช้สารเติมเต็มเพียงอย่างเดียว การฉีด PRP ในชั้นผิวหนังแท้ทุกเดือนเป็นเวลา 3 ครั้ง แสดงถึงผลลัพธ์ที่น่าพอใจในการทำให้ผิวบริเวณหน้าและคออ่อนเยาว์และทำให้แผลเป็นหายดีขึ้น มีการศึกษาว่า การใช้เลเซอร์ fractional non-ablative (erbium glass) ร่วมกับการทาผิวด้วย PRP ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงไปในทางที่ดีขึ้นอย่างเป็นรูปธรรมในด้านความยืดหยุ่นของผิวและการเพิ่มความหนาแน่นของเส้นใยคอลลาเจน การศึกษาทางจุลกายวิภาคศาสตร์แสดงถึงการเพิ่มขึ้นในความยาวของ dermo epidermal junction, จำนวนเส้นใยคอลลาเจนและไฟโบรบลาสต์ในบริเวณผิวที่ได้รับการรักษา ผู้ป่วยที่ไม่ต้องการฉีดสารเติมเต็มสามารถได้ประโยชน์จาก PRP โดยสาร PRP ที่ถูกกระตุ้นสามารถฉีดใต้พื้นผิวเพื่อกระตุ้นร่างกายให้สร้างสารเติมเต็มของตัวเองปริมาณน้อย ๆ

และแม้ว่าผลลัพธ์จะไม่เท่าผลลัพธ์ที่ได้จากการฉีดสารเติมเต็ม ลักษณะผิวที่เปลี่ยนแปลงไปก็ยังสามารถสังเกตเห็นได้

การใช้ PRP ร่วมกับเลเซอร์ fractional ablative (carbon dioxide) สำหรับบริเวณรอยลึกและปัญหาผิวถูกทำลายระดับรุนแรงจากแสงแดด การรักษาดังกล่าวแสดงให้เห็นถึงการลดผลข้างเคียงที่เกิดขึ้นชั่วคราวและลดระยะเวลาพักฟื้นหลังทำ การรักษาด้วยเลเซอร์ปรับสภาพผิวดังกล่าวเป็นที่รู้จักถึงความสามารถในการปรับสภาพผิวให้เรียบเนียน และการเติม PRP หลังการทำเลเซอร์ทำให้เร่งเพิ่มระดับของการหายของบาดแผลและการสร้างเส้นใยคอลลาเจนใหม่

สรุปข้อดีของการทำ PRP

1. เป็นการไม่ใช้เกล็ดเลือดตามธรรมชาติของร่างกาย ดังนั้นจึงมีความปลอดภัย ไม่เสี่ยงต่อการเกิดการแพ้ (allergic reaction)
2. เส้นใยคอลลาเจนตามธรรมชาติถูกสร้างเพื่อตอบสนองต่อการปรากฏของเกล็ดเลือดที่ถูกกระตุ้น
3. PRP เป็นการรักษาอูมคติสำหรับผู้ป่วยที่ไม่ต้องการใช้สารเติมเต็มสังเคราะห์
4. เกิดอาการบวม, ช้ำหรือเกิดก้อนหลังทำน้อยเพราะว่าเป็นการสะสมของน้ำในผิวที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติ
5. PRP สามารถใช้เพื่อเพิ่มผลลัพธ์ของการทำเลเซอร์เพื่อความรวดเร็วและการหายของแผลที่ดียิ่งขึ้น
6. การรักษาด้วย PRP ให้ผลลัพธ์ที่เท่ากันทั้งในผู้ชายและผู้หญิง

2.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

จากงานวิจัยของ Pochini และคณะ (Pochini, et al, 2019) ได้ทำการทดลองปั่นแยก PRP เพื่อศึกษาเกี่ยวกับปริมาณ โกรทแฟกเตอร์และไซโตไคน์ ด้วยวิธีปั่นแยกแตกต่างกัน 3 วิธี ได้แก่ Open method commercial column by medtronic และ biomet จากเลือดของกลุ่มตัวอย่างจำนวน 6 คน อายุระหว่าง 18-68 ปี ที่มีสุขภาพแข็งแรง ไม่มีโรคเลือด พบว่าการปั่นแยกด้วย Medtronic จะให้ปริมาณเกล็ดเลือดสูงสุด ในขณะที่การปั่นแยกแบบ open method จะมีปริมาณเกล็ดเลือดน้อย อย่างไรก็ตามพบว่าวิธีการปั่นแยกแบบ Commercial column by medtronic และ biomet พบว่ามีปริมาณ IL-8 และ IL-1 β สูง ในขณะที่ Open method จะมีปริมาณ interleukin 6 จากงานวิจัยข้างต้นแสดงให้เห็นว่าวิธีปั่นแยกที่แตกต่างกันมีผลต่อปริมาณ โกรทแฟกเตอร์และไซโตไคน์

จากงานวิจัยของ Fitzpatrick และคณะ (Fitzpatrick, et al, 2017) ได้ทำการทดลองปั่นแยก PRP เพื่อศึกษาเกี่ยวกับปริมาณ โกรทแฟกเตอร์และไซโตไคน์ ด้วยวิธีปั่นแยกแตกต่างกันจาก 4 PRP

separation kit ได้แก่ GPSIII (Biomet biologics), Smart-Prep2 (Harvest terumo), Magellan (Arteriocyte medical system) และ ACP (Device technologies) จากเลือดของกลุ่มตัวอย่างจำนวน 3 คน อายุระหว่าง 25-35 ปีที่มีสุขภาพแข็งแรง ไม่มีโรคเลือด เป็นผู้หญิง 2 ผู้ชาย 1 เพื่อตรวจหาปริมาณความแตกต่างของเกล็ดเลือด เม็ดเลือดแดง และเม็ดเลือดขาว โดยที่ GPSIII ,Smart-prep2 magellan จะให้ปริมาณเกล็ดเลือดและเม็ดเลือดขาวมากกว่าชุดควบคุม 3-6 เท่า ในขณะที่ ACP ให้ผลปริมาณเกล็ดเลือดและเม็ดเลือดขาวมากกว่าชุดควบคุม 1.5 เท่า สรุปจากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าวิธีปั่นแยกที่แตกต่างกันมีผลต่อปริมาณ เกล็ดเลือด เม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาว



บทที่ 3

ระเบียบวิธีวิจัย

การวิจัยครั้งนี้เป็นมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของการตรวจวิเคราะห์จำนวนเกล็ดเลือด เม็ดเลือดแดง และเม็ดเลือดขาวใน PRP ก่อนและหลังปั่นแยก PRP ระหว่างชุดปั่นแยก PRP ชนิด ไม่มีเม็ดเจลกั้น Mesoprase-20 Celtac และชุดปั่นแยก PRP ชนิดมีเม็ดเจลกั้น Selphyl Dermalink และตรวจวัดปริมาณของ Cytokine Chemokine Profiles และ Inflammatory makers ใน PRP โดยเปรียบเทียบกับจำนวนเกล็ดเลือดหลังปั่น โดยมีแบบแผนการวิจัยเป็นการศึกษาแบบวัดก่อนและหลัง การทดลองโดยมีรูปแบบการวิจัยดังนี้

3.1 เครื่องมือที่ใช้ในการเก็บรวบรวมข้อมูล

1. ชุดปั่นแยก PRP ชนิด ไม่มีเม็ดเจลกั้น Mesoprase-20, Celtac และชุดปั่นแยก PRP ชนิดมีเม็ดเจลกั้น Selphyl, Dermalink
2. รวบรวมข้อมูลจากแฟ้มข้อมูลอิเล็กทรอนิกส์
3. แบบบันทึกซึ่งผู้วิจัยสร้างขึ้น โดยคัดลอกข้อมูลจากค่าที่ได้จากการตรวจวัดปริมาณของสารโปรตีนชีวภาพ Growth factors Profiles สารบ่งชี้สภาวะการอักเสบ Inflammatory Profile จากเครื่อง Luminex Magpix 200 และค่าความสมบูรณ์ของเม็ดเลือด (Complete blood count) ด้วยเครื่องอัตโนมัติ Firmer bc 5300 โดยมีรายละเอียดดังนี้

Growth factors Profiles ได้แก่

- Platelet-derived growth factor-BB (PDGF-BB)
- Epidermal growth factor (EGF)
- Fibroblast growth factor-2 (FGF-2)
- Hepatocyte Growth factor (HGF)

Inflammatory Profile ได้แก่

- Interlukine-8 (IL-8)

ค่าความสมบูรณ์ของเม็ดเลือด (Complete blood count)

- เกล็ดเลือด (Platelet)
- เม็ดเลือดขาว (White blood cell)

- เม็ดเลือดแดง (Red blood cell)

4. วิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ข้อมูลสำเร็จรูป SPSS version 15.0

5. เครื่องคอมพิวเตอร์ เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูลต่าง ๆ ที่ได้รับมา แล้วนำข้อมูลที่ได้มาประมวลผลในลำดับต่อไป

3.2 วิธีการเก็บรวบรวมข้อมูล

การศึกษาครั้งนี้ ผู้วิจัยได้ดำเนินการวิจัยตามขั้นตอนต่อไปนี้

1. ขอรับการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัย คณะแพทยบูรณาการ มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิต พิจารณาให้ความเห็นชอบในการดำเนินงานวิจัย

2. ผู้วิจัยทำหนังสือจากคณบดีคณะแพทยบูรณาการ มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิตพร้อมโครงการเครื่องมือวิจัยและหนังสืออนุมัติจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยคณะแพทยบูรณาการ มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิต

3. ติดต่อประสานงานกับคลินิกเทคนิคการแพทย์ บริษัทเซลเทค จำกัด จังหวัด กรุงเทพมหานคร เพื่อขอความร่วมมือในการดำเนินการวิจัยและเก็บรวบรวมข้อมูล

4. เมื่อได้รับหนังสืออนุญาตดำเนินการวิจัยและเก็บรวบรวมข้อมูล ผู้วิจัยได้เข้าพบผู้บริหารคลินิกเทคนิคการแพทย์ บริษัทเซลเทค จำกัด จังหวัดกรุงเทพมหานครเพื่อขอความช่วยเหลือในการดำเนินการเก็บรวบรวมข้อมูล ซึ่งแจ้งรายละเอียดโครงการวิจัย วัตถุประสงค์ ลักษณะกลุ่มตัวอย่าง เครื่องมือและขั้นตอนในการดำเนินงานวิจัย

5. เมื่อได้กลุ่มตัวอย่างที่เป็นอาสาสมัครครบในการวิจัย ผู้วิจัยจะแนะนำตัวกับกลุ่มตัวอย่างเพื่อขอความร่วมมือในการเข้าโครงการ ซึ่งแจ้งรายละเอียดเกี่ยวกับโครงการ วัตถุประสงค์ ของโครงการ ประโยชน์และผลข้างเคียงที่อาจเกิดขึ้นกับผู้ร่วมโครงการ ข้อมูลที่เก็บทั้งหมดจะเป็นความลับ เครื่องมือที่ใช้วิจัย รวมทั้งวิธีการประเมินผล

6. ผู้วิจัยเปิดโอกาสให้กลุ่มตัวอย่างซักถาม ก่อนให้กลุ่มตัวอย่างตัดสินใจเข้าร่วมโครงการด้วยตนเองโดยไม่มีการบังคับ

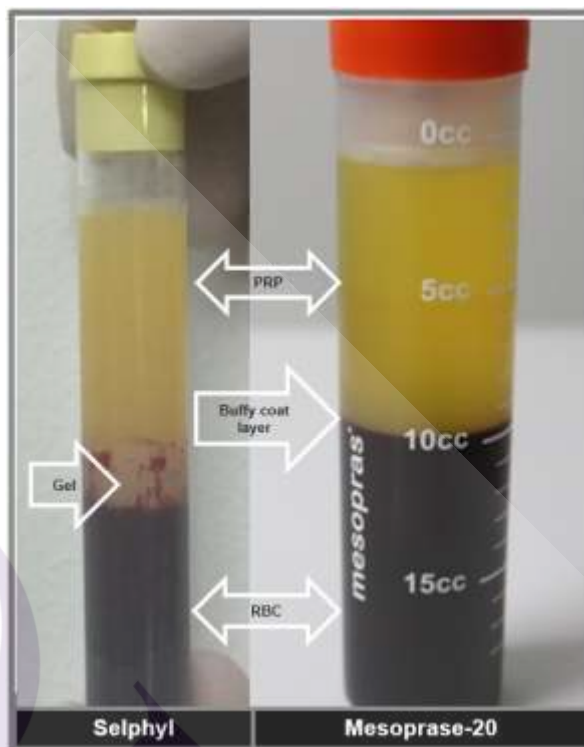
7. เมื่อกลุ่มตัวอย่างเข้าร่วมโครงการจะให้ลงนามยินยอมรับการทดลองเป็นลายลักษณ์อักษร พร้อมทั้งให้พยานลงนามกำกับ

8. ผู้วิจัยดำเนินการเก็บรวบรวมข้อมูลจากกลุ่มตัวอย่างก่อนเริ่มการทดลอง ประกอบด้วยข้อมูลส่วนบุคคล ประวัติด้านสุขภาพ

9. ผู้วิจัยดำเนินการวิจัยตามแผนการวิจัย

ขั้นตอนการทดลองและเก็บรวบรวมข้อมูลผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการ

1. เจาะเก็บเลือดจากกลุ่มตัวอย่างอาสาสมัครเพศชายจำนวน 5 คน คนละ 29 มิลลิลิตร โดยมีอายุเฉลี่ย 20-30 ปี ไม่มีโรคหรือประวัติทางพันธุกรรมเกี่ยวกับเกล็ดเลือดหรือการแข็งตัวของเลือด และไม่มีประวัติติดเชื้อหรือใช้ยาต้านการอักเสบหรือยาต้านการแข็งตัวของเลือด เช่น warfarin heparin อย่างน้อย 10 วัน ก่อนทำการตรวจวิเคราะห์
2. แบ่งแยกสำหรับปั่นด้วยชุดปั่นแยกโดยใช้ Sodium Citrate Gel Separator tube (Selphyl, Dermalink) 9 มิลลิลิตร และปั่นแยกด้วยระบบปิด โดยใช้ Sodium Citrate Tube (Mesoprase-20, Celtac) 20 มิลลิลิตร โดยทำตามคำแนะนำในคู่มือของแต่ละชุดปั่น
3. ปริมาตรของสารละลาย PRP ที่ได้จากการปั่นแยกด้วยชุดปั่นแยก Selphyl ได้สารละลาย PRP ประมาณ 4-5 มิลลิลิตร และสารละลาย PRP ที่ได้จากชุดปั่นแยก Mesoprase-20 จะได้สารละลาย PRP ประมาณ 8-9 มิลลิลิตร
4. แบ่งสารละลาย PRP ที่ปั่นแยกได้ ตัวอย่างละ 1 มิลลิลิตร เพื่อทำการตรวจนับความสมบูรณ์ของเม็ดเลือด (CBC, Complete blood cell Count) (BC-5180, Fiermer)
5. นำสารละลาย PRP ที่เหลือมากระตุ้นให้เกิดเป็นก้อน Fibrin clot โดยการเติมแคลเซียมกลูโคเนท (Calcium gluconate) โดยปริมาตรจะใช้ตามคำแนะนำที่มีอยู่ในคู่มือของแต่ละชุดทดสอบ จากนั้นผสมให้เข้ากันด้วย Vortex แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 25-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง โดยห้ามเขย่าหรือแกว่งหลอดทดลอง
6. เมื่อเกิด Fibrin clot จนสมบูรณ์แล้วทำการเขย่าละลายก้อน Fibrin clot ด้วย Vertex แล้วปั่นตกตะกอน Fibrin clot ด้วยความเร็ว 5,000 rpm ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง Centrifuge (ยี่ห้อ Zentrifuge, Hettich) เป็นเวลา 10 นาที
7. นำส่วนใสด้านบน (Supernatant) ที่ได้กรองด้วยตัวกรองชนิดกระบอกกึ่งยว (Syringe filter) ที่มีขนาดของรูกรอง 0.10 μm (Millipore, MERCK Thailand) และเก็บตัวอย่างที่ 20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะทำการตรวจวัดโดยทำการวิเคราะห์ตรวจวัดหาปริมาณของสารโปรตีนชีวภาพ โดยใช้ Luminex Magpix 200, MERCK Thailand โดยอาศัยหลักการ Magnetic Bead Immuno Chemiluminescence Assay ในการตรวจวัดหาปริมาณสารโปรตีนชีวภาพและทำตามคู่มือทดสอบ



ภาพที่ 3.1 รูปแสดงการแยก PRP โดยใช้ชุดปั่นแยกทั้ง 2 ชนิด แสดงให้เห็นถึงชั้น PRP Buffy coat และ RBC หลังปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง

วิธีใช้เครื่อง Luminex Magpix 200

1. เปิด plate ที่เราต้องการใช้
2. หยอด Assay buffer 25 μ l ลงทุกหลุมเพื่อทำการล้าง
3. เริ่มหยอดสารที่เราต้องการตรวจโดยที่เราจะแบ่งหลุมที่จะใช้เป็น 2 ส่วน คือ Control และ sample และเราจะใส่สารในแต่ละหลุมดังนี้ คือ Control
 - 3.1 ช่อง Back ground ใส่ 25 μ l Assay Buffer
 - 3.2 ช่อง Known Standard ใส่ 25 μ l โดยใช้วิธี Serial dilution
 - 3.3 ช่อง Sample ใส่ 25 μ l ของสารที่เราต้องการตรวจ (PRP) โดยที่สารที่เราต้องการตรวจจะมีการ dilute ที่แตกต่างกันไปตาม dilution คือ PDGF-BB จะ dilute กับ Buffer 1:100 ส่วน Sample ที่ต้องการตรวจสารอื่น ๆ dilute 1:6 ตาม dilution ทางบริษัท
4. ผสมเม็ด beads และหยอดลงทุกหลุมหลุมละ 25 μ l โดยที่ทุกครั้งที่จะหยอดหลุมใหม่เราจะนำหลอดเม็ดบีดไปสั่นบน Vortex 3 วินาที

5. Incubate ที่อุณหภูมิ 4 °C ซ้ำมคืน (ไม่น้อยกว่า 16 – 18 ชม) ระหว่างที่ incubate ต้องห่อ plate ด้วยฟรอยด์ เพื่อหลีกเลี่ยงจากแสง
6. เมื่อครบเวลานำ Hand Held Magnet มาวางใต้ Plate ประมาณ 60 วินาที แล้วนำสารไปคว่ำในอ่าง
7. ทำการล้างโดยใส่ Wash buffer 200 µl ทุกหลุม และนำไปวางบน Shaker 30 วินาที และนำมาวางบน hand held Magnet 60 วินาที แล้วสลัดทิ้งในอ่างทำอย่างนี้ 2 รอบ
8. เติม detective antibody ที่ถูก label biotin ลงทุกหลุม และ incubate อุณหภูมิห้อง 1 ชม. วางบน Shaker
9. เติม Streptavidin เพื่อเพิ่ม sensitivity ในการตรวจซึ่งถูก label ไว้ด้วย Fluorescence และ incubate ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชม โดยวาง Shaker
10. เมื่อครบเวลานำ Hand Held Magnet มาวางใต้ Plate ประมาณ 60 วินาที แล้วนำสารไปคว่ำในอ่าง
11. ทำการล้างโดยใส่ Wash buffer 200 µl ทุกหลุม และนำไปวางบน Shaker 30 วินาที และนำมาวางบน hand held Magnet 60 วินาที แล้วสลัดทิ้งในอ่างทำอย่างนี้ 2 รอบ
12. เติม Fluid Sheath หลุมละ 150 µl ก่อนเอาเข้าเครื่อง Luminex Magpix 200

ชุดปั่นแยก PRP ชนิดมีเจลกัน Selphyl

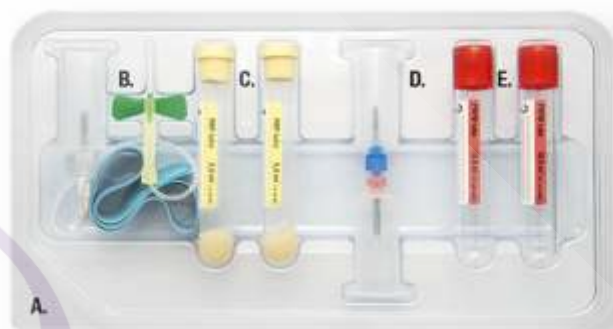


ภาพที่ 3.2 รูปแสดงเครื่องปั่นและอุปกรณ์ชุดปั่นแยก PRP ยี่ห้อ Selphyl

ชุดปั่นแยก Selphyl เป็นชุดการสำหรับการเตรียมเกล็ดเลือด โดยมีการออกแบบให้ใช้งานรวดเร็วและปลอดภัย ชุดตรวจนี้สามารถแยกเม็ดเลือดขาว และเม็ดเลือดแดงออกจากเลือดครบส่วน

เพื่อให้เราสามารถเตรียม PRP ได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้นซึ่งผลผลิตสุดท้ายของการเตรียมนี้เราจะเรียกว่า PRFM ซึ่งถือเป็นการเตรียม PRP แบบใหม่

อุปกรณ์ที่ใช้ในการปั่นแยก PRP



ภาพที่ 3.3 รูปแสดงรายละเอียดของอุปกรณ์ชุดปั่นแยก PRP ยี่ห้อ Selphyl

- | | | |
|-------|---|--------------|
| A คือ | ชุด Kit ปั่นแยก PRP Selphyl | จำนวน 1 ชุด |
| B คือ | เข็ม (Needle) เจาะเลือดชนิด Butterfly No. 21 พร้อมตัวจับ (Holder)
เข็มเจาะหลอดสูญญากาศ (Vacuum tube) | จำนวน 1 ชิ้น |
| C คือ | หลอดเก็บเลือดจุกสีเหลืองที่มีสาร sodium citrate เป็นสารกันเลือดแข็งตัว | จำนวน 2 หลอด |
| D คือ | เข็มสองด้านพร้อมตัวจับสำหรับเจาะหลอดสูญญากาศ (Transfer needles with holder) เพื่อถ่ายเท PRP จากหลอดปั่นแยก PRP ไปผสมกับสาร (แคลเซียมคลอไรด์) ในหลอดจุกสีแดง | จำนวน 1 ชิ้น |
| E คือ | หลอดผสม PRP ที่มีสารแคลเซียมคลอไรด์ | จำนวน 2 หลอด |

ขั้นตอนการปั่นแยก PRP ด้วยชุดปั่น



ภาพที่ 3.3 รูปแสดงรายละเอียดขั้นตอนการปั่นแยก PRP โดยชุดปั่นแยกยี่ห้อ Selphyl

เจาะเลือด 9 มิลลิตร ปั่นโดยใช้ความเร็ว 3,800 rpm โดยจะปรับอัตโนมัติโดยระบบของเครื่องปั่นเอง หลังเครื่องปั่นเสร็จเราจะได้ PRP ออกมา หลังจากนั้นใส่แคลเซียมเพิ่มเข้าไปจะได้สารสุดท้ายคือ PRFM

ชุดปั่นแยก PRP ชนิดไม่มีเจลกั้น Mesoprase-20



ภาพที่ 3.4 รูปแสดงเครื่องปั่นและอุปกรณ์ชุดปั่นแยก PRP ยี่ห้อ Mesoprase-20

Mesoprase-20 เป็นชุดปั่น PRP แบบไม่มีเจลกั้นมาจากสเปน โดยที่ชุดนี้เป็นชุดปั่นแยกที่สามารถใช้ในการรักษาได้หลายรูปแบบ ข้อดีคือ รวดเร็ว ปลอดภัยและใช้งานง่ายโดยที่ในชุดประกอบด้วย หลอดบรรจุเลือดขนาด 20 ml, syringe latex-free ขนาด 5 ml, syringe ขนาด 1.0 ml, syringe ขนาด 12 ml, เข็มเบอร์ 18, เข็มเบอร์ 21, เข็มเบอร์ 30 และอุปกรณ์ปิดฝา 2 ชิ้น

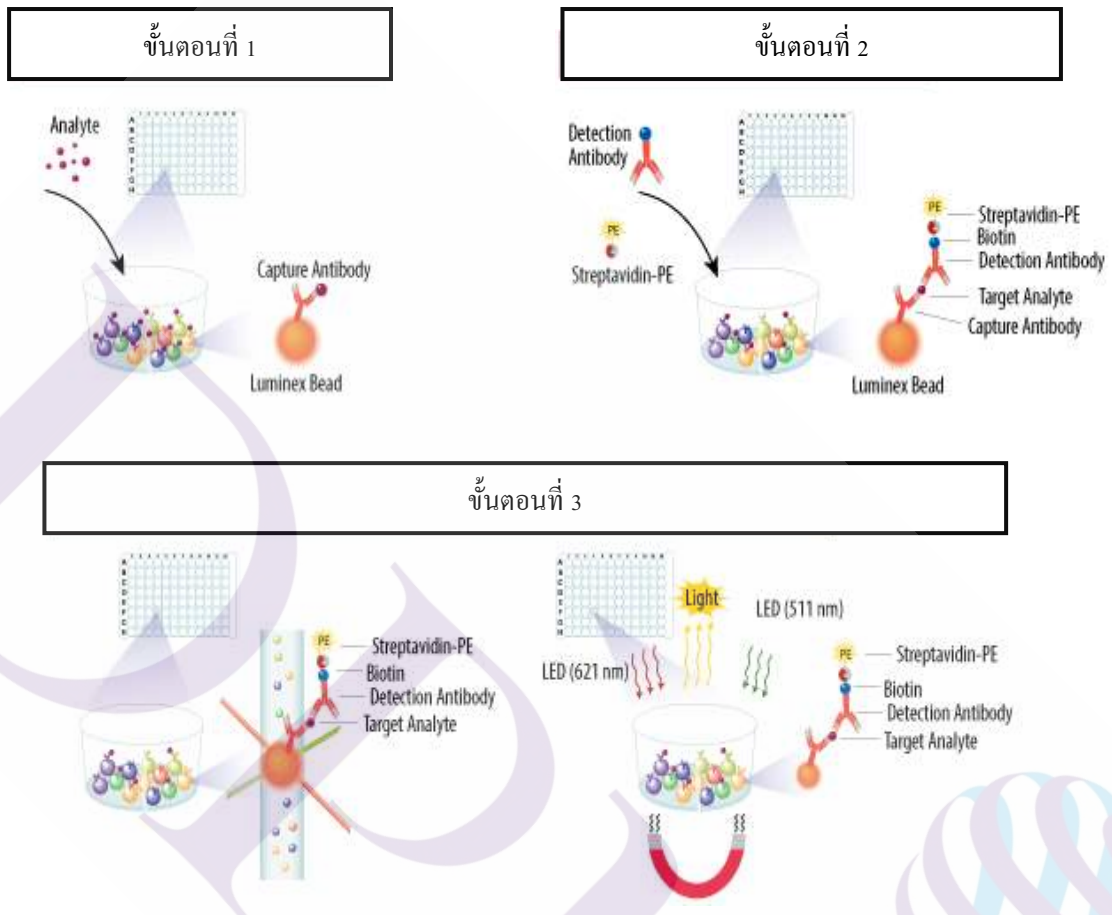
ขั้นตอนการปั่นแยก PRP ด้วยชุดปั่น



ภาพที่ 3.5 รูปแสดงรายละเอียดขั้นตอนการปั่นแยก PRP ยี่ห้อ Mesoprase-20

เจาะเลือด 20 ml มิลลิตร ปั่นโดยใช้ความใช้ความแรง 180 rpm ปั่น 8 นาที โดยจะปรับอัตโนมัติโดยระบบของเครื่องปั่นเอง หลังเครื่องปั่นเสร็จเราจะได้ PRP ออกมา

หลักการตรวจด้วยชุดตรวจ Luminex magpix



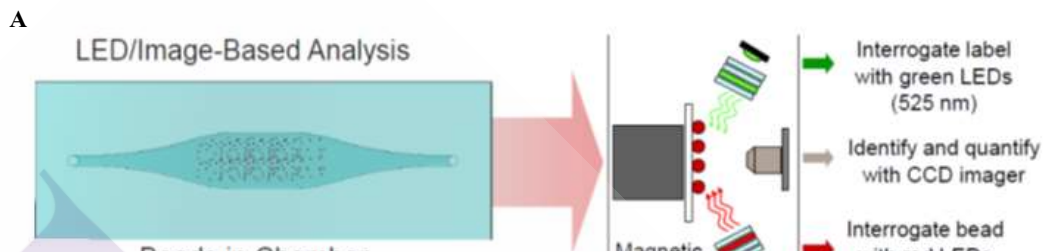
ภาพที่ 3.6 รูปแสดงหลักการในการตรวจวัดด้วยเครื่อง Luminex magpix 200

ชุดตรวจ Luminex magpix 200 ใช้หลักการ immunofluorescence assay โดยที่มีขั้นตอนดังนี้

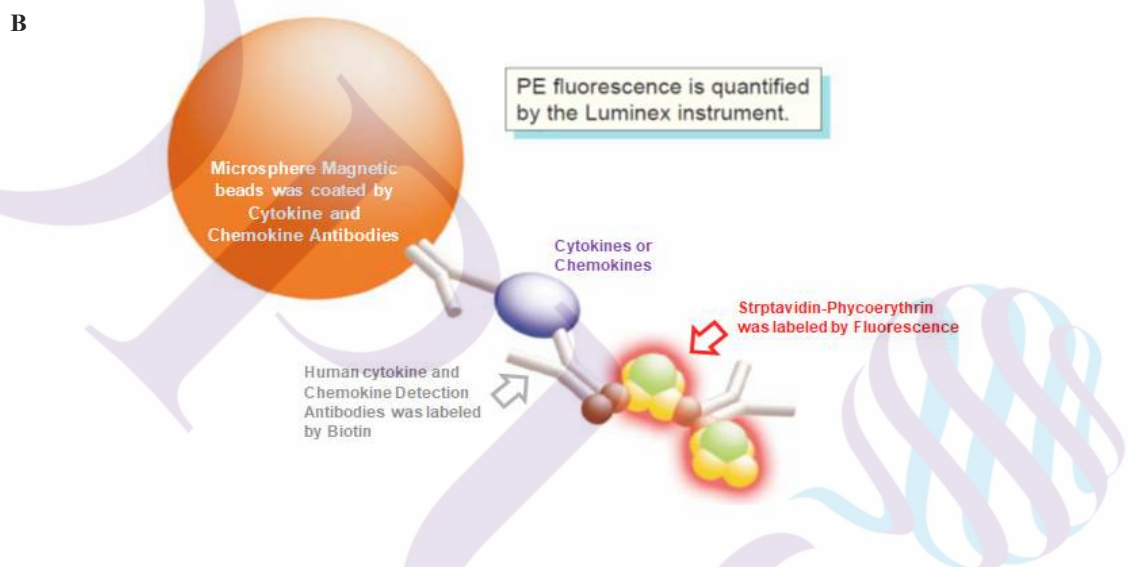
1. ขั้นตอนที่ 1 เป็นการใส่ sample ที่มี antigen ที่จำเพาะกับ antibody ที่ใส่อยู่บน magnetic bead
2. ขั้นตอนที่ 2 เป็นการใส่ detection antibody ซึ่งมีความจำเพาะกับอีกตำแหน่ง antigen ที่มี biotin เคลือบอยู่หลังจากนั้นใส่ streptavidin เพื่อที่จะให้เกิดการเรืองแสงที่ชัดเจน
3. ขั้นตอนที่ 3 นำใส่เครื่อง luminexmagpix เพื่อตรวจการเรืองแสง

ขั้นตอนการตรวจด้วยชุดตรวจ Luminex magpix 200

หลักการของการตรวจวัดด้วยเครื่อง MAGPIX System Merck



Panel 96 Well Plate Assay

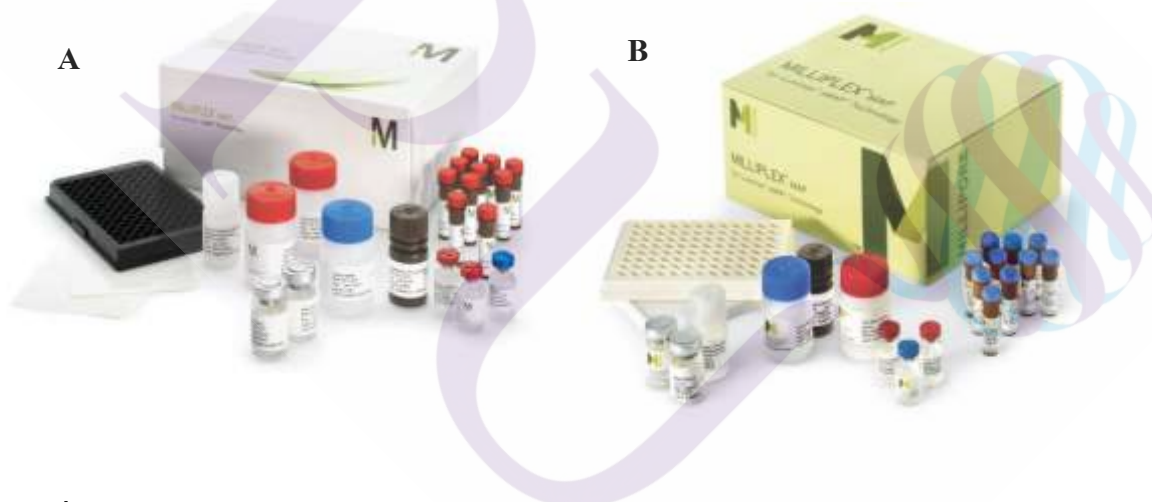


ภาพที่ 3.7 รูป A แสดงการทำงานภายในเครื่อง Luminex magpix 200 และรูป B แสดงหลักการในการจับระหว่างเม็ดแม่เหล็กที่ถูกโค้ดไว้ด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะกับ Cytokines หรือ Chemokines

อุปกรณ์ที่ใช้ในการตรวจวัดด้วยชุดตรวจ Luminex magpix



ภาพที่ 3.8 รูปแสดงเครื่อง Luminex magpix 200



ภาพที่ 3.9 รูปแสดงตัวอย่างชุดตรวจ Human Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel - Immunology Multiplex Assay (A) และ Human Circulating Cancer Biomarker Magnetic Bead Panel 4 - Cancer Multiplex Assay (B)

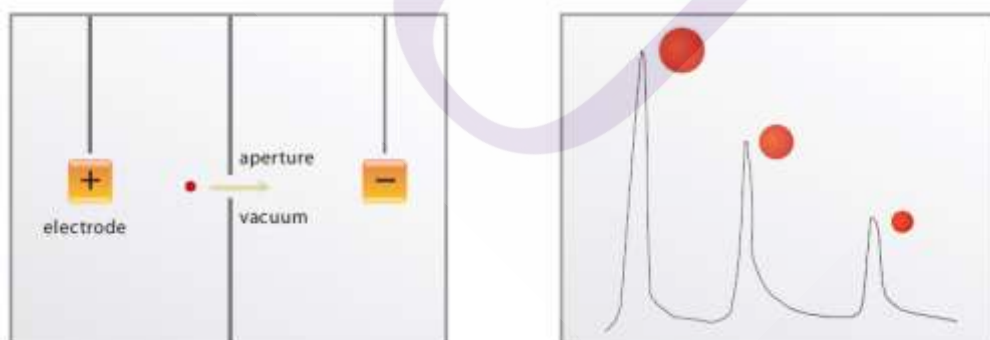
หลักการตรวจวัดของเครื่องอัตโนมัติ Firmer BC 5300



ภาพที่ 3.10 รูปแสดงเครื่องตรวจวัดอัตโนมัติสำหรับตรวจหาค่าความสมบูรณ์ของเม็ดเลือด (Completed blood count, CBC) ยี่ห้อ Firmer BC 5300

1. หลักการ Electrical impedance

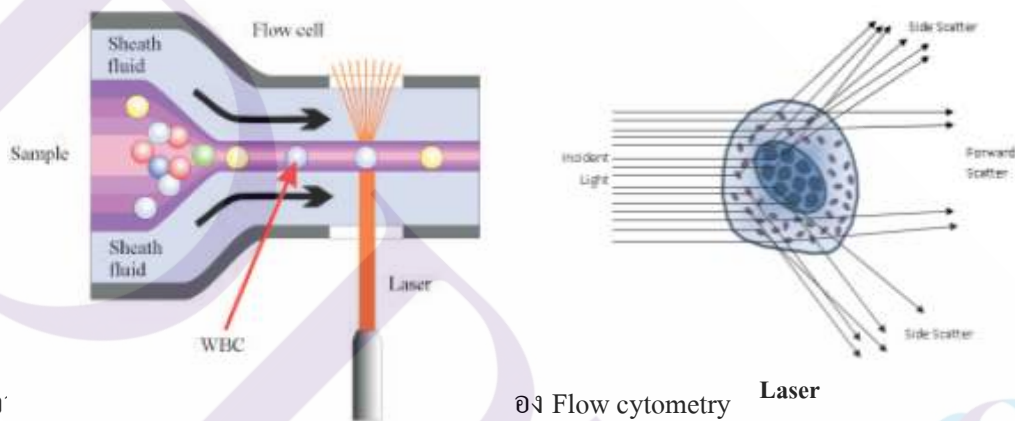
สำหรับการนับจำนวนของเม็ดเลือดแดงและเกล็ดเลือดจะใช้วิธีหาความแตกต่างของความต้านทานต่อการไหลของไฟฟ้ากระแสสลับที่ผ่านสารตัวนำ เมื่อเซลล์ผ่านรูรับแสงด้วยสัญญาณจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงความต้านทาน ในกระแสสลับสัญญาณการเปลี่ยนแปลงแรงดันไฟฟ้าจะถูกบันทึกและสอดคล้องกับปริมาณของเซลล์



ภาพที่ 3.11 รูปแสดงถึงหลักการการตรวจวัดหาค่าความสมบูรณ์ของเม็ดเลือด (Completed blood count, CBC)

2. Flow cytometry

สำหรับ white blood cell (WBC) 4 ส่วน (lymphocytes, monocytes, neutrophils, and eosinophils) การแยกความแตกต่างสีย้อมเคมีการไหลของ cytometry และการกระจายด้วยเลเซอร์ LEO I lyse จะสลายเซลล์เม็ดเลือดแดงและส่งผลต่อเซลล์เม็ดเลือดขาว LEO II lyse จะทำให้เม็ดของอีโอซิโนฟิลหนาแน่นขึ้นสำหรับ basophils และการนับจำนวนรวมของ white blood cell (WBC) เซลล์จะถูกบำบัดด้วยสีย้อมเคมีเป็นอันดับแรกจากนั้นจึงหาค่าด้วยวิธีอิมพีแดนซ์ไฟฟ้าแบบคลาสสิก



ภ

อง Flow cytometry Laser

3. การกระเจิงของแสง

การกระเจิงของแสงเกิดขึ้นจากการสะท้อนของแสงเลเซอร์ ขอบเขตของสิ่งที่เกิดขึ้นนี้อยู่กับคุณสมบัติทางกายภาพของเซลล์ โดยที่แสงจะมีทั้งสองแบบคือแบบที่ การกระจายไปข้างหน้า (FS) จะบอกถึงขนาดของเซลล์ แสงที่กระจายด้านข้าง (SS)จะบ่งบอกถึงคุณสมบัติของเซลล์

ข้อพิจารณาด้านจริยธรรม

การวิจัยครั้งนี้เป็นการวิจัยเชิงทดลองที่ทำในกลุ่มตัวอย่างที่เป็นอาสาสมัครเพศชาย ซึ่งผู้วิจัยได้สิทธิของผู้รับบริการ ผู้วิจัยจึงกำหนดแนวทางในการรวบรวมข้อมูลและดำเนินกิจกรรมเพื่อพิทักษ์สิทธิของกลุ่มตัวอย่าง ดังนี้

1. ขอรับการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์จากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัย มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิตย์
2. สิทธิในการตัดสินใจเข้าร่วมกลุ่มตัวอย่าง

2.1 ก่อนการตัดสินใจเข้าร่วมโครงการวิจัย กลุ่มตัวอย่างจะได้รับทราบข้อมูลการวิจัยอย่างละเอียด วัตถุประสงค์การวิจัย การเก็บรวบรวมข้อมูลการได้รับสิทธิของกลุ่มตัวอย่าง เช่น สิทธิที่จะตัดสินใจด้วยตนเอง สิทธิที่จะได้รับข้อมูลทั้งทางบวกและทางลบอย่างเปิดเผย สิทธิที่จะไม่ได้รับอันตราย สิทธิที่จะได้รับการปกปิดชื่อและข้อมูลความลับส่วนบุคคล เป็นต้น

2.2 หลังจากกลุ่มตัวอย่างได้รับทราบข้อมูลทั้งหมดและได้รับการตอบคำถามที่มีข้อสงสัยอย่างละเอียดและชัดเจนแล้ว กลุ่มตัวอย่างสามารถตัดสินใจเข้าร่วมโครงการวิจัยได้ด้วยตนเองโดยปราศจากการบังคับ

3. ผู้วิจัยชี้แจงรายละเอียดการเข้าร่วมโครงการและสิทธิที่กลุ่มตัวอย่างจะได้รับจากเข้าร่วมโครงการวิจัย

4. ลงนามยินยอมเป็นลายลักษณ์อักษรพร้อมให้พยานลงนามกำกับ กรณีกลุ่มตัวอย่างยินยอมให้ความร่วมมือในการวิจัย

5. ขณะกลุ่มตัวอย่างเข้าร่วมโครงการวิจัยจะอยู่ในความรับผิดชอบของผู้วิจัย หากผู้ร่วมวิจัยมีการผิดปกติด้านเนื่องเกี่ยวกับการวิจัย ผู้วิจัยจะให้การดูแลเบื้องต้นระหว่างเข้าร่วมโครงการวิจัย

6. ภายหลังเสร็จสิ้นโครงการวิจัย ผู้วิจัยขอบคุณผู้ร่วมวิจัย

3.3 วิธีการวิเคราะห์ข้อมูลหรือสถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

เมื่อสิ้นสุดโครงการวิจัยผู้วิจัยนำข้อมูลที่ได้ทั้งก่อนและหลังทดลองมาทำการตรวจสอบความสมบูรณ์ของข้อมูล จากนั้นทำการวิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ SPSS Version 15.0 ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

1. ข้อมูลจากผล CBC ที่ตรวจวัดปริมาณ Growth factors Profiles และสารบ่งชี้สภาวะการอักเสบ Inflammatory Profile ได้ด้วยเครื่องอัตโนมัติของชุดปั่นแยกทั้ง 2 ชนิด มาวิเคราะห์ด้วยสถิติเชิงพรรณนา ได้แก่ ค่าเฉลี่ย (Average) ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.) สถิติที (T-Test)

2. เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยและสถิติที (T-Test) ก่อนและหลังการทดลอง

2.1 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ย และสถิติที (T-Test) ก่อนและหลังการทดลองของผล CBC ที่ได้จากชุดปั่นแยก PRP 2 ชนิด โดยใช้สถิติทีโดยมีค่า $p\text{-value} < 0.05$

2.2 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ย และสถิติที (T-Test) หลังการทดลองของผลการตรวจวัด Growth factors profiles และสารบ่งชี้สภาวะการอักเสบ Inflammatory profile ที่ตรวจได้จากชุดปั่นแยก PRP 2 ชนิด โดยมีค่า $p\text{-value} < 0.05$

บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

4.1 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางด้านโลหิตวิทยา

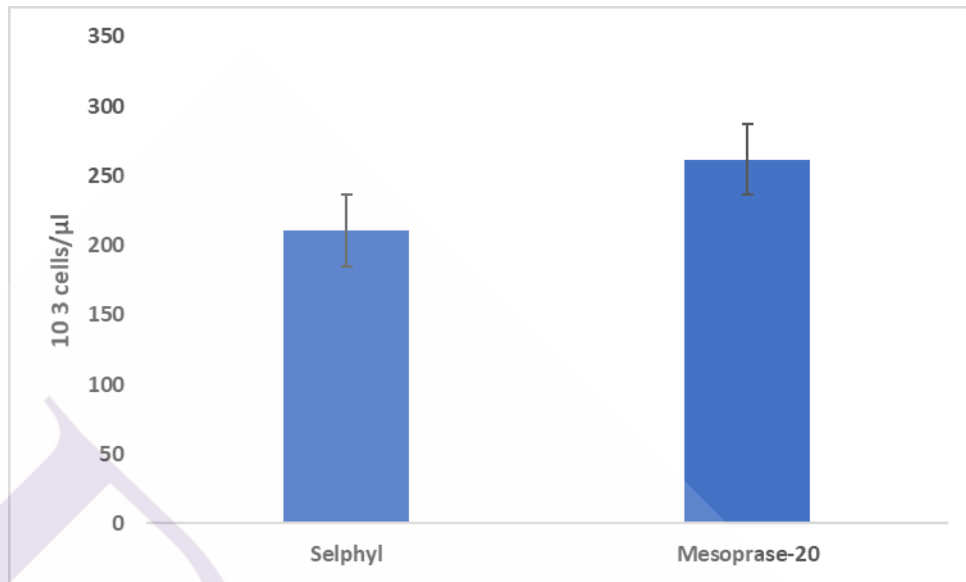
ค่าความสมบูรณ์ของเม็ดเลือด (Complete Blood Count)

การตรวจนับเซลล์ด้วยเครื่องตรวจนับอัตโนมัติเปรียบเทียบชุดตรวจ Selphyl กับ Mesopraser-20 พบว่าจำนวนเกล็ดเลือดได้ 210.6 กับ 261.8 (10^3 cells/ μ L) ซึ่งได้น้อยกว่า Whole blood, จำนวนเม็ดเลือดขาวได้ 0.10 กับ 0.05 (10^3 cells/ μ L) และจำนวนเม็ดเลือดแดงได้ 0.01 กับ 0.01 (10^3 cells/ μ L) ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบค่าทางสถิติพบว่าจำนวนเกล็ดเลือดและจำนวนเม็ดเลือดแดงไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (p -value > 0.05) แต่จำนวนเม็ดเลือดขาวมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p -value < 0.05)(ตารางที่ 1)

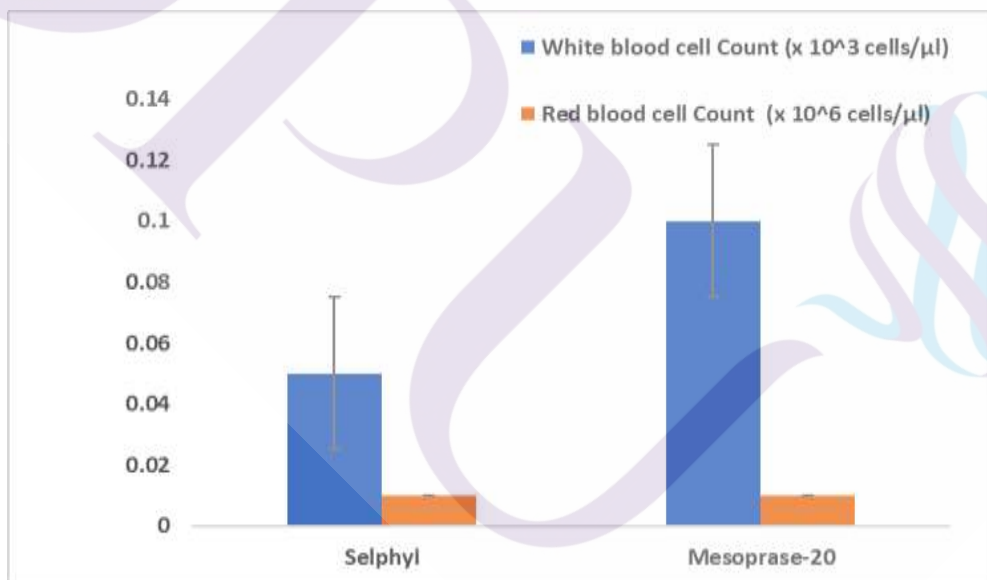
ตารางที่ 4.1 ผลการตรวจนับจำนวนเกล็ดเลือด เม็ดเลือดขาว และเม็ดเลือดแดงใน PRP หลังปั่นแยกโดยใช้ชุดปั่นแยก PRP2 ชนิด

Parameters	Selphyl	Mesopraser-20	p -value
Platelet count in Whole Blood(10^3 cells/ μ L) mean \pm S.D.	311.80 \pm 59.86		ND
Platelet count in PRP (10^3 cells/ μ L) mean \pm S.D.	210.6 \pm 58.95	261.8 \pm 67.58	0.140
White blood cell count (10^3 cells/ μ L) mean \pm S.D.	0.05 \pm 0.03	0.10 \pm 0.05	0.028*
Red blood cell count (10^6 cells/ μ L) mean \pm S.D.	0.01 \pm 0	0.01 \pm 0	0.374

Based on the results of independent sample T-Test (two-tailed), * p <0.05 was considered statistically significant; ND, Not determined (n=5)



ภาพที่ 4.1 กราฟแสดงการเปรียบเทียบจำนวนเกล็ดเลือดที่ตรวจวัดได้ใน PRP ที่ได้จากการปั่นแยกด้วยชุดปั่น Selphyl และ Mesoprase-20



ภาพที่ 4.2 กราฟแสดงการเปรียบเทียบจำนวนเม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาวที่ตรวจวัดได้ใน PRP ที่ได้จากการปั่นแยกด้วยชุดปั่น Selphyl และ Mesoprase-20

4.2 ผลการตรวจวิเคราะห์ Cytokines และ Chemokines

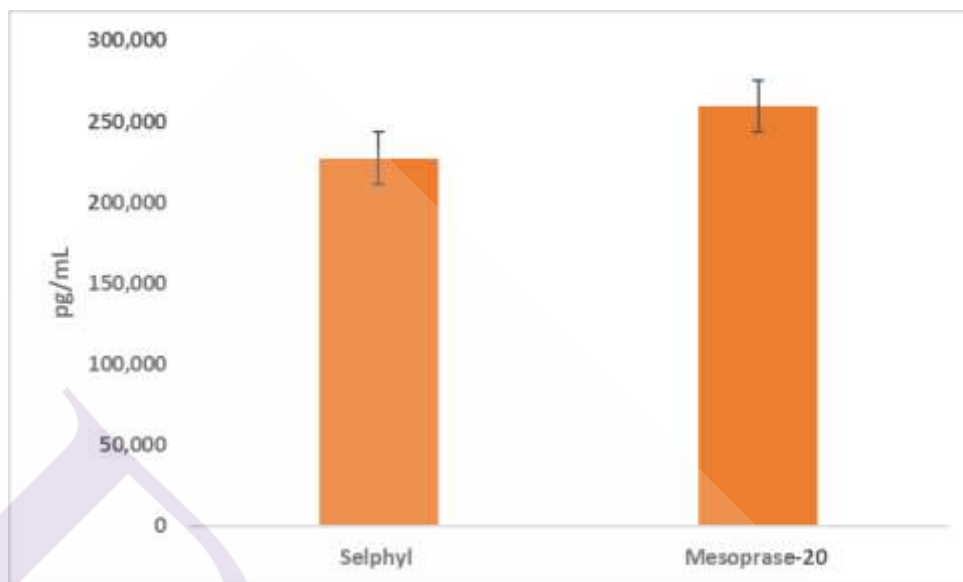
Growth factors Profiles

จากการตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารโปรตีนชีวภาพพบว่าระดับของ PDGF-BB, HGF, Interlukine-8 ได้ค่า p -value 0.170, 0.961 และ 0.148 ตามลำดับ แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (p -value > 0.05) ส่วน EGF และ FGF-2 ได้ค่า p -value 0.040 และ 0.034 แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p -value < 0.05) (ตารางที่ 2)

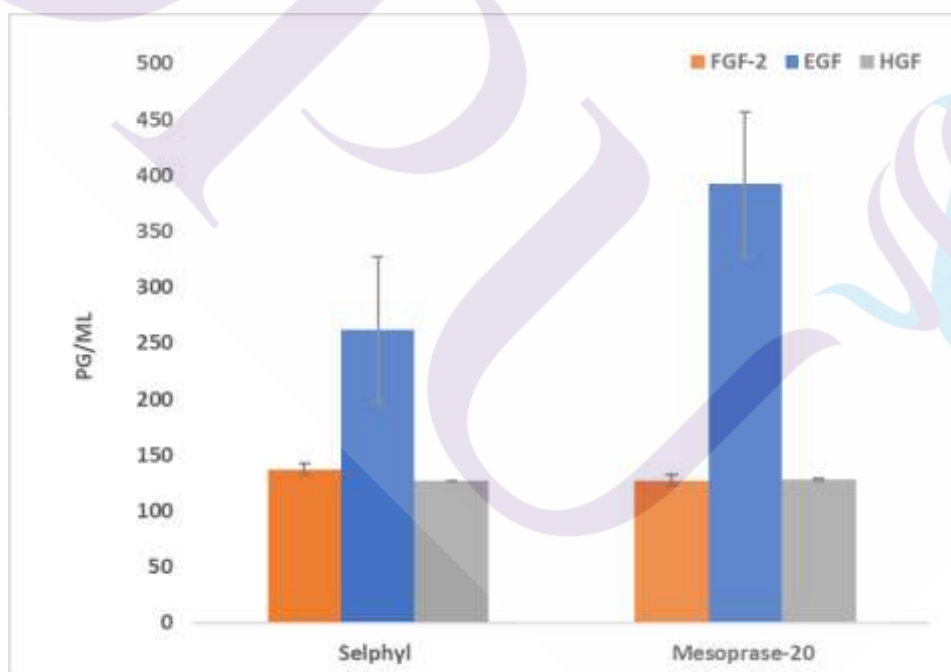
ตารางที่ 4.2 ผลการตรวจวิเคราะห์ระดับสารโปรตีนชีวภาพ Growth factors Profile และ Inflammatory Profile ที่ได้จากการปั่นแยก PRP โดยใช้ชุดปั่นแยก PRP 2 ชนิด

Parameters	ปริมาณ Growth factors และ Inflammatory Profile (pg/ml)		
	Selphyl	Mesoprase-20	p -value
PDGF-BB (pg/ml) (mean \pm S.D.)	227,315.80 \pm 29,298.10	259,597.10 \pm 6,251.08	0.170
EGF (pg/ml) (mean \pm S.D.)	261.80 \pm 126.7	392.10 \pm 158.72	0.040*
FGF-2 (pg/ml) (mean \pm S.D.)	137.17 \pm 11.77	127.28 \pm 13.89	0.034*
HGF (pg/ml) (mean \pm S.D.)	126.54 \pm 35.32	128.24 \pm 33.87	0.961
IL-8 (pg/ml) (mean \pm S.D.)	5.48 \pm 7.01	7.78 \pm 9.82	0.148

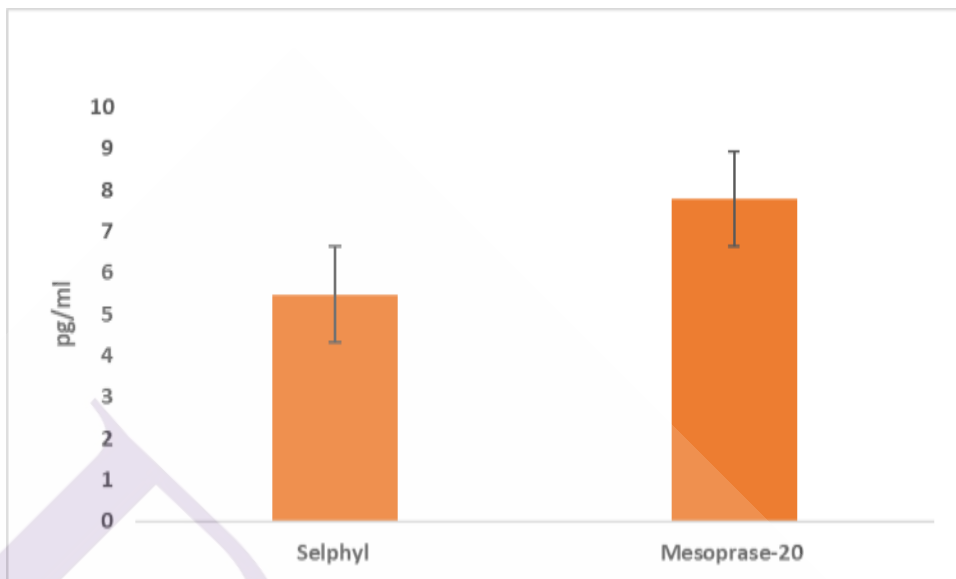
*Based on the results of independent sample T-Test (two-tailed), * p < 0.05 was considered statistically significant*



ภาพที่ 4.3 กราฟแสดงการเปรียบเทียบปริมาณของ PDGF-BB ที่ตรวจวัดได้ใน PRP ที่ได้จากการปั่นแยกด้วยชุดปั่น Selphyl และ Mesoprase-20



ภาพที่ 4.4 กราฟแสดงการเปรียบเทียบปริมาณของ FGF-2, EGF และ HGF ที่ตรวจวัดได้ใน PRP ที่ได้จากการปั่นแยกด้วยชุดปั่น Selphyl และ Mesoprase-20



ภาพที่ 4.5 กราฟแสดงการเปรียบเทียบปริมาณของ IL-8 ที่ตรวจวัดได้ใน PRP ที่ได้จากการปั่นแยกด้วยชุดปั่น Selphyl และ Mesoprase-20

บทที่ 5

สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

งานวิจัยพบว่า PRP ที่ปั่นแยกได้จากเลือดปริมาณน้อย ยังคงมีสารโปรตีนชีวภาพ เช่น cytokine, chemokine profiles และ inflammatory makers การเปรียบเทียบ PRP ที่ปั่นแยกจากชุดปั่นชนิดมีเจล(Selphyl)กับชุดปั่นแยกชนิดไม่มีเจล (Mesoprase-20) พบว่ามีองค์ประกอบทางชีวภาพไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ชุดปั่นแยกชนิดมีเจล (Selphyl) สามารถปั่นแยก PRP ได้โดยมีปริมาณของเม็ดเลือดขาวได้น้อยกว่าชนิดที่ไม่มีเจล (Mesoprase-20) และสามารถทำการเตรียมปั่นแยก PRP ได้จาก whole blood ซึ่งวิธีการเตรียมไม่ยุ่งยาก สะดวก และเป็นระบบปิดอย่างสมบูรณ์ อย่างไรก็ตามองค์ประกอบชีวภาพภายใน PRP ที่ได้ นั้นมีความแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับปัจจัยภายในของแต่ละบุคคลและชนิดของชุดปั่นแยก PRP ยังคงเป็นปัจจัยหลักที่ส่งผลต่อคุณภาพของ PRP ที่ได้ อย่างไรก็ตามเนื่องจากการศึกษาในครั้งนี้มีข้อจำกัดเรื่องของจำนวนตัวอย่างที่น้อยเกินไป จึงควรทำการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

5.2 อภิปรายผลการวิจัย

Pochini และคณะได้ทำการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการตรวจหาปริมาณสารโปรตีนชีวภาพ และทำการตรวจวัดองค์ประกอบภายใน PRP โดยเตรียม PRP แบบระบบเปิดเปรียบเทียบกับชุดปั่นแยก PRP แบบหลอด ยี่ห้อ GPS III และ Magellan(606.33±84), (1630.25±271) พบว่าค่าเฉลี่ยของจำนวนเกล็ดเลือดที่ปั่นแยกได้จากชุดปั่นแยก PRP ทั้ง 2 ชนิดมีค่าสูงกว่าค่าเฉลี่ยจำนวนเกล็ดเลือดที่เตรียมแบบระบบเปิดและเมื่อเทียบกับค่ามาตรฐานของ PRP ซึ่งทางสภากาชาดได้กำหนดไว้ ซึ่งควรมีค่าอย่างน้อยเท่ากับ 200,000 platelets/ μ (Boswell SG, et al, 2012) พบว่ามีค่าสูงกว่าเกณฑ์ทางสภากาชาดกำหนดไว้ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองในครั้งนี้ โดยชุดปั่นแยก PRP Selphyl และ Mesoprase-20 ได้ค่าเฉลี่ยที่ (210.6 ± 58.95) และ (261.8 ± 67.58) ตามลำดับ และเมื่อเทียบกับเกณฑ์ทางสภากาชาดแล้วพบว่ามีค่าเฉลี่ยของจำนวนเกล็ดเลือดใน PRP หลังปั่นแยกสูงกว่าเกณฑ์ทางสภากาชาดได้กำหนดไว้

จากการศึกษาวิจัยพบว่า ค่าเฉลี่ยจำนวนเกล็ดเลือดใน whole blood และ PRP ของชุดปั่นแยก Selphyl และชุดปั่นแยก Mesoprase-20 มีจำนวนเกล็ดเลือดที่ตรวจวัดได้ใน whole blood มากกว่า PRP ของชุดปั่นแยกทั้ง 2 ชนิด (311.80 ± 59.86 vs. 199.6 ± 58.95, 261.8 ± 67.58) ซึ่งต่าง

จากงานวิจัยของ Eppley และคณะ โดยทำการศึกษเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยจำนวนเกล็ดเลือดจาก whole blood และ PRP พบว่าค่าเฉลี่ยจำนวนเกล็ดเลือดใน PRP มีปริมาณมากกว่าใน whole blood ถึง 8 เท่า (197 ± 42 , $1,600 \pm 330$) (Eppley, et al, 2004) อาจเป็นเพราะปริมาณของเลือดที่นำมาปั่นแยก PRP มีปริมาณไม่เท่ากันเนื่องจากคำแนะนำที่แตกต่างกันของชุดปั่นแยก PRP ส่งผลให้องค์ประกอบชีวภาพภายใน PRP ที่วัดได้มีปริมาณที่ต่างกันออกไป

จากการทบทวนศึกษาวิจัยของ Bowen และ Remaley พบว่าค่าความถ่วงจำเพาะของเม็ดเจล (Gel particles) ที่ใช้ในหลอดเก็บเลือดทั่วไปในห้องปฏิบัติการทางการแพทย์พบว่ามีค่าเท่ากับ 1.04 และค่าความถ่วงจำเพาะของส่วนประกอบอื่นๆเช่นซีรัมหรือพลาสมามีค่าอยู่ในช่วง 1.026 ถึง 1.031 และก้อนลิ่มเลือดเม็ดเลือดแดงมีค่าอยู่ในช่วง 1.092 ถึง 1.095 (Bowen, et al, 2012) และจากรายงานการศึกษาวิจัยของ Keever-Taylor และคณะได้รายงานเกี่ยวกับค่าความถ่วงจำเพาะของเกล็ดเลือดว่ามีค่าประมาณเท่ากับ 1.030 (Keever-Taylor, et al, 2014) ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบค่าความถ่วงจำเพาะของเกล็ดเลือดและเม็ดเจลพบว่ามีค่าใกล้เคียงกันซึ่งทางผู้วิจัยสันนิษฐานว่าอาจเป็นไปได้ว่าหลังทำการปั่นแยก PRP แล้วอาจมีเกล็ดเลือดบางส่วนติดอยู่ในชั้นเม็ดเจลจึงทำให้ค่าของจำนวนเกล็ดเลือดที่ตรวจวัดได้ใน PRP หลังปั่นแยกจากชุดปั่นแยก Selphyl นั้นมีค่าน้อยกว่าชุดปั่นแยก Mesoprase-20 และจากรายงานการทบทวนของ Rhoades และ Bell ได้กล่าวถึงค่าความถ่วงจำเพาะของ red blood cell และ white blood cell มีค่าประมาณ 1.115 และ 1.070 (Rhoades, et al, 2014) ตามลำดับ จากการเปรียบเทียบค่าความถ่วงจำเพาะของเม็ดเลือดขาวเทียบกับเม็ดเจลแล้ว พบว่าค่าความถ่วงจำเพาะของเม็ดเลือดขาวมีค่ามากกว่าเม็ดเจล โดยทางผู้วิจัยได้สันนิษฐานว่าอาจเป็นไปได้เมื่อทำการปั่นแยก PRP แล้วทำให้เม็ดเลือดขาวส่วนใหญ่จะตกลงไปอยู่ด้านล่างชั้นเม็ดเจลและอาจมีเม็ดเลือดขาวบางส่วนตกอยู่ด้านบนบนเม็ดเจล เมื่อทำการตรวจวัดจำนวนเม็ดเลือดขาวใน PRP หลังปั่นแยกด้วยชุดปั่นแยก Selphyl จึงทำให้มีค่าของจำนวนเม็ดเลือดขาวที่ปั่นเพื่อนใน PRP แต่อย่างไรก็ตามการปั่นเพื่อนของเม็ดเลือดขาวใน PRP ที่ปั่นแยกโดย Selphyl ยังมีจำนวนน้อยกว่าเม็ดเลือดขาวใน PRP ที่ปั่นแยกด้วยชุดปั่นแยก Mesoprase-20 ในขณะที่ชุดปั่นแยก Mesoprase-20 ไม่มีตัวกันระหว่างเม็ดเลือดแดงกับ PRP (Gel particle) มีเพียงชั้นรอยต่อระหว่างเม็ดเลือดแดงและพลาสมาที่เรียกว่า ชั้นบัฟฟีโคต (Buffy Coat) ซึ่งประกอบไปด้วยเม็ดเลือดขาวและเกล็ดเลือดจึงทำให้สามารถพบการปั่นเพื่อนของเม็ดเลือดขาวใน PRP ที่ปั่นแยกได้จากชุดปั่นแยก Mesoprase-20 ได้

ในอดีตยังไม่เคยมีการทำการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการตรวจหาปริมาณ โปรตีนชีวภาพ cytokine, chemokine profiles และ Inflammatory makers ใน PRP ที่ปั่นแยกได้จากเลือดที่มีปริมาณน้อย ๆ โดยทั่วไปจะใช้ PRP ที่ปั่นแยกจากเลือดปริมาณมาก และเนื่องจากต้องทำการตรวจหาปริมาณ สารในระดับพิโคกรัม (pg) จึงต้องใช้เทคโนโลยีขั้นสูง (Luminex magpix 200, MERCKThailand) ในการตรวจหาสารโปรตีนชีวภาพดังกล่าว จึงมีค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูง จึงทำให้

สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้เพียง 5 ตัวอย่าง อย่างไรก็ตามจากการศึกษาวิเคราะห์ข้อมูล cytokine, chemokine profiles และ Inflammatory makers ในครั้งนี้พบว่าระดับของ PDGF-BB, HGF และ IL-8 ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และ PRP ที่ปั่นแยกได้จาก Selphyl และ Mesoprase-20 มีระดับของ EGF (261.80 ± 126.7 vs. 392.10 ± 158.72 , $p=0.040$) และ FGF-2 (137.17 ± 11.77 vs. 127.28 ± 13.89 , $p=0.034$) แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเป็นที่น่าสังเกตว่าเมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนเกล็ดเลือดแล้ว พบว่าระดับของ FGF-2 ไม่ได้สอดคล้องกับจำนวนเกล็ดเลือดที่ตรวจนับได้หลังปั่นแยก PRP โดยจำนวนเกล็ดเลือดใน PRP ที่ปั่นแยกได้จาก Selphyl นั้นมีค่าน้อยกว่า Mesoprase-20 (210.6 ± 58.95 vs. 261.8 ± 67.58) ตามลำดับ แต่กลับมีระดับของ FGF-2 ใน PRP สูงกว่า (137.17 ± 11.77 vs. 127.28 ± 13.89) ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Pochini และคณะ ได้รายงานว่าการศึกษาและตรวจวิเคราะห์ระดับของ cytokine, chemokine profiles ใน PRP โดยใช้ชุดปั่นแยก PRP เปรียบเทียบกับ PRP ที่เตรียมได้จากวิธีระบบเปิด พบว่าระดับของ TGF- β และ FGF-2 ไม่จำเป็นต้องสอดคล้องกับจำนวนเกล็ดเลือดที่ได้หลังจากปั่นแยก PRP เนื่องจากโดยปกติแล้วระดับ FGF-2 สามารถตรวจพบได้ในกระแสเลือดและมีในระดับที่ค่อนข้างต่ำมาก (Lee, et al, 2013) แต่เมื่อพิจารณาระดับ EGF ที่ตรวจวัดได้ใน PRP หลังปั่นแยก พบว่าระดับของ EGF มีความสอดคล้องกับจำนวนเกล็ดเลือดใน PRP ซึ่งจากการศึกษาพบว่าแหล่งของ EGF ในกระแสเลือดของคนปกติทั่วไปพบมากที่สุด ใน Alpha granules ของเกล็ดเลือด (Ben-Ezra, et al, 1990) จึงสามารถอธิบายได้ว่าระดับ EGF ใน PRP ที่ปั่นแยกได้จากชุดปั่น Selphyl มีค่าน้อยกว่า Mesoprase-20 เนื่องจากองค์ประกอบทางชีวภาพภายใน PRP ที่ได้จากชุดปั่น Selphyl มีจำนวนเกล็ดเลือดหลังปั่นแยกน้อยกว่า Mesoprase-20 จึงส่งผลให้ระดับของ EGF ใน PRP ที่ปั่นแยกได้จาก Selphyl มีค่าน้อยกว่า Mesoprase-20

5.3 ข้อเสนอแนะ

1. ควรทำการศึกษาโดยใช้กลุ่มประชากรให้มากขึ้นในงานวิจัยครั้งถัดไป
2. เนื่องด้วยครั้งนี้ทำการศึกษาในประชากรเพศชาย ในอนาคตอาจจะทำในประชากรทั้งเพศชาย เพศหญิงและคนที่สูบบุหรี่และไม่สูบบุหรี่
3. ในงานวิจัยครั้งถัดไปอาจจะศึกษาในประชากรที่มีโรคประจำตัวร่วมด้วยแต่ไม่ได้เป็นโรคเลือด
4. ในงานวิจัยครั้งถัดไปอาจจะทำการศึกษาเทคนิคในการปั่นแยกที่หลากหลายมากขึ้น
5. ในการวิจัยครั้งถัดไปอาจจะเพิ่มการตรวจชนิดอื่นเพื่อจะได้ลองเปรียบเทียบเครื่องตรวจต่างๆ



บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

- Alsousou J, Thompson M, Hulley P, Noble A, Willett K. (2009). The biology of platelet-rich plasma and its application in trauma and orthopaedic surgery: a review of the literature. *J Bone Joint Surg Br.* 91(8):987-96
- Alves R, Grimalt R. (2017). A Review of Platelet-Rich Plasma: History, Biology, Mechanism of Action, and Classification. *S. Karger AG (Basel).* 4:18-24
- Angel MJ, Sgaglione NA, Grande DA. (2006). Clinical applications of bioactive factors in sports medicine: current concepts and future trends. *Sports Med Arthrosc.* 14(3):138-45.
- Anitua E, Sánchez M, Nurden AT, Nurden P, Orive G, Andía I. (2006). New insights into and novel applications for platelet-rich fibrin therapies. *Trends Biotechnol.* 24(5):227-34
- Arshdeep M, Sendhil K. (2014). Platelet-rich plasma in dermatology: Boon or a bane?. *Indian J Dermato.* 80(1):5-14
- Boswell SG, Cole BJ, Sundman EA, Karas V, Fortier LA. (2012). Platelet-rich plasma: a milieu of bioactive factors. *Arthroscopy.* 28(3):429-39
- Bowen RA, Remaley AT. (2014). Interferences from blood collection tube components on clinical chemistry assays. *Biochem Med (Zagreb).* 24(1):31-44.
- Braun HJ, Kim HJ, Chu CR, Dragoo JL. (2014). The Effect of Platelet-Rich Plasma Formulations and Blood Products on Human Synoviocytes, Implications for Intra-articular Injury and Therapy. *AmJ Sports Med.* 42(5):1204-10
- Cho JW, Kim SA, Lee KS. (2012). Platelet-rich plasma induces increased expression of G1 cell cycle regulators, type I collagen, and matrix metalloproteinase-1 in human skin fibroblasts. *Int J Mol Med.* 29:32-6.
- Corps AN, Harrall RL, Curry VA, Fenwick SA, Hazleman BL, Riley GP. (2002). Ciprofloxacin enhances the stimulation of matrix metalloproteinase 3 expression by interleukin-1beta in human tendon-derived cells. A potential mechanism of fluoroquinolone-induced tendinopathy. *Arthritis Rheum.* 46(11):3034-40
- De Jonge S, de Vos RJ, Weir A, van Schie HT, Bierma-Zeinstra SM, Verhaar JA, et al. (2011). One-year follow-up of platelet-rich plasma treatment in chronic Achilles tendinopathy: a double-blind randomized placebo-controlled trial. *AmJ Sports Med.* 39(8):1623-9

- De Vos RJ, Weir A, van Schie HT, Bierma-Zeinstra SM, Verhaar JA, Weinans H, et al. (2010). Platelet-rich plasma injection for chronic Achilles tendinopathy: a randomized controlled trial. *JAMA*. 303(2):144-9
- Dohan Ehrenfest DM, Rasmusson L, Albrektsson T. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte-and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends Biotechnol.* (2009). 27(3):158-67
- Fedorczyk JM, Barr AE, Rani S, Gao HG, Amin M, Amin S, et al. (2010). Exposure dependent increases in IL-1beta, substance P, CTGF, and tendinosis in flexor digitorum tendons with upper extremity repetitive strain injury. *J Orthop Res*. 28(3):298-307
- Gaissmaier C, Fritz J, Krackhardt T, Flesch I, Aicher WK, Ashammakhi N. (2005). Effect of human platelet supernatant on proliferation and matrix synthesis of human articular chondrocytes in monolayer and three-dimensional alginate cultures. *Biomaterials*. 26(14):1953-60
- Goldring MB, Otero M, Plumb DA, Dragomir C, Favero M, El Hachem K, et al. (2011). Roles of inflammatory and anabolic cytokines in cartilage metabolism: signals and multiple effectors converge upon MMP-13 regulation in osteoarthritis. *Eur Cell Mater*. 21:202-20
- Gómez-Caro A, Ausin P, Boada M. (2011). Platelet rich plasma improves the healing process after airway anastomosis. *Interact Cardiovasc Thorac Sur*. 13(6):552-6
- Gott M, Ast M, Lane LB, Schwartz JA, Catanzano A, Razzano P, et al. (2011). Tendon phenotype should dictate tissue engineering modality in tendon repair: a review. *Discov Med*. 12(62): 75-84
- Harrison P, Cramer EM. (1993). Platelet alpha-granules. *Blood Rev*. 7(1):52-62.
- Jane Fitzpatrick, FACSP, MBBS, Max K. Bulsara. Et al. (2017). Analysis of Platelet-rich plasma Extraction. *The Orthopaedic Journal of Sports Medicine*, 5(1)
- Keever-Taylor CA, Schmidt K, Zeng H, Morris D, Heidtke S, Konings S. et al. (2014). Determination of the volume of HPC, A pheresis products based on weight in grams. *blood*. 19:128-130

- Kim DH, Young JJ, Kim CD, Lee YH, Seo YH, Lee JH, Lee Y. (2011). Can Platelet-rich Plasma Be Used for Skin Rejuvenation? Evaluation of Effects of Platelet-rich Plasma on Human Dermal Fibroblast. *Ann Dermatol.* 23(4):424-31
- Laki K. (1972). Our ancient heritage in blood clotting and some of its consequences. *NYAS.* 202: 297–307.
- Latalski M, Elbatrawy YA, Thabet AM, Gregosiewicz A, Raganowicz T, FatygaM. (2011). Enhancing bone healing during distraction osteogenesis with platelet-rich plasma. *Injury.*42(8):821-4
- Lubkowska A, Dolegowska B, Banfi G. (2012). Growth factor content in PRP and their applicability in medicine. *J Biol Regul Homeost Agents.* 26 (2 Suppl 1):3S-22S.
- Lucarelli E, Beccheroni A, Donati D, Sangiorgi L, Cenacchi A, Del Vento AM, et al. (2003). Platelet-derived growth factors enhance proliferation of human stromalstem cells. *Biomaterials.* 24(18):3095-100
- Machlus KR; Thon JN; Italiano JE. (2014). Interpreting the developmental dance of the megakaryocyte: A review of the cellular and molecular processes mediating platelet formation. *BR. J Haematology.* 165(2): 227–36
- Marius Raica, Anca Maria Cimpean. Platelet-Derived Growth Factor (PDGF)/PDGF Receptors (PDGFR) Axis as Target for Antitumor and Antiangiogenic Therapy. *Pharmaceuticals (Basel).* 2010 Mar; 3(3): 572–599.
- Marx RE. (2004). Platelet-rich plasma: evidence to support its use. *J Oral MaxillofacSur.* 62(4):489-96.
- Michael W King. Growth Factors. (2018, September 13). From <https://themedicalbiochemistrypage.org/growth-factors.php>
- Mishra A, Woodall J Jr., Vieira A. (2009). Treatment of tendon and muscle using platelet-rich plasma. *Clin Sports Med.* 28(1):113-25
- PietrzakWS, Eppley BL. (2005). Platelet rich plasma: biology and new technology. *J Craniofacial Surg.* 16:1043-54.
- Pochini AC, Antonioli E, Bucci DZ, SardinhaLR, Andreoli CV, Ferretti M, et al. (2016). Analysis of cytokine profile and growth factors in platelet-rich plasma obtained by open systems and commercial columns. *Creative Commons Attribution 4.0 IL.* 14(3):391-7

- Rutgers M, Saris DB, Dhert WJ, Creemers LB. (2010). Cytokine profile of autologous conditioned serum for treatment of osteoarthritis, in vitro effects on cartilage metabolism and intra-articular levels after injection. *Arthritis Res Ther.* 12: R114
- Sampson S, Gerhardt M, Mandelbaum B. (2008). Platelet rich plasma injection grafts for musculoskeletal injuries: a review. *Curr Rev Musculoskeletal Med.* 1(3-4): 165-74
- Sánchez-González DJ, Méndez-Bolaina E, Trejo-Bahena NI. (2012). Platelet-rich plasmapeptides: key for regeneration. *Int J Pept.* 532519:1-10.
- Schettino AM, de Oliveira DF, Franco TR. (2011). Use en autologous plasma in abdominoplasty: previous note. *Rev Col Bras Cir.* 38(3):202-4
- Sundman EA, Cole BJ, Fortier LA. (2011). Growth factor and catabolic cytokine concentrations are influenced by the cellular composition of platelet-rich plasma. *Am J Sports Med.* 39(10):2135-40
- Taniguchi Y, Yoshioka T, Sugaya H, Goshō M, Aoto K, Kanamori A, et al. (2019). Growth factor levels in leukocyte-poor platelet-rich plasma and correlations with donor age, gender, and platelets in the Japanese population. *J Exp. Orthop.* 6: 4.
- Taylor DW, Petrera M, Hendry M, Theodoropoulos JS. (2011). A systematic review of the use of platelet-rich plasma in sports medicine as a new treatment for tendon and ligament injuries. *Clin J Sport Med.* 21(4):344-52
- Toshikazu N., Shin YM. (2010). The discovery of Hepatocyte Growth Factor (HGF) and its significance for cell biology, life sciences and clinical medicine. *Jpn. Acad., Ser.* 86:588-610
- Ugur MG, Kutlu R, Kilinc I. (2018). The effects of smoking on vascular endothelial growth factor and inflammatory marker: a case-control study. *Clin Respir J.* 12(5): 1912-18
- Waite GN. Blood components. In: Rhoades RA, Bell DR. (2009). *Medical Physiology Principles for Clinical Medicine.* 3th ed. Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer business. N.Y. p.169-87.
- Wasterlain AS, Braun HJ, Harris AH, Kim HJ, Drago JL. (2013). The systemic effects of platelet-rich plasma injection. *Am J Sports Med.* 41(1): 186-93

- Whitman DH, Berry RL, Green DM. (1997). Platelet gel: an autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. *J Oral Maxillofac Surg.* 55:1294–9.
- Xiong G, Lingampalli N, Koltsov JCB, Leung LL, Bhutani N, Robinson WH, et al. (2018). Men and women differ in the biochemical composition of platelet-rich plasma. *Am J Sports Med.* 46(2): 409-19.
- Yin WJ, Xu HT, Sheng JG, An ZQ, Guo SC, Xie XT et al. (2016). Advantages of Pure Platelet-Rich Plasma Compared with Leukocyte- and Platelet-Rich Plasma in Treating Rabbit Knee Osteoarthritis. *Med Sci Monit.* 22:1280-90.



ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล	อัศวินท์ ดำรงวัฒนโกคิน
ประวัติการศึกษา	พ.ศ. 2557 แพทยศาสตรบัณฑิต มหาวิทยาลัยรังสิต
ประวัติการทำงาน	พ.ศ. 2558 แพทย์เพิ่มพูนทักษะ รพ. อานันท์มหิดล พ.ศ. 2559 แพทย์ประจำ รมรวินท์ คลินิก
ตำแหน่งและสถานที่ทำงาน	แพทย์ประจำ รมรวินท์ คลินิก

