

การศึกษาเปรียบเทียบองค์ประกอบทางชีวภาพของน้ำเลือดที่อุดมไปด้วยเกล็ดเลือดหลังปั่นด้วยชุดปั่นแยกชนิดมีเจลและไม่มีเจล

ณัฐวุฒิ วงษ์ดีไทย พ.บ.* **, เทพพิทักษ์ คำเมือง วท.บ.** , อัครวิน คำรงค์วัฒนโกศล พ.บ.* , เจตนา รongเดช วท.บ.** ,
ยุพา เพ็งธรรม วท.บ.** , พัฒนา เต็งอ้วนวย พ.บ. ปร.ด.* **,

*มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิต ถนนประชาชื่น แขวงทุ่งสองห้อง เขตหลักสี่ กรุงเทพมหานคร 10210

**บริษัทเซลเทค จำกัด 147 อินทามระ 33 ถนนสุขุมวิท ดินแดง กรุงเทพมหานคร 10400

Abstract: Comparison of Bioactive Proteins in Platelet-Rich Plasma (PRP) Obtained from Gel Particles and Non-Gel Particles by using a Commercial Centrifuge Column kit

Wongdeethai N* **, Thummuang T** , Damrongwattanapokin A* , Rongdet J** , Pengtum Y** ,
Teng-umnuay P* **,

*Dhurakij Pundit University Prachachuen Rd., Laksi, Bangkok, 10210

**Celtac Company Limited, 147 Inthamara 33, Suthisarn Rd., Dindaeng, Bangkok, 10400

(E-mail: doctorpatana@yahoo.com)

(Received: May 14, 2019; Revised: August 8, 2019; Accepted: August 27, 2019)

Evaluation of bioactive proteins in platelet-rich plasma after preparation, by using commercial centrifuge kits. 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 (Mesopraser-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 Mesopraser-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 Mesopraser-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 Mesopraser-20 when isolating PRP with less white blood cells. Regardless, red blood cells, platelets and bioactive proteins showed slightly significant differences as compared to Mesopraser-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, Mesopraser-20, Celtac Thailand

บทคัดย่อ

การศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาเพื่อวิเคราะห์ และเปรียบเทียบปริมาณองค์ประกอบทางชีวภาพหลังการปั่นแยก PRP โดยทำการเจาะเลือดจากกลุ่มอาสาสมัครเพศชาย อายุระหว่าง 20 – 30 ปี จำนวน 5 คน โดยอาสาสมัคร 1 คน จะทำการปั่นแยกส่วนประกอบของ PRP โดยใช้ชุดปั่นแยก 2 ชนิดคือ 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) และ สารบ่งชี้สภาวะการอักเสบ (Inflammatory profile) ได้แก่ Interleukin-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 ในขณะที่จำนวนเม็ดเลือดแดง และเกล็ดเลือดนั้นไม่มีความแตกต่างกัน ผลการเปรียบเทียบปริมาณสารโปรตีนชีวภาพใน PRP ทั้ง 2 ชนิดพบว่าระดับ 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 แต่เมื่อพิจารณาระดับ 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 แล้วได้องค์ประกอบทางชีวภาพที่สามารถตรวจพบได้ภายใน PRP โดยมีปริมาณของเม็ดเลือดขาวที่น้อยกว่าชุดปั่นแยก Mesoprase-20 และมีจำนวนเกล็ดเลือด และเม็ดเลือดแดง รวมถึงสารโปรตีนชีวภาพ Cytokine, Chemokine Profiles และ Inflammatory maker นั้นมีความแตกต่างเล็กน้อยเมื่อเทียบกับ Mesoprase-20 และยังสามารถทำการเตรียมปั่นแยก

สกัด PRP ได้จาก Whole blood โดยไม่ยุ่งยาก สะดวก รวดเร็ว และเป็นระบบปิดอย่างสมบูรณ์ แต่อย่างไรก็ตามองค์ประกอบชีวภาพต่าง ๆ ภายใน PRP ที่ได้นั้นมีความแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับปัจจัยภายในของแต่ละบุคคลและชนิดของชุดปั่นแยก PRP ซึ่งเป็นปัจจัยหลักที่ส่งผลต่อคุณภาพของ PRP ที่ได้

คำสำคัญ: พลาสมาที่มีปริมาณเกล็ดเลือดสูง Selphyl, Dermalink Thailand, Mesoprase-20, Celtac Thailand

บทนำ

Platelet-rich plasma (PRP) คือน้ำเลือดที่อุดมไปด้วยเกล็ดเลือดปริมาณมาก สามารถเตรียมได้จากเลือดครบส่วน (whole blood) โดยผ่านกระบวนการทำให้เข้มข้นขึ้นด้วยการปั่นแยกเอาส่วนของน้ำเลือดที่มีส่วนผสมสารกันเลือดแข็ง หรือพลาสมา (plasma) และเกล็ดเลือด แยกออกจากเม็ดเลือดแดง (red blood cell) และเม็ดเลือดขาว (white blood cell)

PRP ได้ถูกนำมาใช้ ในการศัลยกรรมตกแต่งใบหน้า (maxillofacial surgery) ศัลยกรรมตกแต่งภายในช่องปาก (oral surgery) โดย PRP ที่ใช้เป็นกาวไฟบริน (fibrin glue / fibrin sealant / fibrin gel / platelet gel) หรือเพลาเททริชไฟบริน (platelet-rich fibrin / PRF, platelet-rich fibrin matrix / PRFM) ซึ่งเตรียมได้การปั่น PRP จากเลือดตนเอง (autologous PRP) แล้วกระตุ้นให้เกิดก้อนไฟบริน (fibrin clot formation) โดยใช้ thrombin หรือ calcium chloride¹ อีกทั้งในด้านการศัลยกรรมกระดูก เวชศาสตร์การกีฬา และทันตกรรม ได้มีการประยุกต์นำ PRP และ platelet gel มาใช้ เนื่องจากคุณสมบัติของ PRP และ platelet gel มีช่วยเร่งในการฟื้นฟู และซ่อมแซมเนื้อเยื่อไม่ว่าจะเป็นเนื้อเยื่ออ่อน (soft tissue) เนื้อเยื่อแข็ง (hard tissue)² เส้นเอ็น (ligaments) กล้ามเนื้อ (muscles) และกระดูกอ่อน (tendons)³ และยังมีส่วนช่วยในการห้ามเลือด (hemostatic) และส่งเสริมการรักษาบาดแผล (wound healing)¹ โดยความเข้มข้นของเกล็ดเลือดใน PRP ที่ใช้มีค่ามากกว่าค่าปกติในเลือด นี่จึงเป็นจุดเริ่มต้นของการประยุกต์ พัฒนาคุณภาพของกรรมวิธีการเตรียม และผลิต PRP เพื่อใช้ในด้านต่าง ๆ ของการผ่าตัดศัลยกรรมมากขึ้น

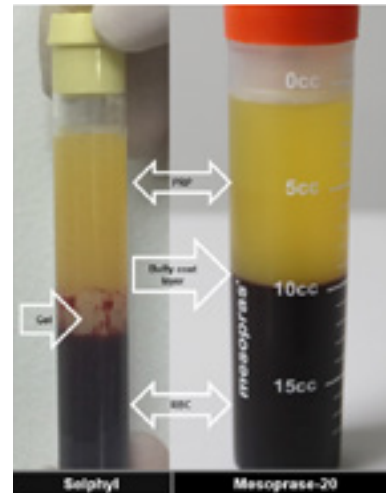
การพบการปนเปื้อนของเม็ดเลือดแดงใน PRP สามารถบ่งบอกถึงประสิทธิภาพของ PRP และความสำเร็จหรือความล้มเหลวของการรักษาโดยใช้ PRP ได้ มีรายงานพบการปนเปื้อนของเม็ดเลือดแดงใน PRP ที่ใช้สำหรับทำหัตถการฉีดข้อเข้า (intra-articular injection) สามารถทำให้เกิดการระคายเคืองบริเวณเยื่อหุ้ม Synovial ได้⁴ นอกจากนี้การปนเปื้อนของเม็ดเลือดขาวอาจมีผลเกี่ยวข้องกับการป้องกันเนื้อเยื่อ และก่อให้เกิดการอักเสบได้³ การพบการปนเปื้อนของเม็ดเลือดขาว

ทำให้มีสารชักนำการอักเสบ (inflammatory cytokines) เพิ่มขึ้น ส่งผลต่อประสิทธิภาพและศักยภาพของการฟื้นฟูซ่อมแซมเนื้อเยื่อของ PRP แต่ก้อาจก่อให้เกิดการอักเสบ และจำกัดประสิทธิภาพการใช้งานของ PRP อีกด้วย⁵⁻⁶ อย่างไรก็ตามงานวิจัยพบว่าการปนเปื้อนของเม็ดเลือดขาวใน PRP อาจมีผลทำให้เกิดการป้องกันและยับยั้งแบคทีเรียใน PRP ได้

การเตรียม PRP โดยทั่วไปนิยมเตรียมได้จากเลือดครบส่วน⁷⁻⁸ ซึ่งเตรียมด้วยวิธีระบบเปิด (open method) โดยใช้หลอดพลาสติก (columns) ที่มีอยู่ในชุดปั่นแยก PRP สำเร็จรูป ทำการปั่นแยกส่วนประกอบของเลือดจาก whole blood แล้วดูดส่วนของ plasma มาเตรียมเป็น PRP ถึงแม้ว่า open method จะเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพมาก⁹ แต่ยังเป็นวิธีที่ค่อนข้างยุ่งยากในการเตรียมปั่นแยก PRP ให้มีปริมาณของเกล็ดเลือดสูง และอาจเสี่ยงต่อการปนเปื้อนของเม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาวได้ ทางคณะผู้ศึกษามีความสนใจที่จะศึกษา เปรียบเทียบเพื่อหาความสัมพันธ์ขององค์ประกอบทางชีวภาพภายใน PRP หลังปั่นแยกได้จากชุดปั่นแยก 2 ชนิด คือ ชุดปั่นแยก PRP ด้วยระบบปิดชนิดไม่มีเม็ดเจล (non-gel separator) โดยใช้ sodium citrate tube (Mesoprase-20, Celtac Thailand) และชุดปั่นแยก PRP ด้วยระบบปิดชนิดมีเม็ดเจล (gel separator) โดยใช้ sodium gel separator tube (Selphyl, Dermalink Thailand) ซึ่งเป็นชุดปั่นแยก PRP ที่ใช้ในการทำ PRFM (platelet-rich fibrin matrix) ในการปั่นแยก PRP จาก whole blood แล้วทำการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างเลือดก่อนและหลังทำการปั่นแยก PRP โดยทำการศึกษาหาความสัมพันธ์ของจำนวนเกล็ดเลือด (platelet count) เม็ดเลือดขาว (white blood cell) เม็ดเลือดแดง (red blood cell) รวมถึงปริมาณของสารโปรตีนชีวภาพ 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) และสารบ่งชี้สถานะการอักเสบ Inflammatory profile ได้แก่ interleukine-8 (IL-8) หลังปั่นแยก PRP โดยการใช้เครื่อง Luminex Magpix 200 (MERCK Thailand) โดยอาศัยหลักการ Magnetic Bead Immuno Chemiluminescence Assay ซึ่งมีความไวสูง และสามารถตรวจหาปริมาณสารชีวภาพ จากตัวอย่างปริมาณน้อย ๆ ได้

วัตถุประสงค์และวิธีการ

เจาะเก็บเลือดจากกลุ่มตัวอย่างอาสาสมัครเพศชาย จำนวน 5 คน คนละ 29 มิลลิลิตร โดยมีอายุเฉลี่ย 20-30 ปี ไม่มีโรคหรือประวัติทางพันธุกรรมเกี่ยวกับเกล็ดเลือดหรือ



ภาพที่ 1 ส่วนประกอบชุดปั่นแยก PRP หลังทำการปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Centrifuge

การแข็งตัวของเลือด และไม่มีประวัติติดเชื้อหรือใช้ยาต้านการอักเสบ หรือยาต้านการแข็งตัวของเลือด เช่น warfarin, heparin อย่างน้อย 10 วัน ก่อนทำการตรวจวิเคราะห์ โดยแบ่งแยกสำหรับปั่นด้วยชุดปั่นแยกระบบปิดโดยใช้ sodium citrate gel separator tube (Selphyl, Dermalink) 9 มิลลิลิตร และปั่นแยกด้วยระบบปิดโดยใช้ sodium citrate tube (Mesoprase-20, Celtac) 20 มิลลิลิตรโดยทำตามคำแนะนำในคู่มือของแต่ละชุดปั่น ปริมาตรของสารละลาย PRP ที่ได้จากการปั่นแยกด้วยชุดปั่นแยก Selphyl ได้สารละลาย PRP ประมาณ 4-5 มิลลิลิตร และสารละลาย PRP ที่ได้จากชุดปั่นแยก Mesoprase-20 จะได้สารละลาย PRP ประมาณ 8-9 มิลลิลิตร และแบ่งสารละลาย PRP ที่ปั่นแยกได้ ตัวอย่างละ 1 มิลลิลิตร เพื่อทำการตรวจนับความสมบูรณ์ของเม็ดเลือด (CBC, complete blood cell count) (BC-5180, Fiermer) จากนั้นนำสารละลาย PRP ที่เหลือมากระตุ้นให้เกิดเป็นก้อน fibrin clot โดยการเติมแคลเซียมกลูโคเนต (calcium gluconate) โดยปริมาณจะใช้ตามคำแนะนำที่มีอยู่ในคู่มือของแต่ละชุดทดสอบ จากนั้นผสมให้เข้ากันด้วย Vortex แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 25-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมงโดยห้ามเขย่าหรือแกว่งหลอดทดลอง เมื่อเกิด fibrin clot จนสมบูรณ์แล้วทำการเขย่าละลายก้อน fibrin clot ด้วย Vertex แล้วปั่นตกตะกอน fibrin clot ด้วยความเร็ว 5,000 rpm ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง centrifuge (ยี่ห้อ Zentrifuge, Hettich) เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำส่วนใสด้านบน (supernatant) ที่ได้กรองด้วยตัวกรองชนิดกระบอกฉีดยา (syringe filter) ที่มีขนาดของรูกรอง 0.10 μm , (Millipore, MERCK Thailand) และ

เก็บตัวอย่างที่ -20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะทำการตรวจวัด โดยทำการวิเคราะห์ตรวจวัดหาปริมาณของสารโปรตีนชีวภาพ โดยใช้ Luminex Magpix 200, MERCK Thailand โดยอาศัยหลักการ Magnetic Bead Immuno Chemiluminescence Assay ในการตรวจวัดหาปริมาณสารโปรตีนชีวภาพและทำตามคู่มือทดสอบ ทั้งนี้เนื่องจากกลุ่มตัวอย่างมีจำนวนน้อยกว่า 30 คน ดังนั้นทางผู้ศึกษาจึงเลือกสถิติ t-test เพื่อใช้อธิบายความสัมพันธ์ของปริมาณสารโปรตีนชีวภาพจากการปั่นแยกสกัดจากชุดปั่นแยก PRP ทั้ง 2 วิธี

ผล

การตรวจนับเซลล์ด้วยเครื่องตรวจนับอัตโนมัติเปรียบเทียบชุดตรวจ Selphyl กับ Mesoprase-20 พบว่า จำนวนเกล็ดเลือดได้ 210.6 กับ 261.8 (103 cells/ μ l) ซึ่งได้น้อยกว่า whole blood, จำนวนเม็ดเลือดขาวได้ 0.10 กับ 0.05 (103 cells/ μ l) และจำนวนเม็ดเลือดแดงได้ 0.01 กับ 0.01 (103 cells/ μ l) ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบค่าทางสถิติพบว่าจำนวนเกล็ดเลือดและจำนวนเม็ดเลือดแดงไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) แต่จำนวนเม็ดเลือดขาวมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ผลการตรวจนับจำนวนเกล็ดเลือด เม็ดเลือดขาว และเม็ดเลือดแดงใน PRP หลังปั่นแยกโดยใช้ชุดปั่นแยก PRP 2 ชนิด

Parameters	Selphyl	Mesoprase-20	p-value
Platelet count in whole blood(10^3 cells/ μ l) mean $\pm$ SD	311.80 $\pm$ 59.86		ND
Platelet count in PRP(10^3 cells/ μ l) mean $\pm$ SD	210.6 $\pm$ 58.95	261.8 $\pm$ 67.58	0.140
White blood cell count (10^3 cells/ μ l) mean $\pm$ SD	0.05 $\pm$ 0.03	0.10 $\pm$ 0.05	0.028*
Red blood cell count (10^6 cells/ μ l) mean $\pm$ SD	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

จากการตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารโปรตีนชีวภาพพบว่าระดับของ PDGF-BB, HGF, Interlukine-8 ได้ค่า $p = 0.170$, 0.961 และ 0.148 ตามลำดับ แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) ส่วน EGF

และ FGF-2 ได้ค่า $p = 0.040$ และ 0.034 แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ตารางที่ 2)

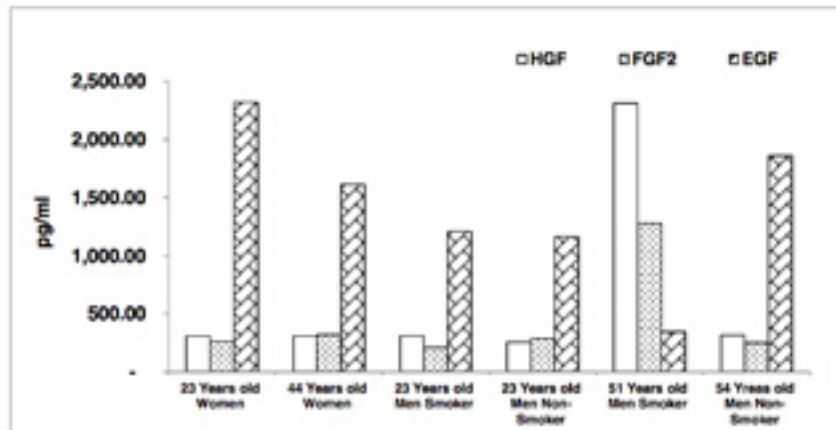
ตารางที่ 2 ผลการตรวจวิเคราะห์ระดับสารโปรตีนชีวภาพ Growth factors Profile และ Inflammatory Profile ที่ได้จากการปั่นแยก PRP โดยใช้ชุดปั่นแยก PRP 2 ชนิด

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

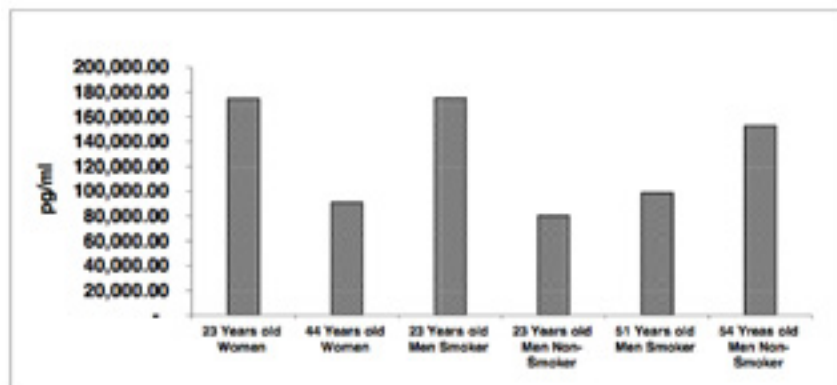
Based on the results of independent sample t-test (two-tailed), * $p < 0.05$ was considered statistically significant

คณะผู้ศึกษาได้ทำการศึกษานำร่องถึงปริมาณของสารโปรตีนชีวภาพที่ได้จากการปั่นเลือดตามวิธีมาตรฐานพบว่า

ความแตกต่างของปริมาณสารโปรตีนชีวภาพใน PRP ในแต่ละบุคคล และพฤติกรรม (ภาพที่ 2 และภาพที่ 3)



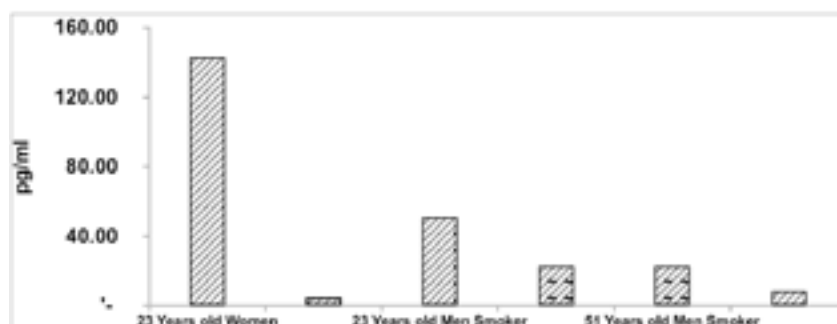
ภาพที่ 2 แสดงปริมาณสารโปรตีนชีวภาพ growth factors EGF, FGF-2 และ HGF ในเพศชาย และเพศหญิง แยกตามอายุ และพฤติกรรม



ภาพที่ 3 ปริมาณสารโปรตีนชีวภาพ Growth factors PDGF-BB ในเพศชาย และเพศหญิงแยกตามอายุ และพฤติกรรม

จากภาพที่ 2 พบว่าระดับของ HGF และ FGF-2 ที่สูงขึ้นพบในเพศชายอายุ 51 ปีที่สูบบุหรี่ ตรงข้ามกับระดับของ EGF ซึ่งมีระดับต่ำเมื่อเทียบกับกลุ่มอื่น จากภาพที่ 3 แสดงระดับของ PDGF-BB มีค่าใกล้เคียงกันในทุกกลุ่ม แต่พบปริมาณของ

PDGF-BB มีระดับสูงสุดในเพศชายอายุ 23 ปีที่สูบบุหรี่ เพศหญิงอายุ 23 ปี และเพศชายอายุ 54 ปีไม่สูบบุหรี่ตามลำดับ นอกจากนั้น ยังพบระดับของ IL-8 ซึ่งมีค่าสูงสุดในเพศหญิงอายุ 23 ปี เมื่อเทียบกับกลุ่มอื่น (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 4 ปริมาณสารโปรตีนชีวภาพ Inflammatory Profile IL- 8 ในเพศชายและเพศหญิง แยกตามอายุและพฤติกรรม

วิจารณ์

จากผลการศึกษาของ Taniguchi¹⁰ ได้ศึกษาถึงความสัมพันธ์ของอายุ เพศ และจำนวนของเกล็ดเลือดกับปริมาณ growth factors ใน leukocyte-poor platelet-rich plasma (LP-PRP) พบว่าอายุที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้มีระดับของ PDGF-BB และ insulin-like growth factor-1 (IGF-1) ที่ลดลงและจำนวนเกล็ดเลือดใน PRP ที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้มีระดับของ PDGF-BB, transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1), EGF และ HGF เพิ่มขึ้น โดยองค์ประกอบภายใน PRP ของผู้ป่วยแต่ละรายมีความแตกต่างกันเนื่องมาจากอายุ และจำนวนเกล็ดเลือดของผู้ป่วยแต่ละราย โดยที่เพศไม่มีผลต่อปริมาณของ growth factors ใน PRP แต่อย่างใด จากการศึกษาของ Xiong¹¹ ซึ่งทำการศึกษถึงความแตกต่างของส่วนประกอบทางชีวภาพใน PRP ระหว่างเพศชายและเพศหญิง พบว่าเพศชายมีระดับ FGF-basic และ PDGF-BB สูงกว่าเพศหญิง โดยในการศึกษานี้มีความแตกต่างกันขององค์ประกอบภายใน PRP โดยมีเพศเป็นปัจจัยหลักที่มีผลต่อองค์ประกอบทางชีวภาพใน PRP มากกว่าอายุ นอกจากนี้ Ugur¹² ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงของระดับ VEGF, IL-6 และ IL-10 ในกลุ่มตัวอย่างที่สูบบุหรี่และไม่สูบบุหรี่พบว่า ในกลุ่มคนที่สูบบุหรี่มีระดับ VEGF และ IL-6 สูงกว่าคนที่ไม่สูบบุหรี่ 39.855 เท่า และ 250.537 เท่าตามลำดับ แต่ในขณะเดียวกันระดับของ IL-10 ในกลุ่มที่สูบบุหรี่มีค่าน้อยกว่า 13.911 เท่าของคนที่ไม่สูบบุหรี่ สำหรับการศึกษานี้ เนื่องจากทำในจำนวนตัวอย่างที่จำกัด จึงไม่สามารถสรุปผลที่แน่ชัดได้ แต่สิ่งหนึ่งที่สามารถบอกได้คือ อายุ เพศ และพฤติกรรมของแต่ละบุคคล อาจส่งผลต่อปริมาณของสารโปรตีนชีวภาพ growth factors และ inflammatory profile ให้มีความหลากหลายและแตกต่างกัน (ภาพที่ 2, 3 และ 4) อย่างไรก็ตามควรมีการทำการศึกษาเพิ่มเติมในกลุ่มตัวอย่างที่มากขึ้น

Pochini¹³ ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับการตรวจหาปริมาณสารโปรตีนชีวภาพและทำการตรวจวัดองค์ประกอบภายใน PRP โดยเตรียม PRP แบบระบบเปิดเปรียบเทียบกับชุดปั่นแยก PRP แบบหลอด ยี่ห้อ GPS III และ Magellan (606.33 $\pm$ 84), (1630.25 $\pm$ 271) พบว่าค่าเฉลี่ยของจำนวนเกล็ดเลือดที่ปั่นแยกได้จากชุดปั่นแยก PRP ทั้ง 2 ชนิดมีค่าสูงกว่าค่าเฉลี่ยจำนวนเกล็ดเลือดที่เตรียมแบบระบบเปิดและเมื่อเทียบกับค่ามาตรฐานของ PRP ซึ่งทางสมาคมกำหนดไว้ซึ่งควรมีค่าอย่างน้อยเท่ากับ 200,000 platelets/ μ l พบว่ามีค่าสูงกว่าเกณฑ์ทางสมาคมกำหนดไว้ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองในครั้งนี้โดยชุดปั่นแยก PRP Selphyl และ Mesopraxe-20 ได้ค่าเฉลี่ยที่ (210.6 $\pm$ 58.95) และ (261.8 $\pm$ 67.58) ตามลำดับ

และเมื่อเทียบกับเกณฑ์ทางสมาคมแล้วพบว่ามีความเฉลี่ยของจำนวนเกล็ดเลือดใน PRP หลังปั่นแยกสูงกว่าเกณฑ์ทางสมาคมกำหนดไว้

จากการศึกษาพบว่า ค่าเฉลี่ยจำนวนเกล็ดเลือดใน whole blood และ PRP ของชุดปั่นแยก Selphyl และชุดปั่นแยก Mesopraxe-20 มีจำนวนเกล็ดเลือดที่ตรวจวัดได้ใน whole blood มากกว่า PRP ของชุดปั่นแยกทั้ง 2 ชนิด (311.80 $\pm$ 59.86 vs. 199.6 $\pm$ 58.95, 261.8 $\pm$ 67.58) ซึ่งต่างจากงานวิจัยของ Eppley¹⁴ โดยทำการศึกษาเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยจำนวนเกล็ดเลือดจาก whole blood และ PRP พบว่าค่าเฉลี่ยจำนวนเกล็ดเลือดใน PRP มีปริมาณมากกว่าใน whole blood ถึง 8 เท่า (197 $\pm$ 42, 1,600 $\pm$ 330) อาจเป็นเพราะปริมาณของเลือดที่นำมาปั่นแยก PRP มีปริมาณไม่เท่ากัน เนื่องจากคำแนะนำที่แตกต่างกันของชุดปั่นแยก PRP ส่งผลให้องค์ประกอบชีวภาพภายใน PRP ที่วัดได้มีปริมาณที่ต่างกันอย่าง

จากการศึกษาของ Bowen¹⁵ พบว่าค่าความถ่วงจำเพาะของเม็ดเจล (gel particles) ที่ใช้ในหลอดเก็บเลือดทั่วไปในห้องปฏิบัติการทางการแพทย์พบว่ามีค่าเท่ากับ 1.04 และค่าความถ่วงจำเพาะของส่วนประกอบอื่นๆ เช่นซีรัมหรือพลาสมา มีค่าอยู่ในช่วง 1.026 ถึง 1.031 และก้อนลิ่มเลือด เม็ดเลือดแดงมีค่าอยู่ในช่วง 1.092 ถึง 1.095 และจากรายงานการศึกษาวิจัยของ Keever¹⁶ ได้รายงานเกี่ยวกับค่าความถ่วงจำเพาะของเกล็ดเลือดว่ามีค่าประมาณเท่ากับ 1.030 ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับค่าความถ่วงจำเพาะของเกล็ดเลือดและเม็ดเจลพบว่าเม็ดเกล็ดเลือดซึ่งทางผู้ศึกษาสันนิษฐานว่าอาจเป็นไปได้ว่าหลังทำการปั่นแยก PRP แล้วอาจมีเกล็ดเลือดบางส่วน ติดอยู่ในชั้นเม็ดเจล จึงทำให้ค่าของจำนวนเกล็ดเลือดที่ตรวจวัดได้ใน PRP หลังปั่นแยกจากชุดปั่นแยก Selphyl นั้นมีค่าน้อยกว่าชุดปั่นแยก Mesopraxe-20 และจากรายงานการทบทวนของ Rhoades¹⁷ ได้กล่าวถึงค่าความถ่วงจำเพาะของ red blood cell และ white blood cell มีค่าประมาณ 1.115 และ 1.070 ตามลำดับ จากการเปรียบเทียบค่าความถ่วงจำเพาะของเม็ดเลือดขาวเทียบกับเม็ดเจลแล้วพบว่าค่าความถ่วงจำเพาะของเม็ดเลือดขาวมีค่ามากกว่าเม็ดเจลโดยทางผู้ศึกษาได้สันนิษฐานว่าอาจเป็นไปได้เมื่อทำการปั่นแยก PRP แล้วทำให้เม็ดเลือดขาวส่วนใหญ่จะตกลงไปอยู่ด้านล่างชั้นเม็ดเจลและอาจมีเม็ดเลือดขาวบางส่วนตกอยู่ด้านบนเม็ดเจล เมื่อทำการตรวจวัดจำนวนเม็ดเลือดขาวใน PRP หลังปั่นแยกด้วยชุดปั่นแยก Selphyl จึงทำให้มีค่าของจำนวนเม็ดเลือดขาวที่ปั่นเป็นใน PRP แต่อย่างไรก็ตามการปนเปื้อนของเม็ดเลือดขาวใน PRP ที่ปั่นแยกโดย Selphyl ยังมีจำนวนน้อยกว่าเม็ดเลือดขาวใน

PRP ที่ปั่นแยกด้วยชุดปั่น Mesoprase-20 ในขณะที่ชุดปั่นแยก Mesoprase-20 ไม่มีตัวกันระหว่างเม็ดเลือดแดงกับ PRP (gel particle) มีเพียงชั้นรอยต่อระหว่างเม็ดเลือดแดงและพลาสมาที่เรียกว่า ชั้นบัฟฟี่โค้ด (buffy coat) ซึ่งประกอบไปด้วยเม็ดเลือดขาวและเกล็ดเลือดจึงทำให้สามารถพบการปนเปื้อนของเม็ดเลือดขาวใน PRP ที่ปั่นแยกได้จากชุดปั่นแยก Mesoprase-20 ได้

ในอดีตยังไม่เคยมีการทำการศึกษาเกี่ยวกับการตรวจหาปริมาณโปรตีนชีวภาพ cytokine, chemokine profiles และ inflammatory makers ใน PRP ที่ปั่นแยกได้จากเลือดที่มีปริมาณน้อย ๆ โดยทั่วไปจะใช้ PRP ที่ปั่นแยกจากเลือดปริมาณมาก และเนื่องจากต้องทำการตรวจหาปริมาณสารในระดับพิโคกรัม (pg) จึงต้องใช้เทคโนโลยีขั้นสูง (Luminex magpix 200, MERCK Thailand) ในการตรวจหาสารโปรตีนชีวภาพดังกล่าวจึงมีค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูง จึงทำให้สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้เพียง 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 , $p=0.034$) แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เป็นที่น่าสังเกตว่าเมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนเกล็ดเลือดแล้วพบว่าระดับของ 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 Pochini³ ได้รายงานว่าการศึกษาและตรวจวิเคราะห์ระดับของ cytokine, chemokine profiles ใน PRP โดยใช้ชุดปั่นแยก PRP เปรียบเทียบกับ PRP ที่เตรียมได้จากวิธีระบบเปิด พบว่าระดับของ TGF- β และ FGF-2 ไม่จำเป็นต้องสอดคล้องกับจำนวนเกล็ด

เลือดที่ได้หลังจากปั่นแยก PRP เนื่องจากโดยปกติแล้วระดับ FGF-2 สามารถตรวจพบได้ในกระแสเลือดและมีในระดับที่ค่อนข้างต่ำมาก² แต่เมื่อพิจารณาระดับ EGF ที่ตรวจวัดได้ใน PRP หลังปั่นแยกพบว่าระดับของ EGF มีความสอดคล้องกับจำนวนเกล็ดเลือดใน PRP ซึ่งจากการศึกษาพบว่าแหล่งของ EGF ในกระแสเลือดของคนปกติทั่วไปพบมากที่สุด ใน Alpha granules ของเกล็ดเลือด¹⁸ 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

สรุป

การศึกษานี้พบว่า 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 อย่างไรก็ตาม องค์ประกอบชีวภาพภายใน PRP ที่ได้นั้นมีความแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับปัจจัยภายในของแต่ละบุคคลและชนิดของชุดปั่นแยก PRP ยังคงเป็นปัจจัยหลักที่ส่งผลต่อคุณภาพของ PRP ที่ได้อย่างไรก็ตามเนื่องจากการศึกษาในครั้งนี้มีข้อจำกัดเรื่องของจำนวนตัวอย่างที่น้อยเกินไป จึงควรทำการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ บริษัท Dermalink ประเทศไทย จำกัด ที่สนับสนุนเครื่องมือและอุปกรณ์ในการศึกษาครั้งนี้

References

- Whitman DH, Berry RL, Green DM. Platelet gel: an autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. *J Oral Maxillofac Surg* 1997; 55: 1294-9.
- Lee JW, Kwon OH, Kim TK, Cho YK, Choi KY, Chung HY, et al. Platelet-rich plasma: quantitative assessment of growth factor levels and comparative analysis of activated and inactivated groups. *Arch Plast Surg* 2013; 40 : 530-5.
- Pochini AC, Antonioli E, Bucci DZ, Sardinha LR, Andreoli CV, Ferretti M, et al. Analysis of cytokine profile and growth factors in platelet-rich plasma obtained by open systems and commercial columns. *Einstein (Sao Paulo)* 2016; 14: 391-7.
- Latalski M, Elbatrawy YA, Thabet AM, Gregosiewicz A, Raganowicz T, Fatyga M, et al. Enhancing Bone Healing During distraction osteogenesis with platelet-rich plasma. *Injury* 2011; 42: 821-4.
- Wasterlain AS, Braun HJ, Harris AH, Kim HJ, Dragoo JL. The systemic effects of platelet-rich plasma injection. *Am J Sports Med* 2013; 41: 186-93.
- Sundman EA, Cole BJ, Fortier LA. Growth factor and catabolic cytokine concentrations are influenced by the cellular composition of platelet-rich plasma. *Am J Sports Med* 2011; 39: 2135-40.
- Anitua E, Sánchez M, Nurden AT, Nurden P, Orive G, Andía I. New insights into and novel applications for platelet-rich fibrin therapies. *Trends Biotechnol* 2006; 24: 227-34.
- 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: 158-67.
- de Jonge S, de Vos RJ, Weir A, van Schie HT, Bierma-Zeinstra SM, Verhaar JA, et al. One-year follow-up of platelet-rich plasma treatment in chronic Achilles tendinopathy: a double-blind randomized placebo-controlled trial. *Am J Sports Med* 2011; 39: 1623-29.
- Taniguchi Y, Yoshioka T, Sugaya H, Goshō M, Aoto K, Kanamori A, et al. Growth factor levels in leukocyte-poor platelet-rich plasma and correlations with donor age, gender, and platelets in the Japanese population. *J Exp Orthop* 2019; 6: 4.
- Xiong G, Lingampalli N, Koltsov JCB, Leung LL, Bhutani N, Robinson WH, et al. Men and Women Differ in the Biochemical Composition of Platelet-Rich Plasma. *Am J Sports Med*. 2018; 46: 409-19.
- Ugur MG, Kutlu R, Kilinc I. The effects of smoking on vascular endothelial growth factor and inflammation markers: A case-control study. *Clin Respir J* 2018; 12: 1912-18.
- Boswell SG, Cole BJ, Sundman EA, Karas V, Fortier LA. Platelet-rich plasma: a milieu of bioactive factors. *Arthroscopy* 2012; 28: 429-39.
- Eppley BL, Woodell JE, Higgins J. Platelet quantification and growth factor analysis from platelet-rich plasma: implications for wound healing. *Plast Reconstr Surg* 2004; 114: 1502-8.
- Bowen RA, Remaley AT. Interferences from blood collection tube components on clinical chemistry assays. *Biochem Med (Zagreb)* 2014; 24: 31-44.
- Keever-Taylor CA, Schmidt K, Zeng H, Morris D, Heidtke S, Konings S. et al. Determination of the volume of HPC, apheresis products based on weight in grams. *Blood*. 2014 ; 124 : 3850
- Rhoades RA, Bell DR. In: Taylor C, Horvath K. *Medical Physiology Principles for Clinical Medicine*. 4th ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins; 2009.p. 169-87.
- Ben-Ezra J, Sheibani K, Hwang DL, Lev-Ran A. Megakaryocyte synthesis is the source of epidermal growth factor in human platelets. *Am J Pathol* 1990; 137: 755-9.