

คุณลักษณะและบทบาทของพลาสมาเกลือเคอซีมซีมในโรคข้อเสื่อม



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

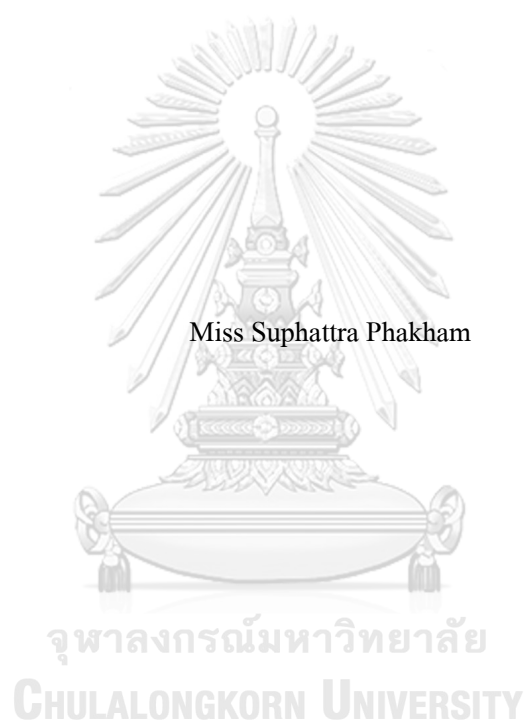
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์ ไม่สังกัดภาควิชา/เทียบเท่า

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2563

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Characterization and role of platelet rich plasma in osteoarthritis



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Medical Sciences

Common Course

FACULTY OF MEDICINE

Chulalongkorn University

Academic Year 2020

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	คุณลักษณะและบทบาทของพลาสมาเคลือบเลือดเข้มข้นในโรคข้อเสื่อม
โดย	น.ส.สุภัทรา ผาคำ
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์การแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์สิทธิศักดิ์ หารรษาเวก

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

.....	คณบดีคณะแพทยศาสตร์
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์สุทธิพงษ์ วัชรสินธุ)	
คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์	ประธานกรรมการ
.....	
(ศาสตราจารย์ ดร. แพทย์หญิงวิไล ชินธเนศ)	
.....	อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์สิทธิศักดิ์ หารรษาเวก)	
.....	กรรมการ
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์อารี ตनावลี)	
.....	กรรมการ
(อาจารย์ ดร. รัชวัน สนวนทวิ)	
.....	กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วันวิสาข์ อุดมสินประเสริฐ)	

สุภัทรา ผาคำ : คุณลักษณะและบทบาทของพลาสมาเกล็ดเลือดเข้มข้นในโรคข้อเสื่อม.
(Characterization and role of platelet rich plasma in osteoarthritis) อ.ที่ปรึกษาหลัก :
ศ. ดร. นพ.สิทธิศักดิ์ หารรณาวง

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาคุณลักษณะของพลาสมาเกล็ดเลือดเข้มข้น (PRP) ความสามารถในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์ และประสิทธิภาพในการรักษาผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม เพศหญิงจำนวน 40 ราย โดยพบว่า PRP ที่เก็บได้มีปริมาณ เกล็ดเลือดมากกว่าค่าเฉลี่ยในเลือดประมาณ 2 เท่า และมีปริมาณ IL-1, IL-2, IL-5, IL-7, IL-8, IL-9, IL-12, IL-17, IFN- γ , TNF- α , IP-10, MIP-1 β , bFGF, VEGF และ PDGF-BB สูงกว่าในพลาสมาอย่างมีนัยสำคัญ แต่ปริมาณของ IL-10 ใน PRP ต่ำกว่าในพลาสมาอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อทำการทดสอบทางห้องปฏิบัติการพบว่า เซลล์กระดูกอ่อนและเซลล์เยื่อข้อของผู้ป่วยโรคข้อเสื่อมที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสม PRP มีอัตราการเจริญเพิ่มจำนวนและอัตราการเจริญเคลื่อนตัวมากกว่าเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสมพลาสมา ซึ่งอาจเป็นผลมาจากจำนวนเกล็ดเลือดที่อยู่ใน PRP มากกว่าพลาสมา ประมาณ 2 เท่า ทำให้ใน PRP มีปริมาณ growth factors และ cytokines มากกว่า รวมถึงการให้ PRP อย่างต่อเนื่องส่งผลให้เซลล์ทั้ง 2 ชนิดมีการเจริญเพิ่มจำนวนมากกว่าเซลล์ที่ได้รับพลาสมา อย่างเห็นได้ชัด และยังพบว่าเซลล์กระดูกอ่อนที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงที่ผสม PRP มีการแสดงออกยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญพัฒนาของเซลล์กระดูกอ่อน (SOX9, aggrecan และ COL2A1) มากกว่าในเซลล์ที่เลี้ยงในพลาสมา และเซลล์เยื่อข้อที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงที่ผสม PRP ก็มีการแสดงออกยีนประเภท proinflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6 และ MMP-13) ซึ่งบ่งชี้ถึงการอักเสบน้อยกว่าในเซลล์ที่เลี้ยงในพลาสมา นอกจากนี้เมื่อทำการทดสอบทางคลินิก โดยการฉีด PRP เข้าข้อเข่าแล้วทำการประเมิน VAS score ประเมินสมรรถภาพทางกาย (Sit to Stand test, Time Up and Go test and 3 minute walk test) รวมถึงการประเมินด้วยชุดคำถาม WOMAC score ซึ่งมีความจำเพาะต่อการประเมินผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม พบว่าผู้ป่วยมีอาการดีขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์

ลายมือชื่อนิติต

ปีการศึกษา 2563

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

6074087530 : MAJOR MEDICAL SCIENCES

KEYWORD: Chondrocytes, Cytokines, Physical performance, Platelet rich plasma,
Osteoarthritis

Suphattra Phakham : Characterization and role of platelet rich plasma in
osteoarthritis. Advisor: Prof. Sittisak Honsawek, M.D., Ph.D.

The aims of this study were to characterized plate rich plasma (PRP), investigate the effect of PRP on osteoarthritic chondrocytes and synoviocytes proliferation and compare the physical ability and degree of pain in knee osteoarthritic patients before and after platelet rich plasma injection in 40 female knee osteoarthritis patients. The result show that the PRP preparation in this study produced at least two folds baseline levels of platelets. Levels of IL-1, IL-2, IL-5, IL-7, IL-8, IL-9, IL-12, IL-17, IFN- γ , TNF- α , IP-10, MIP-1 β , bFGF, VEGF and PDGF-BB were significantly higher in the PRP than in the paired plasma but IL-10 were significantly lower in the PRP than in the paired plasma. PRP increased proliferation and migration of chondrocytes and synoviocytes significantly higher than plasma that maybe because of the difference in platelet number that affect quantity of cytokine and growth factor. Moreover, PRP increased the expression of chondrocyte proliferative and maturation gene SOX9, aggrecan and COL2A1 and decreased the expression of inflammatory gene IL-1 β , IL-6 and MMP-13 in synoviocytes. The clinical outcome shows that PRP injection in knee of knee osteoarthritis patients significantly improve VAS score, physical performance (Sit to Stand test, Time Up and Go test and 3-minute walk test) and WOMAC score.

Field of Study: Medical Sciences

Student's Signature

Academic Year: 2020

Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์สิทธิศักดิ์ หารรษาเวก อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผู้เสียสละเวลาอันมีค่าในการให้คำปรึกษาในการจัดทำวิทยานิพนธ์ การเก็บตัวอย่าง ตลอดจนให้คำแนะนำอันเป็นประโยชน์ทั้งในการทำวิทยานิพนธ์ และการใช้ชีวิตเสมอมา การทำวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้ไม่อาจสำเร็จได้โดยปราศจากความกรุณาจากท่าน

ขอกราบขอบพระคุณศาสตราจารย์ ดร. พญ. วิไล ชินชนเส ประธานกรรมการวิทยานิพนธ์ และ อาจารย์ ดร. ธันยวัน สนวนทวิ กรรมการวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาเสียสละเวลามาดำเนินการสอบวิทยานิพนธ์ และให้คำแนะนำ แนวทางการแก้ไขจุดบกพร่องจนวิทยานิพนธ์สมบูรณ์มากยิ่งขึ้น ศาสตราจารย์ นายแพทย์อารี ดนาวลี กรรมการวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาเอื้อเฟื้อตัวอย่าง และข้อมูลในการศึกษาในครั้งนี้ พร้อมทั้งในคำแนะนำในการเก็บตัวอย่างเสมอมา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วันวิสาข์ อุดมสินประเสริฐ กรรมการวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำในการทำการวิทยานิพนธ์ รวมทั้งเอื้อเฟื้ออุปกรณ์ และสารเคมีในการศึกษามาโดยตลอด

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่าน ผู้มอบความรู้ คุณธรรม จริยธรรมให้แก่ผู้วิจัยตลอดระยะเวลาในการศึกษา

ขอขอบพระคุณฝ่ายออร์โธปิดิกส์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ในการเก็บตัวอย่าง ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ฝ่ายบัณฑิตศึกษา ที่ให้ความช่วยเหลือในทุก ๆ ด้าน และขอบพระคุณหน่วยวิจัย Osteoarthritis and Musculoskeleton ศูนย์เครื่องมือภาควิชาชีวเคมี และศูนย์เครื่องมือกลาง Chula MRC (Chulalongkorn Medical Research Center) คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่เอื้อเฟื้อเครื่องมือในการทำวิจัย

ขอขอบคุณ คุณวารยาภา มิ่งศิริธรรม คุณสินสุดา เดชสุภา คุณกิตติพันธ์ ธาระเขต และคุณนิธิกร ดีหอร่วมวัฒน์ ผู้ให้ความช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่าง และขอขอบคุณสมาชิกหน่วยวิจัย Osteoarthritis and Musculoskeleton ทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือ คำแนะนำ และกำลังใจตลอดมา

สุดท้ายนี้ผู้วิจัยขอขอบพระคุณบิดามารดาและสมาชิกในครอบครัวทุกคนที่ให้คำแนะนำ และกำลังใจเสมอมา

ประโยชน์ใด ๆ ที่ได้จากวิทยานิพนธ์นี้ ผู้วิจัยขอมอบแด่ผู้มีพระคุณ ผู้เข้าร่วมวิจัย และผู้ที่ช่วยเหลือให้งานวิจัยในครั้งนี้สำเร็จทุก ๆ ท่าน



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

สารบัญ

	หน้า
.....	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ง
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญรูปภาพ	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	14
1.1 ที่มาและความสำคัญของงานวิจัย.....	14
1.2 คำถามงานวิจัย	15
1.3 วัตถุประสงค์การวิจัย	15
1.4 สมมติฐานการวิจัย.....	15
1.5 ขอบเขตของการวิจัย.....	16
1.6 ข้อตกลงเบื้องต้น.....	16
1.7 คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย.....	16
1.8 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย.....	17
1.9 วิธีดำเนินการวิจัย	18
1.10 ลำดับขั้นตอนในการเสนอผลการวิจัย.....	1
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
2.1 โรคข้อเสื่อม (Osteoarthritis)	3

2.2	เกล็ดเลือด (Platelet).....	4
2.3	พลาสมาเกล็ดเลือดเข้มข้น (Platelet rich plasma)	5
2.4	การแยกพลาสมาเกล็ดเลือดเข้มข้น	5
2.5	การนำพลาสมาเกล็ดเลือดเข้มข้นมาใช้ในการแพทย์.....	6
2.6	พลาสมาเกล็ดเลือดเข้มข้นในโรคกระดูกและข้อ	7
2.7	พลาสมาเกล็ดเลือดเข้มข้นในโรคข้อเสื่อม	8
บทที่ 3	วิธีดำเนินการวิจัย.....	10
3.1	ประชากร	10
3.2	ขนาดของประชากรตัวอย่าง.....	11
3.3	เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย.....	12
3.4	วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย	13
3.5	สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย.....	13
3.6	การเก็บรวบรวมข้อมูล	14
3.7	ข้อพิจารณาทางด้านจริยธรรม.....	15
3.8	การวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ	15
3.8.1	การแยกพลาสมาเกล็ดเลือดเข้มข้น (PRP) และพลาสมาเกล็ดเลือดต่ำ (PPP)	15
3.8.2	การวัด growth factors และ cytokines ในพลาสมา PPP และ PRP ที่เก็บจากผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมจำนวน 40 รายด้วย multiplex assay (Bio-Plex Pro Human Cytokine 27-plex Assay)	16
3.8.3	การเก็บและเลี้ยงเซลล์ chondrocytes และ synoviocytes	17
3.8.4	การตรวจสอบการเจริญเติบโตของเซลล์ chondrocytes จากผู้ป่วยจำนวน 3 รายและ synoviocytes จากผู้ป่วยจำนวน 2 รายด้วย MTT assay.....	18
3.8.5	การตรวจสอบการเคลื่อนตัวของเซลล์ chondrocytes จากผู้ป่วยจำนวน 3 รายและ synoviocytes จากผู้ป่วยจำนวน 2 รายด้วย scratch assay.....	18

3.8.6 การตรวจสอบยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของเซลล์ OA chondrocytes จากผู้ป่วย จำนวน 3 รายและ OA synoviocyte จากผู้ป่วยจำนวน 2 รายด้วย qRT-PCR	19
3.8.7 การหาความยาว telomere ใน leukocyte ของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมจำนวน 31 รายด้วย qRT-PCR	19
3.8.8 การหาจำนวน mitochondria copy number ใน leukocyte ของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม จำนวน 31 รายด้วย qRT-PCR	19
3.8.9 การฉีด PRP เข้าข้อเข่าในผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมจำนวน 31 ราย และทดสอบ สมรรถภาพทางกาย ระดับความเจ็บปวด และ WOMAC score.....	20
3.9 การวิเคราะห์ข้อมูล.....	20
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	22
4.1 ประชากรที่ใช้ในการศึกษา	22
4.2 การศึกษาความเข้มข้นของ cytokines และ growth factors ในพลาสมา และพลาสมาเกล็ด เลือดเข้มข้น	23
4.3 การศึกษา relative telomere length ในผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม	30
4.4 การศึกษาจำนวน mtDNA copy number ในผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม	31
4.5 การแยกเซลล์ chondrocytes และ synoviocytes จาก cartilage และ synovial tissue ของผู้ป่วย โรคข้อเข่าเสื่อมที่เข้ารับการผ่าตัดเปลี่ยนข้อเข่า.....	32
4.5.1 การแยกเซลล์ chondrocytes จาก cartilage ของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่เข้ารับการผ่าตัด เปลี่ยนข้อเข่า	32
4.5.2 การแยกเซลล์ synoviocytes จาก synovial tissue ของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่เข้ารับการ ผ่าตัดเปลี่ยนข้อเข่า.....	33
4.6 การศึกษาผลของพลาสมาเกล็ดเลือดเข้มข้นต่ออัตราการเจริญเพิ่มจำนวน (cell proliferation) ของ chondrocytes และ synoviocytes ที่แยกได้จากผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม	34
4.5.1 การศึกษาผลของพลาสมาเกล็ดเลือดเข้มข้นต่ออัตราการเจริญเพิ่มจำนวน (cell proliferation) ของ chondrocytes ที่แยกได้จากผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม	34

4.5.2 การศึกษาผลของพลาสมาเกล็ดเลือดเข้มข้นต่ออัตราการเจริญเติบโต (cell proliferation) ของ synoviocytes ที่แยกได้จากผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม	35
4.6 การศึกษาผลของพลาสมาเกล็ดเลือดเข้มข้นต่ออัตราการเจริญเคลื่อนเซลล์ (cell migration) ของ chondrocytes และ synoviocytes ที่แยกได้จากผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม	36
4.6.1 การศึกษาผลของพลาสมาเกล็ดเลือดเข้มข้นต่ออัตราการเจริญเคลื่อนเซลล์ (cell migration) ของ chondrocytes ที่แยกได้จากผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม	36
4.6.2 การศึกษาผลของพลาสมาเกล็ดเลือดเข้มข้นต่ออัตราการเจริญเคลื่อนเซลล์ (cell migration) ของ synoviocytes ที่แยกได้จากผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม	37
4.7 การศึกษาผลของ PRP ต่อการแสดงออกของยีนใน chondrocytes และ synoviocytes ที่แยกได้จากผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม	39
4.7.1 การศึกษาผลของ PRP ต่อการแสดงออกของยีน SOX9 Aggrecan และ COL2A1 ใน chondrocytes ที่แยกได้จากผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม	39
4.7.2 การศึกษาผลของ PRP ต่อการแสดงออกของยีน IL-1B IL-6 และ MMP-13 ใน synoviocytes ที่แยกได้จากผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม	41
4.8 การศึกษาระดับความเจ็บปวด สมรรถภาพทางกาย และความสามารถในการทำกิจกรรมของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมก่อนและหลังได้รับการฉีดพลาสมาเกล็ดเลือดเข้มข้นเข้าในข้อเข่า	43
4.8.1 การศึกษาผลของการฉีด PRP ข้อเข่าในผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมต่อระดับความเจ็บปวด	43
4.8.2 การศึกษาผลของการฉีด PRP ข้อเข่าในผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมต่อสมรรถภาพทางกาย	44
4.8.3 การศึกษาผลของการฉีด PRP ข้อเข่าในผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมต่อความสามารถในการทำกิจกรรม	46
บทที่ 5 อภิปรายและสรุปผลการทดลอง	48
บรรณานุกรม	54
ประวัติผู้เขียน	60

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 การเก็บข้อมูลและตัวอย่างจากผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม.....	15
ตารางที่ 2 ข้อมูลพื้นฐานของอาสาสมัครที่ได้รับการฉีด PRP ข้อเข่า และนำ PRP ที่เหลือจากการใช้ งานมาทดสอบทางห้องปฏิบัติการ	22
ตารางที่ 3 การประเมินสมรรถภาพทางกายของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม	44
ตารางที่ 4 ผลการประเมินความสามารถในการทำกิจกรรมต่าง ๆ	46



สารบัญรูปภาพ

หน้า

รูปที่ 1 ขั้นตอนการเตรียม PRP.....	16
รูปที่ 2 แผนภูมิแสดงปริมาณ cytokines และ growth factors ใน Plasma และ PRP ที่มีค่าเฉลี่ยน้อยกว่า 1 pg/ml (A) และ 1-10 pg/ml (B).....	24
รูปที่ 3 แผนภูมิเปรียบเทียบปริมาณ IL-1 (A) IL-1ra (B) IL-2 (C) IL-4 (D) IL-5 (E) IL-6 (F) IL-7 (G) และ IL-8 (H) ใน Plasma และ PRP (* P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001, ** P = 0.000).....	26
รูปที่ 4 กราฟเปรียบเทียบ relative telomere length จาก peripheral blood leukocyte ของผู้ป่วยโรคข้อเสื่อมก่อนและหลังฉีด PRP ข้อเข่า.....	30
รูปที่ 5 กราฟเปรียบเทียบจำนวน mtDNA copy number จาก peripheral blood leukocyte ของผู้ป่วยโรคข้อเสื่อมก่อนและหลังฉีด PRP ข้อเข่า.....	31
รูปที่ 6 การแยกเซลล์ OA chondrocytes จาก cartilage.....	32
รูปที่ 7 เซลล์ OA chondrocytes ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ใน flask ชนิด T75.....	32
รูปที่ 8 การแยกเซลล์ OA fibroblast-like synoviocytes จาก synovial tissue	33
รูปที่ 9 เซลล์ OA fibroblast-like synoviocytes ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ใน flask ชนิด T75.....	33
รูปที่ 10 ร้อยละการเจริญเพิ่มจำนวนเซลล์ (cell proliferation percentage) ของ OA chondrocytes เปรียบเทียบ เวลา 0, 3, 6 และ 9 วัน	34
รูปที่ 11 ร้อยละการเจริญเพิ่มจำนวนเซลล์ (cell proliferation percentage) ของ OA fibroblast-like synoviocytes เปรียบเทียบ เวลา 0, 3, 6 และ 9 วัน	35
รูปที่ 12 การเจริญเคลื่อนเซลล์ (cell migration percentage) ของ OA chondrocytes ที่เวลา 0, 24 และ 48 ชั่วโมง	36
รูปที่ 13 ร้อยละการเจริญเคลื่อนเซลล์ (cell migration percentage) ของ OA chondrocytes เปรียบเทียบ เวลา 0, 24 และ 48 ชั่วโมง	37
รูปที่ 14 การเจริญเคลื่อนเซลล์ (cell migration percentage) ของ OA fibroblast-like synoviocytes ที่เวลา 0, 24 และ 48 ชั่วโมง	38

รูปที่ 15 ร้อยละการเจริญเคลื่อนเซลล์ (cell migration percentage) ของ OA fibroblast-like synoviocytes เปรียบเทียบ เวลา 0, 24 และ 48 ชั่วโมง38

รูปที่ 16 การแสดงออกของ SOX9 (A) aggrecan (B) และ COL2A1 (C) ใน OA chondrocyte40

รูปที่ 17 การแสดงออกของ IL-1B (A) IL-6 (B) และ MMP-13 (C) ใน OA fibroblast-like synoviocytes เปรียบเทียบ เวลา 0, 3, 6 และ 9 วัน42

รูปที่ 18 กราฟเปรียบเทียบ Visual Analog Scale (VAS) ของผู้ป่วยก่อนและหลังได้รับการฉีด PRP43

รูปที่ 19 กราฟเปรียบเทียบการประเมินสมรรถภาพทางกายของผู้ป่วยด้วย sit to stand test (A) time up and go test (B) และ 3-minute walk test (C) ก่อนและหลังได้รับการฉีด PRP45

รูปที่ 20 กราฟเปรียบเทียบคะแนนความสามารถในการทำกิจกรรมต่าง ๆ ของผู้ป่วยด้วย WOMAC score หมวดหมู่ อาการปวดที่สัมพันธ์กับการทำกิจกรรม: pain (A) อาการข้อฝืดหรือติดที่สัมพันธ์กับการทำกิจกรรม: stiffness (B) ความยากลำบากในการทำกิจกรรมต่าง ๆ: physical function (C) และ คะแนนโดยรวม: total score (D) ก่อนและหลังได้รับการฉีด PRP.....47

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของงานวิจัย

โรคข้อเสื่อม (osteoarthritis) เป็นโรคกระดูกและข้อที่พบได้บ่อย โดยพบว่าประชากรถึง 250 ล้านรายมีอาการของโรคข้อเสื่อม ส่วนใหญ่พบข้อเสื่อมได้ในบริเวณ ข้อเข่า ข้อนิ้วมือ และข้อสะโพก ตามลำดับ และพบได้ในผู้ที่มีอายุ 50 ปีขึ้นไป การเสื่อมของข้อเข่าพบได้สูงถึงร้อยละ 85 ของผู้ป่วยโรคข้อเสื่อมทั้งหมด (1) โดยมักพบกระดูกอ่อนผิวข้อเข่าถูกทำลาย เยื่อหุ้มข้อและเนื้อเยื่อโดยรอบมีการอักเสบ กระดูกงอก ข้อเคลื่อน ทำให้ผู้ป่วยมีอาการปวด ข้อฝืด ข้อติดขัด เป็นสาเหตุให้ดำเนินชีวิตได้อย่างยากลำบากและคุณภาพชีวิตลดลง

นอกจากนี้ยังพบว่าอัตราการเกิดโรคข้อเสื่อมในปัจจุบันเพิ่มขึ้นจากในปี พ.ศ.2493 ถึง 2 เท่าและมีแนวโน้มจะเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ เนื่องจากประชากรผู้สูงอายุมีจำนวนมากขึ้น (2) โดยสาเหตุของการเกิดโรคข้อเสื่อมนั้นเกิดได้จากหลายปัจจัย เช่น อายุ เพศ น้ำหนักตัวที่เพิ่มมากขึ้น การใช้งานข้อ การได้รับอุบัติเหตุบาดเจ็บภายในข้อ เป็นต้น สำหรับการรักษาโรคข้อเสื่อมในปัจจุบันเป็นการรักษาตามอาการ เช่น การให้ยาบรรเทาอาการปวด การทำกายภาพบำบัด หรือการผ่าตัดเปลี่ยนข้อเข่าเทียม การใช้พลาสมาเกล็ดเลือดเข้มข้น เพื่อการรักษาโรคข้อเสื่อมเป็นอีกหนึ่งวิธีที่มีการศึกษาและเริ่มใช้ในการรักษาทางคลินิกตั้งแต่ปี พ.ศ.2523 (3)

พลาสมาเกล็ดเลือดเข้มข้น (platelet rich plasma, PRP) เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการปั่นแยกเลือด โดยหมายถึงพลาสมาที่มีปริมาณเกล็ดเลือดสูงกว่าค่าปกติในกระแสเลือด (3) ในปัจจุบันได้มีการนำมาใช้ในการรักษาทางการแพทย์หลายระบบ เช่น ใช้ในกระบวนการกระตุ้นการรักษาบาดแผล การกระตุ้นให้สร้างกระดูก กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน กระตุ้นกระบวนการเจริญของรังไข่ และระบบสืบพันธุ์ ใช้ในศัลยกรรมตกแต่งและเสริมสร้าง และการปลูกผม เป็นต้น โดยมีการศึกษาวิจัยจำนวนมากในการประยุกต์ใช้เพื่อการรักษาโรคข้อเสื่อม (4)

การนำ PRP มาใช้ในโรคข้อเสื่อมทำโดยการฉีด PRP ที่ถูกกระตุ้น (activated PRP) เข้าไปในข้อที่มีการเสื่อมเพื่อให้ PRP กระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์กระดูกอ่อนในข้อนั้น ๆ โดยในการศึกษาของ Amable และคณะ ในปี พ.ศ.2556 พบว่า PRP ที่ถูกกระตุ้นมีปริมาณไซโตไคน์ (cytokines) และ growth factors มากกว่าในพลาสมา (5)

การปั่นแยก PRP ในปัจจุบันมีการศึกษาและนำมาประยุกต์ใช้แตกต่างกันไป รวมถึงมีการผลิตเครื่องมือ เครื่องปั่นเหวี่ยงที่ใช้ในการแยก PRP โดยเฉพาะ ซึ่งบางครั้งใช้เวลานาน และมีราคาสูง และยังไม่มียวิธีที่ถือได้ว่าเป็นมาตรฐานในปัจจุบัน การศึกษานี้จึงมุ่งเน้นการพัฒนาเทคนิคพื้นฐานในการเตรียม PRP และศึกษาคุณลักษณะของ PRP ที่ได้ เช่น ปริมาณของเกล็ดเลือด ปริมาณสาร cytokines และ growth factors รวมไปถึงความสามารถในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์ (cell proliferation) และประสิทธิภาพในการรักษาผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม

1.2 คำถามงานวิจัย

1. พลาสมา และพลาสมาเกล็ดเลือดเข้มข้นมีปริมาณสาร cytokines และ growth factors แตกต่างกันหรือไม่
2. พลาสมาเกล็ดเลือดเข้มข้นมีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์กระดูกอ่อน (chondrocytes) และเซลล์เยื่อข้อ (synovocytes) ที่แยกได้จากผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมหรือไม่
3. ผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมภายหลังที่ได้รับการฉีดพลาสมาเกล็ดเลือดเข้มข้นเข้าในข้อเข่ามีสมรรถภาพทางกาย ความสามารถในการทำกิจกรรม และระดับความเจ็บปวดแตกต่างจากก่อนได้รับการฉีดหรือไม่

1.3 วัตถุประสงค์การวิจัย

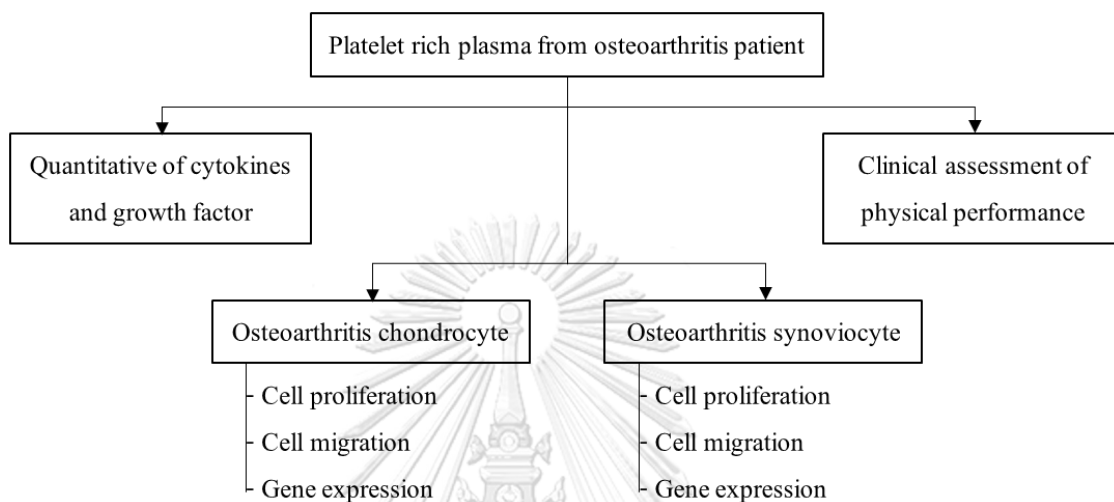
1. ศึกษาปริมาณสาร cytokines และ growth factors ในพลาสมา และพลาสมาเกล็ดเลือดเข้มข้น
2. ศึกษาผลของพลาสมาเกล็ดเลือดเข้มข้นต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ chondrocytes และ synovocytes ที่แยกได้จากผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม
3. ศึกษาสมรรถภาพทางกาย ความสามารถในการทำกิจกรรม และระดับความเจ็บปวดของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมก่อนและหลังได้รับการฉีดพลาสมาเกล็ดเลือดเข้มข้นเข้าในข้อเข่า

1.4 สมมติฐานการวิจัย

1. พลาสมาเกล็ดเลือดเข้มข้น มีปริมาณสาร cytokines และ growth factors มากกว่าในพลาสมา
2. พลาสมาเกล็ดเลือดเข้มข้นมีผลกระตุ้นการเจริญเติบโตและการแสดงออกของยีนในเซลล์ chondrocytes และ synovocytes จากผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม

3. หลังจากผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมได้รับการฉีดพลาสมาเกล็ดเลือดเข้มข้นเข้าในข้อเข่าจะส่งผลให้สมรรถภาพทางกาย ความสามารถในการทำกิจกรรมมากขึ้น และมีระดับความเจ็บปวดลดลง

1.5 ขอบเขตของการวิจัย



1.6 ข้อตกลงเบื้องต้น

1. เครื่องมือและชุดทดสอบต่าง ๆ ที่ใช้ในการทดสอบเป็นเครื่องมือที่ผ่านการทดสอบความเที่ยงตรงและความแม่นยำของเครื่องมือและชุดการทดสอบนั้น ๆ
2. ผู้เข้าร่วมโครงการศึกษาวิจัยเป็นผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาโรคข้อเข่าเสื่อมที่ ฝ่ายออร์โธปิดิกส์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ **รณมมหาวิทยาลัย**
3. ผู้เข้าร่วมโครงการศึกษาวิจัยให้ความร่วมมือด้วยความเต็มใจตลอดการศึกษาวิจัย โดยมีการลงลายมือชื่อในใบยินยอม (informed consent) ด้วยความสมัครใจภายหลังได้รับการชี้แจงให้ทราบในทุกด้าน ซึ่งรวมถึงความเสี่ยงที่อาจจะเกิดขึ้น

1.7 คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย

- ผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมระดับ 1-2 หมายถึงผู้ป่วยที่มีอาการของโรคข้อเสื่อม (osteoarthritis) ที่ได้รับการประเมินความรุนแรงของโรค โดยการถ่ายภาพถ่ายรังสีทำหน้า-หลังบริเวณข้อเข่าตามเกณฑ์ของ Kellgren and Lawrence อยู่ใน stage 1-2
- พลาสมาเกล็ดเลือดเข้มข้น (platelet rich plasma, PRP) หมายถึงพลาสมาที่มีปริมาณเกล็ดเลือดสูงกว่าค่าปกติในกระแสเลือด ได้มาจากการปั่นแยกเลือด

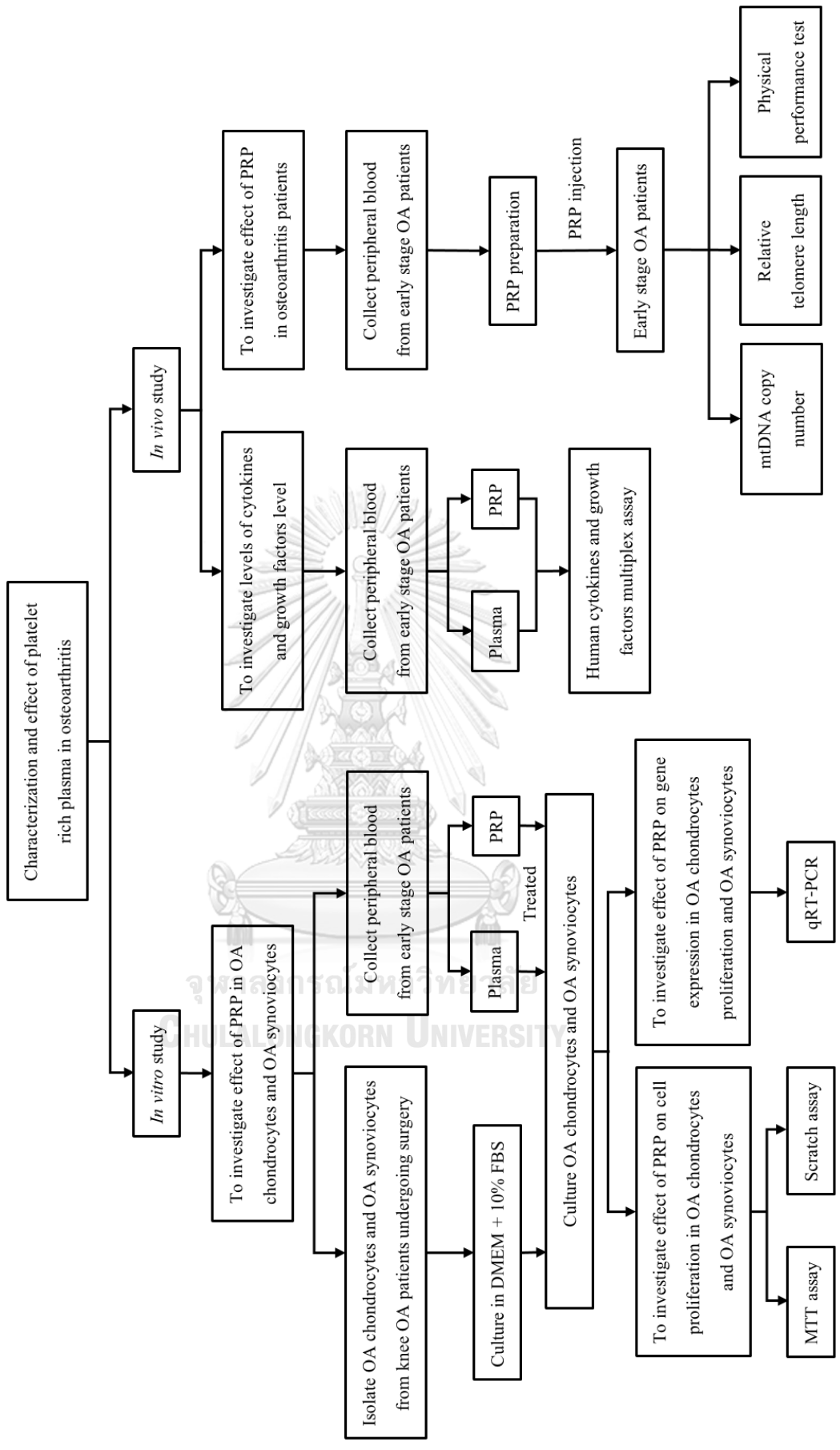
- พลาสมาเกล็ดเลือดต่ำ (platelet poor plasma, PPP) หมายถึงพลาสมาที่มีปริมาณเกล็ดเลือดต่ำกว่าค่าปกติในกระแสเลือด ได้มาจากการปั่นแยกเลือด

1.8 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย

ทราบถึงผลของ PRP ต่อการเจริญเติบโตของกระดูกอ่อน และประสิทธิภาพของ PRP ในการเพิ่มสมรรถภาพทางกายและลดระดับความเจ็บปวดในผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม



1.9 วัตถุประสงค์การวิจัย



1.10 ลำดับขั้นตอนในการเสนอผลการวิจัย

1. เสนอโครงร่างวิทยานิพนธ์ต่อคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์
2. ทำการคัดกรองเบื้องต้น โดยการซักประวัติ และตรวจร่างกายตามเกณฑ์การคัดเข้าและการคัดออกจากการวิจัย
3. แสดงเอกสารข้อมูลโครงการวิจัยและเอกสารแสดงความยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัยให้แก่อาสาสมัครโครงการวิจัย
4. ทำแบบสอบถาม โดยการสัมภาษณ์ข้อมูลส่วนตัว และแบบประเมินอาการของโรคข้อเข่าเสื่อม Western Ontario and MacMaster University (WOMAC) และทดสอบสมรรถภาพทางกายโดยการวัดระยะทางที่เดินได้ในเวลา 3 นาที การทดสอบความสามารถในการทรงตัวขณะเคลื่อนไหว (Timed Up and Go Test: TUGT) โดยการจับเวลาที่ใช้ในการเดิน 3 เมตร จากนั้นหมุนตัวเดินกลับมาที่เดิม และการทดสอบลุกขึ้นและนั่งจากเก้าอี้ Sit to Stand Test (STS) โดยจับเวลาในการลุกนั่งจากเก้าอี้ 5 ครั้ง โดยอาสาสมัครได้รับการประเมินที่ 0, 6, 12 และ 18 สัปดาห์
5. เก็บตัวอย่างเลือดจากอาสาสมัครประมาณ 35 ml นำมาปั่นแยก PRP และ ฉีด PRP ให้ผู้ป่วยในปริมาณ 5-6 ml และเก็บตัวอย่าง PRP ที่เหลือเพื่อนำมาวัดปริมาณ cytokines และ growth factors และทดสอบผลต่อการเจริญเติบโตและการแสดงออกของยีนใน chondrocytes และ synovocytes ประมาณ 1 ml โดยอาสาสมัครได้รับการฉีดพลาสมาเกล็ดเลือดเข้มข้น 2 ครั้ง ที่ 0 และ 6 สัปดาห์
6. นำ PRP และ plasma ที่ได้จากการปั่นแยกจากอาสาสมัครมาทดสอบปริมาณ growth factors และ cytokines ด้วย multiplex assay (Bio-Plex Pro Human Cytokine 27-plex Assay)
7. สกัด DNA จาก buffy coat อาสาสมัครของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่เก็บได้จากสัปดาห์ที่ 0 และ 12 แล้วนำมาวิเคราะห์ผลของการฉีด PRP ในเชิงโมเลกุลโดยการวัด mtDNA copy number และ relative telomere length
8. เลี้ยงเซลล์ chondrocytes และ synoviocytes ที่เก็บจากผู้ป่วยที่เข้ารับการผ่าตัดเปลี่ยนข้อเข่าเทียม (total knee replacement surgery)
9. ทดสอบการเจริญเติบโต (proliferation) ด้วย MTT assay และการเคลื่อนที่ของเซลล์ (migration) ด้วย scratch assay

10. สกัด RNA และนำมาทดสอบการแสดงออกของยีน hGAPDH, SOX-9, COL1A1, COL2A1, Aggrecan, MMP-3 และ MMP-13 ใน chondrocytes และ hGAPDH, IL-1 β , IL-6, IL-10, MMP-13 ใน synoviocytes ด้วยวิธี quantitative real time polymerase chain reaction (qRT-PCR)
11. สรุปผลการศึกษา เขียนรายงานวิทยานิพนธ์ และนำเสนอผลงานการวิจัยต่อคณะกรรมการ



บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 โรคข้อเสื่อม (Osteoarthritis)

โรคข้อเสื่อม คือ โรคที่กระดูกอ่อนผิวข้อถูกทำลาย โดยมีพยาธิสภาพบริเวณกระดูกอ่อนผิวข้อและกระดูกที่อยู่ใต้ผิวข้อ ซึ่งเกิดจากการสูญเสียการควบคุมสมดุลระหว่างการทำลายและการสังเคราะห์เนื้อพื้นนอกเซลล์ (extracellular matrix) โดยมีการเพิ่มการทำลายกระดูกอ่อนจากเอนไซม์ย่อยโปรตีน เช่น matrix metalloproteinases (MMPs) และสารกระตุ้นการอักเสบ เช่น prostaglandins เป็นต้น (6) ซึ่งเกิดได้จากหลายสาเหตุ เช่น อายุมากขึ้น น้ำหนักตัวเพิ่มขึ้น การลดลงของน้ำไขข้อ กล้ามเนื้อบริเวณรอบข้อต่อไม่แข็งแรง การเสียดสีของข้อเนื่องจากการใช้งาน การเกิดเนื้องอกบริเวณข้อ เป็นต้น

กลไกการเกิดโรคข้อเสื่อมนอกจากพบการเสื่อมของเซลล์กระดูกอ่อนผิวข้อแล้ว กระบวนการอักเสบยังมีอีกส่วนสำคัญ โดยพบว่าผู้ป่วยโรคข้อเสื่อมมีการเพิ่มขึ้นของ inflammatory cytokines หลายชนิด ซึ่งหลั่งมาจาก chondrocytes และ synoviocytes โดยเฉพาะอย่างยิ่ง synoviocytes ซึ่งปกติมีหน้าที่ผลิตน้ำไขข้อที่มีสารหล่อลื่นข้อ (hyaluronan) และผลิต cytokines หลายชนิดเพื่อรักษาสมดุลการสร้างและสลายกระดูกอ่อนภายในข้อ เช่น IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, IL-15, IL-17, IL-18, TNF- α และ TGF- β ซึ่งพบว่าในระยะแรกของการเกิดโรคข้อเสื่อม synoviocytes มีการผลิต IL-1 β เพิ่มขึ้นเป็นจำนวนมาก ส่งผลลดการสร้าง type II collagen และ proteoglycan กระตุ้นการสร้าง matrix metalloproteinases ส่งผลมาย่อยสลายโปรตีนในกระดูกอ่อนซึ่งทำให้ extracellular matrix ของกระดูกอ่อนลดลง (7)

ผู้ป่วยโรคข้อเสื่อมมักมีอาการปวดบริเวณข้อ ข้อฝืด การใช้งานติดขัด (8) ซึ่งการวินิจฉัยโรคข้อเสื่อมทำโดยการซักประวัติ ตรวจร่างกาย ทดสอบสมรรถภาพในการเคลื่อนไหวของข้อ และใช้ภาพถ่ายรังสีประกอบการวินิจฉัย ซึ่งในการประเมินโดยใช้หลักเกณฑ์ของ Kellgren and Lawrence สามารถแบ่งระดับความรุนแรงของโรคข้อเสื่อมได้เป็น 5 ระดับดังนี้ (9)

- Stage 0 ไม่พบความผิดปกติ

- Stage 1 เป็นโรคข้อเสื่อมระยะเริ่มต้น เริ่มมีการเสื่อมในส่วนผิวด้านบนของกระดูกอ่อน
- Stage 2 ช่องว่างระหว่างข้อแคบลง มีการหนาตัวของกระดูกใต้กระดูกอ่อนผิวข้อ (subchondral sclerosis) ในระดับปานกลาง
- Stage 3 ช่องว่างระหว่างข้อแคบลงมากกว่าร้อยละ 50 femoral condyle มีลักษณะกลม มีการเสื่อมของกระดูกอ่อนเป็นบริเวณกว้าง พบการหนาตัวของกระดูกใต้กระดูกอ่อนผิวข้อมาก
- Stage 4 กระดูกอ่อนผิวข้อถูกทำลาย ไม่มีช่องข้อ พบถุงน้ำในบริเวณใต้กระดูกอ่อนผิวข้อ (subchondral cyst) ของ tibial plateau และ femoral condyle ข้อเคลื่อน (subluxation)

เครื่องมือที่ใช้ในการตรวจร่างกายและทดสอบสมรรถภาพผู้ป่วยโรคข้อเสื่อมมีหลายวิธี เช่น visual analog scale (VAS) เพื่อแสดงระดับความเจ็บปวดของข้อ Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis (WOMAC) และ International Knee Documentation Committee (IKDC) score สำหรับประเมินอาการของผู้ป่วยโรคข้อเสื่อม โดยครอบคลุมทั้งความเจ็บปวดและความสามารถในการใช้งานข้อ เป็นต้น

แนวทางในการรักษาโรคข้อเสื่อมส่วนใหญ่มีวัตถุประสงค์เพื่อบรรเทาอาการและชะลอการดำเนินของโรค เช่น การให้ยาบรรเทาอาการปวดในกลุ่ม non-steroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs) การลดน้ำหนัก การทำกายภาพบำบัด การผ่าตัดจัดแนวข้อกระดูก การผ่าตัดเปลี่ยนข้อเทียม การฉีดสารหล่อลื่นเข้าข้อ การใช้เซลล์บำบัด (cell therapy) รวมถึงการใช้ PRP ในการฟื้นฟู กระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์กระดูกอ่อน และเซลล์ในข้อ (1)

2.2 เกล็ดเลือด (Platelet)

เกล็ดเลือด (platelet) เป็นเซลล์เม็ดเลือดชนิดหนึ่งที่ไม่มียนิวเคลียสและมีขนาดเล็กที่สุดโดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2-5 ไมครอนและมีความหนาประมาณ 0.5 ไมครอน ในภาวะปกติร่างกายมีเกล็ดเลือดในกระแสเลือดประมาณ $150-300 \times 10^9$ เซลล์ต่อลิตร (10) เกล็ดเลือดเจริญมาจากเซลล์ megakaryocytes อยู่ในบริเวณไขกระดูก เกล็ดเลือดประกอบไปด้วย granule ที่บรรจุ cytokines และ growth factors หลากชนิด เช่น platelet-derived growth factor (PDGF), transforming growth factor- β (TGF- β), vascular endothelial growth factor (VEGF), epidermal

growth factor (EGF), hepatocyte growth factor (HGF), fibroblast growth factor (FGF), insulin-like growth factor-1 (IGF-1), interleukin (IL), interferon- α (IFN- α), tumor necrosis factor- α (TNF- α) (5) หน้าที่หลักของเกล็ดเลือดเกี่ยวข้องกับกระบวนการแข็งตัวของเลือด นอกจากนี้เกล็ดเลือดยังมีความสามารถในการกระตุ้นการซ่อมแซมเนื้อเยื่อบริเวณที่ได้รับบาดเจ็บ โดยการหลั่ง cytokines และ growth factors (11) โดยการนำเกล็ดเลือดมาใช้งานในทางการแพทย์ซึ่งใช้ใน รูปแบบของพลาสมาเกล็ดเลือดเข้มข้น

2.3 พลาสมาเกล็ดเลือดเข้มข้น (Platelet rich plasma)

พลาสมาเกล็ดเลือดเข้มข้น หรือ platelet rich plasma (PRP) คือ พลาสมาที่มีปริมาณเกล็ดเลือดมากกว่าค่าเฉลี่ยปกติในกระแสเลือด และยังเป็นที่ยูจกในชื่อ platelet rich growth factors (PGFs), platelet-rich fibrin (PRF) และ platelet concentrate (PC) (3) พลาสมาเกล็ดเลือดเข้มข้น หรือ PRP ได้มาจากการปั่นแยกจาก peripheral blood โดยพบว่ามีการใช้งานในทางคลินิกตั้งแต่ปี พ.ศ.2525 การใช้ PRP ในผู้ป่วยมีวัตถุประสงค์เพื่อหวังผลในการลดการอักเสบ บรรเทาอาการปวด และกระตุ้นการซ่อมแซมของเนื้อเยื่อต่าง ๆ (4)

อย่างไรก็ตามผลการศึกษาที่ผ่านมามีข้อโต้แย้งในประสิทธิภาพของ PRP อยู่มาก ซึ่งอาจเกิดจากหลายปัจจัย เช่น อุปกรณ์ เครื่องมือ เทคนิควิธีที่ใช้ในการเตรียม PRP สารที่นำมากระตุ้นเกล็ดเลือด และ ปัจจัยอื่น ๆ ของตัวอย่างเลือดจากผู้บริจาคเลือด (donor) เช่น เพศ อายุ น้ำหนัก ปริมาณเกล็ดเลือด และ growth factors ในผู้ป่วยแต่ละราย

2.4 การแยกพลาสมาเกล็ดเลือดเข้มข้น

ก่อนหน้านี้นี้มีการศึกษาถึงวิธีในการแยก PRP มาตั้งแต่ปี พ.ศ.2513 (12) หลักการที่ใช้ในการแยก PRP สามารถทำได้โดยการปั่นเลือด (whole blood) ด้วยความเร็วที่เหมาะสมจนเลือดแยกออกเป็นชั้นต่าง ๆ ชั้นล่างสุดเป็นชั้นเซลล์เม็ดเลือดแดง ส่วนตรงกลางเป็นชั้นเซลล์เม็ดเลือดขาว เกล็ดเลือด และเซลล์อื่น ๆ ซึ่งมีลักษณะเป็นชั้นบาง สีขาวนูนเรียกว่า buffy coat และชั้นบนสุด เป็นชั้นที่มีสีเหลืองใส เป็นส่วนที่ประกอบไปด้วยพลาสมาและเกล็ดเลือด จากนั้นนำส่วนใสไปปั่นอีกครั้งด้วยความเร็วรอบที่มากขึ้นเพื่อให้เกล็ดเลือดตกตะกอน และนำส่วนด้านล่างที่ถูกเรียกว่า PRP แยกออกมา (13) ในปัจจุบันมีการศึกษาวิธีการเตรียม PRP เพื่อให้ได้คุณภาพสูงหลายการศึกษา รวมถึงมีชุดอุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการแยก PRP โดยเฉพาะจำนวนมาก แต่ยังไม่มียูวิธีใดที่ถือได้ว่าเป็นวิธีมาตรฐาน (14)

ในการศึกษาของ Amable และคณะในปี 2556 พบว่าความเร็วรอบ ระยะเวลา อุณหภูมิที่ใช้ และจำนวนครั้งในการปั่นมีผลต่อปริมาณเกล็ดเลือดใน PRP โดยพบว่า การปั่น 2 ครั้ง ที่อุณหภูมิ 18 °C ให้ปริมาณเกล็ดเลือดมากที่สุด นอกจากนี้ยังได้ศึกษาถึงผลของการกระตุ้นเกล็ดเลือดด้วย CaCl_2 และ Thrombin ด้วย ซึ่งพบว่า การกระตุ้นด้วย CaCl_2 ทำให้เกล็ดเลือดปลดปล่อย cytokines และ growth factors ได้มากกว่าการกระตุ้นด้วย Thrombin (5)

นอกจากนี้ในการศึกษาของคุณ Mussano และคณะในปี 2559 ยังพบว่า cytokines, chemokines และ growth factors ที่พบมากใน PRP ได้แก่ IL1 receptor antagonist, IL12, IL17, GM-CSF, INF α , IP10, RANTES และ PDGF และเมื่อทำการเปรียบเทียบในเพศชายและเพศหญิง พบว่า เพศชายจะมีระดับ PDGF มากกว่าในเพศหญิงอย่างมีนัยสำคัญ (15)

2.5 การนำพลาสมาเกล็ดเลือดเข้มข้นมาใช้ในทางการแพทย์

ดังที่กล่าวไปข้างต้น มีหลักฐานถึงการนำ PRP ในทางคลินิกตั้งแต่ช่วงปี พ.ศ.2525 ในช่วงแรกพบการนำมาใช้ในการผ่าตัดหัวใจ การผ่าตัดบริเวณขากรรไกรและใบหน้า (maxillofacial surgery) และการผ่าตัดทางทันตกรรม โดยใช้เพื่อกระตุ้นการสร้างกระดูก ขากรรไกร และรากฟัน (4)

ในปัจจุบันมีการศึกษาถึงการนำ PRP มาใช้งานอย่างหลากหลาย ซึ่งโดยส่วนใหญ่หวังผลในการลดการอักเสบ บรรเทาอาการปวด กระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน กระตุ้นการซ่อมแซมและการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อ

ในปี 2555 Panda และคณะ ได้ทำการศึกษาทดลองแบบสุ่มที่มีกลุ่มควบคุม (randomized controlled trial, RCT) ในการใช้ PRP ในรูปแบบ PRP eyedrop ในผู้ป่วย acute corneal chemical injury จำนวน 20 ราย พบว่า ในกลุ่มที่ได้รับ PRP แผลหายได้เร็วกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (16)

ในปี 2560 Cole และคณะ ศึกษาการใช้ PRP ร่วมกับการปลูกผมแบบ follicular unit grafts ในอาสาสมัครจำนวน 3 ราย พบว่า PRP สามารถกระตุ้นการปลูกผมได้ดีกว่ากลุ่มควบคุม (normal saline) แต่น้อยกว่ากลุ่มที่ใช้ platelet lysate (PRP ที่นำไป sonicated เป็นเวลา 30 นาที) และเมื่อทำการวัดปริมาณ growth factors พบว่าใน platelet lysate มีระดับของ VEGF, PDGF-BB และ TGF- β 1 สูงกว่าใน PRP มากกว่า 7 เท่า (17)

ในปี 2560 Ahmed และคณะ ได้ทำการศึกษาทดลองแบบสุ่มที่มีกลุ่มควบคุมในการใช้ PRP ในรูปแบบ platelet gel รักษาแผลผู้ป่วยเบาหวานบริเวณเท้า จำนวน 56 ราย พบว่ากลุ่มที่ได้รับ PRP แผลหายเร็วกว่าอย่างมีนัยสำคัญ (18)

สำหรับในเรื่องของผลข้างเคียงที่เกิดจากการฉีด PRP ยังพบน้อยมาก แต่เนื่องจากเป็นผลิตภัณฑ์ที่แยกได้จากเลือดของผู้ป่วยเอง จึงไม่พบการแพ้ หรือการปฏิเสธต่อต้านเมื่อฉีดกลับให้กับผู้ป่วย รวมถึงไม่พบรายงานถึงการเจริญผิดปกติของเนื้อเยื่อ การเกิดเนื้องอก หรือมะเร็ง เนื่องจาก cytokines ที่หลั่งออกมาส่วนใหญ่มีผลต่อเยื่อหุ้มเซลล์มากกว่ามีผลต่อนิวเคลียสหรือการแสดงออกของยีน (19) มีรายงานถึงการพบอาการปวด และบวมในบริเวณข้อเท้าของผู้ป่วยโรคข้อเสื่อม 1 รายทันทีหลังจากได้รับการฉีด PRP เข็มแรกที่บริเวณข้อเท้า แต่อาการดีขึ้นภายใน 2 วัน และในการฉีด 2 ครั้งถัดมาไม่พบอาการผิดปกติแต่อย่างใด (20) การติดเชื้อในบริเวณที่ได้รับการฉีด PRP เป็นอีกผลข้างเคียงที่อาจเกิดขึ้นได้ แต่สามารถลดความเสี่ยงได้ด้วยการสร้างมาตรฐานที่ดีในกระบวนการเตรียมและฉีด PRP ให้แก่ผู้ป่วย

2.6 พลาสมาเกล็ดเลือดเข้มข้นในโรคกระดูกและข้อ

ปัจจุบันมีการศึกษาถึงผลของ PRP ในโรคกระดูกและข้อซึ่งได้รับความสนใจ และมีการศึกษาทั้งความสามารถในการซ่อมแซมเนื้อเยื่อ และการแก้ไขความบกพร่องที่เกิดเนื่องจากภาวะเสื่อม การรักษาอาการบาดเจ็บจากการเล่นกีฬา และการบาดเจ็บของเส้นเอ็น กล้ามเนื้อ และกระดูก โดยพบว่าการศึกษา PRP ในบริเวณที่ได้รับการบาดเจ็บสามารถช่วยบรรเทาอาการบาดเจ็บของเอ็นข้อเข่า ข้อศอก กล้ามเนื้อ และอาการของโรคข้ออักเสบให้ดีขึ้น ความเจ็บปวดลดลง และในการผ่าตัดเพื่อรักษาอาการบาดเจ็บของเส้นเอ็นพบว่า การใช้ PRP ทำให้แผลหายเร็วขึ้นและใช้ระยะเวลาการพักฟื้นน้อยลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (21) การศึกษาทบทวนวรรณกรรมอย่างเป็นระบบ (systematic review) ของ Filardo และคณะ (2018) ซึ่งรวบรวมการศึกษาในเอ็นลูกสะบ้า (patellar tendon) 19 บทความ เอ็นร้อยหวาย (Achilles tendon) 24 บทความ เอ็นข้อศอกด้านนอก (lateral elbow tendons) 29 บทความ และเอ็นข้อไหล่ (rotator cuff) 32 บทความ ในมนุษย์ พบว่า การใช้ PRP น่าจะให้ผลดีในการรักษาเอ็นลูกสะบ้า แต่ในเอ็นร้อยหวาย เอ็นข้อศอกด้านนอก และเอ็นข้อไหล่ ยังไม่มีข้อสรุปที่แน่ชัด (22) ซึ่งผลการศึกษาในเอ็นร้อยหวายแตกต่างจากการทดลองในหนู (23) และกระต่าย (24) ที่พบว่าการศึกษา PRP สามารถช่วยในการฟื้นฟูการบาดเจ็บของเอ็นร้อยหวายได้ นอกจากนี้ยังมีผลการศึกษาการใช้ PRP ในโรคข้อเสื่อมจำนวนมาก และในการศึกษาของคุณ

Brkljac และคณะในปี 2559 ซึ่งทำโดยการฉีด PRP ในผู้ป่วยโรคเอ็นข้อศอกด้านนอกอีกเสบจำนวน 34 ราย ที่ให้การรักษาด้วยวิธีมาตรฐานแล้วไม่ได้ผล จากนั้นประเมินโดย Oxford Elbow Score (OES) ซึ่งจะประเมิน 3 ส่วนคือ ระดับความเจ็บปวด การใช้งาน และสุขภาพจิต พบว่าเมื่อได้รับ PRP ผู้ป่วย 88.2% มี Oxford Elbow Score ที่ดีขึ้น (25)

2.7 พลาสมาเกล็ดเลือดเข้มข้นในโรคข้อเสื่อม

การใช้ PRP ในโรคข้อเสื่อมเพื่อกระตุ้นการเจริญเติบโตมักได้ผลดีในช่วงระยะแรก (early-stage) การศึกษาของ Görmeli และคณะ ในปี 2560 ผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมจำนวน 162 ราย ได้รับการฉีด PRP เข้าข้อเข่าผู้ป่วย จากนั้นติดตามประเมินผลโดยใช้แบบประเมิน EuroQol visual analogue scale (EQ-VAS) และ International Knee Documentation Committee (IKDC) score เป็นระยะเวลา 6 เดือน พบว่ากลุ่มที่อยู่ในระยะ early-stage (stage 1-3) ให้ผลการรักษาที่ดีกว่าผู้ป่วยในกลุ่ม advance stage (stage 4) (26) และในการศึกษาแบบ randomized controlled trial ในผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมจำนวน 30 รายโดย Smith ในปี 2559 ซึ่งได้ฉีด PRP เข้าข้อเข่าผู้ป่วย 3 ครั้งในสัปดาห์ที่ 0, 1 และ 2 จากนั้นติดตามประเมินผลโดยใช้ Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis Index (WOMAC) score ในเวลา 12 เดือน พบว่ากลุ่มทดลองที่ได้รับ PRP มีผลการประเมินที่ดีกว่ากลุ่มควบคุมที่ได้รับ saline placebo (27)

PRP ที่ถูกฉีดเข้าไปในบริเวณข้อเสื่อมจะถูกกระตุ้น โดยตัวกระตุ้นเช่น CaCl_2 หรือ thrombin ให้มีการปลดปล่อย cytokines และ growth factors ที่ถูกเก็บไว้ใน granules ภายในเซลล์เกล็ดเลือดออกมา โดย cytokines และ growth factors เหล่านี้ทำหน้าที่กระตุ้นการเจริญเติบโต และการซ่อมแซมส่วนที่สึกหรอของเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน (14)

นอกจากนี้มีการศึกษาในหลอดทดลอง (*in vitro*) ถึงผลของ PRP ต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ (proliferation) และการเจริญพัฒนา (redifferentiation) ของเซลล์กระดูกอ่อน (chondrocytes) โดยคุณ Jeyakuma และคณะ ในปี 2560 พบว่าเมื่อนำเซลล์ chondrocytes มาเพิ่มจำนวนในหลอดทดลอง โดยนำ articular chondrocytes จากผู้ป่วยโรคข้อเสื่อมที่เข้ารับการผ่าตัดเปลี่ยนข้อเข่าเทียมมาทำการแยก และเพาะเลี้ยงเซลล์ร่วมกับ PRP จากนั้นทดสอบอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ที่ 3, 6 และ 9 วัน โดยวิธี sodium 3'-[1-(phenylaminocarbonyl)-3,4-tetrazolium]-bis(4-methoxy-6-nitro)benzene sulfonic acid hydrate (XTT) assay และ real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) พบว่า PRP มีผลกระตุ้น proliferation และ redifferentiation

ของ dedifferentiation chondrocytes (28) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Moussa และคณะ ในปี 2560 ที่ศึกษาโดยวิธีนับจำนวนเซลล์ (cell counting) และ WST8 proliferation assay พบว่า PRP มีผลกระทบต่อเพิ่มจำนวนของเซลล์ osteoarthritic articular chondrocytes (29) และในงานวิจัยของ Gilbertie และคณะ ในปี 2561 ยังพบว่า PRP มีผลกระทบต่อ proliferation และการผลิต hyaluronic acid ของ synoviocytes พร้อมทั้งช่วยป้องกันการถูกทำลายของ chondrocytes ที่เกิดเนื่องจากมีสาร cytokines ที่ผลิตมาจาก synoviocytes (30)

นอกจากเซลล์ chondrocytes และ synoviocytes ของผู้ป่วยโรคข้อเสื่อมจะมีการเจริญเติบโตที่แตกต่างจากเซลล์ปกติแล้ว ยังมีการแสดงออกของยีนที่แตกต่างออกไปด้วย โดยในการศึกษาของคุณ Eid และคณะ ในปี 2552 และคุณ Zhong และคณะในปี 2559 พบว่าเซลล์ chondrocytes จากผู้ป่วยโรคข้อเสื่อมเมื่อมีระดับความรุนแรงของโรคเพิ่มขึ้นจะมีการแสดงออกของ SOX9, Aggrecan, COL2A1 ลดลง และมีการแสดงออกของ COL1A1 เพิ่มขึ้น ซึ่งแสดงถึงการเสื่อมสภาพของเซลล์ chondrocyte (31, 32) ซึ่งในการศึกษาของคุณ Jeyakuma ในปี 2560 โดยทดลองเลี้ยงเซลล์ chondrocyte ร่วมกับ PRP พบว่าช่วยให้เซลล์ chondrocyte มีการแสดงออกของ COL2A1 มากขึ้น (28) ในส่วนของเซลล์ synoviocytes การศึกษาของคุณ Assirelli และคณะ ในปี 2558 ซึ่งทำโดยการเลี้ยง synoviocyte ร่วมกับ PRP 2 ชนิด คือ pure PRP และ leucocyte PRP ในปริมาณ 5%, 10% และ 20% พบว่า pure PRP ช่วยลด IL-1B และ IL-8 ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น inflammatory cytokines และช่วยเพิ่ม IL-10 ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น anti-inflammatory cytokines แสดงถึงความสามารถในการลดการอักเสบของ PRP (33)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 ประชากร

3.1.1 เกณฑ์การคัดเลือกอาสาสมัคร (Inclusion Criteria)

ผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่มาเข้ารับการรักษา ณ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย โดยแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ

1. กลุ่มผู้ป่วยที่ได้รับการฉีด PRP ข้อเข่า และนำ PRP ที่เหลือจากการใช้งานมาทดสอบทางห้องปฏิบัติการ โดยมีเกณฑ์การคัดเลือกดังนี้
 - 1.1 เป็นผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมเพศชายหรือเพศหญิง อายุมากกว่า 40 ปี
 - 1.2 ไม่ได้รับการฉีดยาระงับอาการปวดเข้าข้อเข่าในช่วง 3 เดือนที่ผ่านมา
 - 1.3 เป็นผู้ป่วยที่ได้รับการประเมินระดับความรุนแรงของโรคตามเกณฑ์ของ Kellgren and Lawrence อยู่ใน stage 1-2
 - 1.4 เมื่ออยู่ในขณะพักมีระดับความเจ็บปวด visual analogue scale (VAS) อยู่ในช่วง 0-3 และเมื่ออยู่ในระหว่างทำกิจกรรม เช่น ขึ้นหรือเดิน มี VAS score ≥ 4
2. กลุ่มผู้ป่วยที่เก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อมาเพื่อแยกเพาะเลี้ยง chondrocytes และ synoviocytes
 - 2.1 ผู้ป่วยที่เข้ารับการผ่าตัดเปลี่ยนข้อเข่าเทียม

3.1.2 เกณฑ์การคัดอาสาสมัครออก (Exclusion Criteria)

1. ผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่มีอาการของโรคอื่นทางระบบกระดูกและข้อ เช่น โรคข้ออักเสบ ข้อติดแข็ง รูมาตอยด์ หรือมะเร็งกระดูก
2. มีประวัติการผ่าตัด หรือได้รับบาดเจ็บรุนแรงที่ข้อเข่า
3. มีความผิดปกติของเกล็ดเลือด

3.1.3 เกณฑ์การถอนอาสาสมัครออก (Withdrawal Criteria)

1. ขาดการติดตามผล
2. เกิดการติดเชื้อในข้อเข่า
3. ได้รับการรักษาในรูปแบบอื่น

3.2 ขนาดของประชากรตัวอย่าง

ประชากรตัวอย่างกลุ่มที่ 1 ซึ่งเป็นผู้ป่วยข้อเข่าเสื่อม โดยทำการเก็บข้อมูลปริมาณ cytokines และ growth factors ใน PRP เก็บ PRP ที่เหลือจากการวิเคราะห์มาทดสอบผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ chondrocytes และ synoviocytes และวิเคราะห์ผลของการฉีด PRP ในข้อเข่า คำนวณโดยใช้ค่าความไว (sensitivity) ของชุดตรวจ Bio-plex Precision pro Human cytokine Assay

คำนวณกลุ่มตัวอย่าง โดยใช้สูตรคำนวณดังนี้

$$n = \frac{Z_{\alpha}^2 P(1-P)}{d^2 - P}$$

$$= \frac{(1.96)^2 (90)(10)}{(15)^2 - 90}$$

$$= 25.61$$

เมื่อ n = ขนาดของกลุ่มตัวอย่าง

Z = ค่า Z score ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

d = relative acceptable error ของ P (15%)

P = sensitivity ของ Bio-plex Precision pro Human cytokine Assay (90%)

ดังนั้นจึงต้องใช้กลุ่มตัวอย่างอย่างน้อย 27 ราย

ประชากรตัวอย่างกลุ่มที่ 2 เป็นการเก็บเซลล์จากผู้ป่วยข้อเข่าเสื่อมที่เข้ารับการผ่าตัดเปลี่ยนข้อเข่าที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ เพื่อนำมาทดสอบผลของ PRP ต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ โดยได้ทำการเก็บของกลุ่มตัวอย่างจำนวน 3 ราย

3.3 เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย

1. Autoclave
2. Autopipette (Eppendorf, Germany)
3. Biohazard laminar flow hood (GelmanScience, Australia)
4. Cell culture incubator (Thermofisher scientific, USA)
5. Centrifuge machine (Eppendorf, Germany)
6. Electrophoresis chamber set (Bio-Rad, USA)
7. Forceps
8. Freezer -80 °C (Forma Scientific, USA)
9. Gel Doc 1000 (Bio-Rad, USA)
10. Hemocytometer (Hausser Scientific, Germany)
11. Microplate reader (Tecan, Switzerland)
12. Microscope with camera (Nikon, Japan)
13. Nanodrop ND-100 Spectrophotometer (Scientific, USA)
14. pH meter (Eutech Cybernatics, United Kingdom)
15. Refrigerator (Sanyo, Japan)
16. Scalpel
17. StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA)
18. Thermal cycle polymerase chain reaction (PCR) machine (Eppendorf, Germany)
19. Ultrasonication machine (Sonics & Materials, USA)
20. Vortex mixer (Scientific Industry, USA)

21. Water bath (Mettler, Germany)

22. Water purification equipment (Labconco, USA)

3.4 วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

1. 25 cm² cell culture flasks (Corning, USA)

2. 75 cm² cell culture flasks (Corning, USA)

3. Beaker (Pyrex, USA)

4. Blade (Parabolar, Germany)

5. Centrifuge tube (Corning, USA)

6. Cylinder (Pyrex, USA)

7. Digital timer

8. Disposable gloves (Sri Trang glove, Thailand)

9. Needle (Nipro, Japan)

10. Petri dish (Hycon, USA)

11. Pipette aid (Eppendorf, Switzerland)

12. Pipette tip (AxyGen, USA)

13. Reagent bottle (Duran, USA)

14. Real-time PCR tube

15. Syringe (Nipro, Japan)

3.5 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

1. สารเคมีสำหรับเลี้ยงเซลล์

Dulbecco's modified eagle's medium high glucose media (DMEM-HG)

Fetal bovine serum (FBS)

- Penicillin-Streptomycin
- Ascorbic acid
- Phosphate buffer solution (PBS)
- Trypsin-ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA)
- Type II Collagenase
2. สารเคมีสำหรับทดสอบการเพิ่มจำนวนเซลล์
 - Trypan blue
 - 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT)
 - Dimethyl sulfoxide (DMSO)
 3. สารเคมีสำหรับสกัด DNA
 - GF-1 Nucleic Acid Extraction Kits (Vivantis Technologies, Malaysia)
 4. สารเคมีสำหรับสกัด RNA
 - Absolute Ethanol
 - Isopropanol
 - TRIzol Reagent
 - ddH₂O
 5. สารเคมีสำหรับทำ Real-time polymerase chain reaction (qPCR)
 - Primer (ACAN, COL2A1, hGAPDH, HGB, IL-1 β , IL-6, MMP-13, ND-1, S36B4, SOX-9 และ Telomere)
 - QPCR Green Master Mix (Biotechrabbit, Germany)
 6. ชุดทดสอบปริมาณ cytokines และ growth factors
 - Bio-Plex Pro™ Human Cytokine 27-plex Assay kit (Bio-Rad, USA)

3.6 การเก็บรวบรวมข้อมูล

1. เก็บข้อมูลพื้นฐานเช่น เพศ อายุ น้ำหนัก ส่วนสูง ผลการตรวจนับเม็ดเลือดและเกล็ดเลือดจากทะเบียนประวัติผู้ป่วย โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย
2. เก็บข้อมูลสมรรถภาพทางกายและระดับความเจ็บปวด โดยใช้ WOMAC score
3. เก็บข้อมูลการวิเคราะห์ตัวอย่างจากการทดลองทางห้องปฏิบัติการ

ตารางที่ 1 การเก็บข้อมูลและตัวอย่างจากผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม

สัปดาห์ที่	Physical performance,	Buffy coat	PPP และ PRP		
	VAS score และ	Telomere length และ	PRP	Cytokines	<i>In vitro</i>
	WOMAC score	mtDNA copy number	injection	profiling	study
0	✓	✓	✓	✓	✓
6	✓		✓		✓
12	✓	✓			
18	✓				

3.7 ข้อพิจารณาทางด้านจริยธรรม

การศึกษานี้ได้รับการอนุมัติจากคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โครงการวิจัยหมายเลข 040/63 เมื่อวันที่ 9 กรกฎาคม 2563

3.8 การวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ

3.8.1 การแยกพลาสมาเกล็ดเลือดเข้มข้น (PRP) และพลาสมาเกล็ดเลือดต่ำ (PPP)

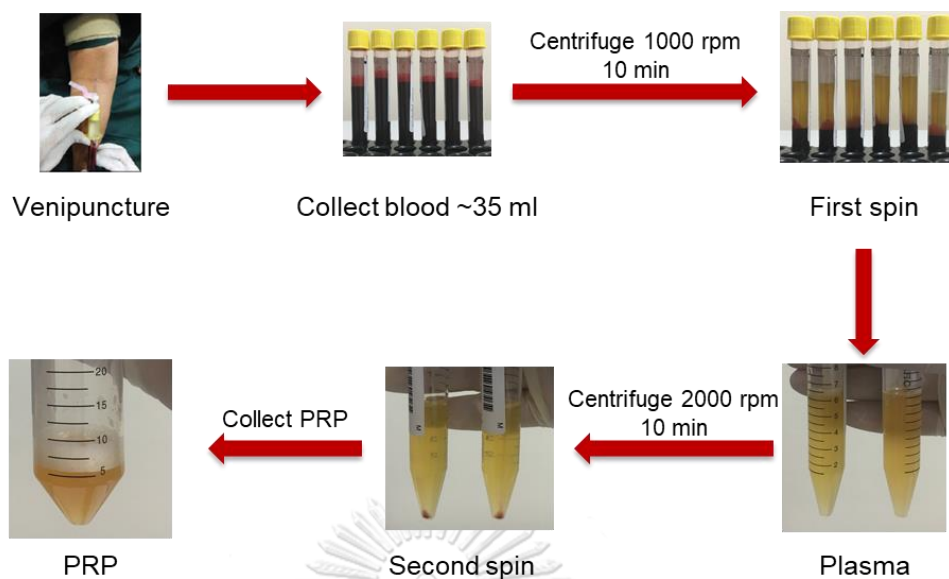
3.8.1.1 เก็บเลือด (peripheral blood) จากผู้ป่วยทั้งหมด 35 ml ในหลอด citrate phosphate dextrose adenine (CPDA) ซึ่งมีฟาจูกวางสีเหลือง

3.8.1.2 นำเลือดที่เก็บได้มาปั่นที่ความเร็ว 1,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที

3.8.1.3 ดูดส่วนใสและ buffy coat มาใส่ในหลอดขนาด 15 ml จำนวน 2 หลอด จากนั้นนำไปปั่นอีกครั้งที่ความเร็ว 2,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที

3.8.1.4 ดูดพลาสมา 2/3 ด้านบนของหลอดแยกเก็บเป็น PPP และดูด 1/3 ด้านล่าง (PRP) ของทั้ง 2 หลอดมารวมกันในหลอดขนาด 50 ml โดยได้ปริมาตรสุดท้ายประมาณ 6-8 ml ต่อเลือด 35 ml

3.8.1.5 เก็บพลาสมา PPP และ PRP ที่ -80°C สำหรับนำมาใช้ในการทดสอบทางห้องปฏิบัติการ



รูปที่ 1 ขั้นตอนการเตรียม PRP

3.8.2 การวัด growth factors และ cytokines ในพลาสมา PPP และ PRP ที่เก็บจากผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมจำนวน 40 รายด้วย multiplex assay (Bio-Plex Pro Human Cytokine 27-plex Assay)

3.8.2.1 เติม magnetic beads ที่จำเพาะกับ growth factors และ cytokines ที่ต้องการศึกษาลงใน 96 well plate หลุมละ 50 μ l

3.8.2.2 ล้าง magnetic beads ด้วย wash buffer ปริมาณ 100 μ l 2 ครั้ง

3.8.2.3 เติม standards และ samples หลุมละ 50 μ l sample จากนั้นนำไปบ่มบน shaker ที่ความเร็ว 850 rpm อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที ล้างด้วย wash buffer 100 μ l 3 ครั้ง

3.8.2.4 เติม Antibody detection 25 μ l และบ่มบน shaker ที่ความเร็ว 850 rpm อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที และล้างด้วย wash buffer ปริมาณ 100 μ l 3 ครั้ง

3.8.2.5 เติม streptavidin-PE 50 μ l และนำไปบ่มบน shaker ที่ความเร็ว 850 rpm อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที และล้างด้วย wash buffer ปริมาณ 100 μ l 3 ครั้ง

3.8.2.7 เติม assay buffer 125 μ l และนำไปบ่มบน shaker ที่ความเร็ว 850 rpm อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 วินาที

3.8.2.8 วัดปริมาณ growth factors และ cytokines ด้วยเครื่อง Bio-Plex 200

3.8.3 การเก็บและเลี้ยงเซลล์ chondrocytes และ synoviocytes

3.8.3.1 เก็บกระดูกอ่อนผิวข้อ (articular cartilage) และเยื่อข้อ (synovial tissue) จากผู้ป่วยที่เข้ารับการผ่าตัดเปลี่ยนข้อเทียม (total knee replacement surgery)

3.8.3.2 ล้างกระดูกอ่อนผิวข้อ และเยื่อข้อ ด้วย phosphate buffered saline (PBS) และตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ ขนาดประมาณ 1 mm^3

3.8.3.3 ย่อยด้วย 0.1% trypsin และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 15 นาที

3.8.3.4 นำไปปั่นที่ความเร็ว 1,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที และเทส่วนใสด้านบน ออก

3.8.3.5 เติม 1 mg/ml collagenase และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยนำหลอดออกมาเขย่าทุก 15-30 นาที

3.8.3.6 นำไปปั่นที่ความเร็ว 1,500 rpm เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสด้านบนออก

3.8.3.7 นำไปเลี้ยงใน growth medium

- Chondrocyte growth medium: DMEM/F12, 10% fetal bovine serum (FBS), 1% GlutaMAX, 1% Antibiotic-Antimycotic, 0.05 mg/ml ascorbic acid
- Synoviocyte growth medium: DMEM-HG, 10% FBS, 1% GlutaMAX, 1% Antibiotic-Antimycotic

3.8.3.8 เปลี่ยน media ครั้งแรกหลังจากเริ่มเพาะเลี้ยง 24 ชั่วโมง โดยล้างเศษเซลล์ ด้วย PBS 2-3 ครั้งก่อนการเติม media ใหม่ จากนั้นเปลี่ยน media ทุก 2-3 วัน

3.8.3.9 ตรวจสอบอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ด้วย trypan blue dye และนับจำนวนเซลล์โดยใช้ hemocytometer

3.8.3.10 นำเซลล์ OA chondrocytes และ OA synoviocytes ที่อยู่ใน passage ที่ 1-3 มาใช้ในการศึกษาทดลองต่อไป

3.8.4 การตรวจสอบการเจริญเติบโตของเซลล์ chondrocytes จากผู้ป่วยจำนวน 3 รายและ synoviocytes จากผู้ป่วยจำนวน 2 รายด้วย MTT assay

3.8.4.1 เพาะเลี้ยงเซลล์ OA chondrocytes และ OA synoviocyte ลงใน 96-well plates จำนวน 1,000 cells ใน control medium (10% FBS) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์เกาะกับจานเลี้ยงเซลล์

3.8.4.2 เตรียมอาหารเลี้ยงที่ใช้ในการทดสอบโดยกลุ่มควบคุมใช้อาหารเลี้ยงที่ผสม 10% FBS และ 2 U/mL heparin สำหรับอาหารเลี้ยงที่ผสม 10% PPP และ 10% PRP เตรียมโดย sonicate PPP และ PRP ด้วยความถี่ 20 kHz เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำมาผสมกับอาหารเลี้ยงและ 2 U/mL heparin เพื่อป้องกันการแข็งตัวของอาหารเลี้ยง

3.8.4.3 หลังจาก 48 ชั่วโมงเปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงที่ผสม 10% FBS, 10% PPP หรือ 10% PRP

3.8.4.4 วิเคราะห์อัตราการเจริญเติบโตของ chondrocytes ในแต่ละช่วงเวลาที่แตกต่างกัน ที่เวลา 3, 6 และ 9 วัน ด้วยการเติมสารละลาย 5 mg/ml MTT ปริมาตร 10 μ l จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง

3.8.4.5 นำส่วนบน (supernatant) ออกและเติม dimethyl sulfoxide (DMSO) 100 μ l

3.8.4.6 วัดการเปลี่ยนแปลงของสี MTT (สีเหลือง) เป็นสี formazan crystal (สีม่วง) ด้วย microplate reader ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร

3.8.5 การตรวจสอบการเคลื่อนตัวของเซลล์ chondrocytes จากผู้ป่วยจำนวน 3 รายและ synoviocytes จากผู้ป่วยจำนวน 2 รายด้วย scratch assay

3.8.5.1 เพาะเลี้ยง OA chondrocytes และ OA synoviocytes ที่ความหนาแน่น 2.5×10^5 cells/ml ลงใน 6 wells plate ที่อุณหภูมิ 37 °C และ 5% CO₂

3.8.5.2 เพาะเลี้ยงเซลล์ให้เต็มพื้นที่ จากนั้นใช้ pipette tip ขีดทำให้เกิดช่องว่างระหว่างกลุ่มเซลล์ (scratching) ถ้างด้วย PBS buffer แล้วเติม medium ที่ผสม 10% FBS, 10% PPP หรือ 10% PRP จากนั้นถ่ายรูปและวัดระยะห่างของช่องว่าง

ระหว่างกลุ่มเซลล์ด้วย light microscope with digital camera ที่ 0, 24 และ 48 ชั่วโมง

3.8.6 การตรวจสอบยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของเซลล์ OA chondrocytes จากผู้ป่วยจำนวน 3 รายและ OA synoviocyte จากผู้ป่วยจำนวน 2 รายด้วย qRT-PCR

3.8.6.1 เพาะเลี้ยง OA chondrocytes และ OA synoviocytes ที่ความหนาแน่น 2.5×10^5 cells/ml ใน control medium (10% FBS) เป็นเวลา 48 ชั่วโมงเพื่อให้เซลล์เกาะกับจานเลี้ยงเซลล์

3.8.6.2 หลังจาก 48 ชั่วโมงเปลี่ยนเป็น medium ที่ใช้ serum เป็น 10% FBS, 10% PPP หรือ 10% PRP และเลี้ยงต่อเป็นเวลา 3, 6 และ 9 วัน

3.8.6.3 เมื่อครบเวลาดึงเซลล์ด้วย PBS และนำเซลล์ที่ได้มาสกัด RNA ด้วย Trizol[®] reagent

3.8.6.4 นำ total RNA มาทำ reverse transcription เพื่อสร้าง complementary DNA (cDNA)

3.8.6.5 นำ cDNA มาทำ PCR amplification โดยใช้ primer ที่เหมาะสม เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน hGAPDH, SOX-9, COL2A1 และ Aggrecan ใน chondrocytes และ hGAPDH, IL-1 β , IL-6, MMP-13 ใน synoviocytes

3.8.7 การหาความยาว telomere ใน leukocyte ของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมจำนวน 31 รายด้วย qRT-PCR

3.8.7.1 สกัด DNA จากเลือดของผู้ป่วยที่เก็บในสัปดาห์ที่ 0 และ 12 ด้วย GF-1 Nucleic Acid Extraction Kits

3.8.7.2 นำ DNA มาทำ PCR amplification โดยใช้ primer ที่เหมาะสม เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน S36B4 และ Telomere

3.8.8 การหาจำนวน mitochondria copy number ใน leukocyte ของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมจำนวน 31 รายด้วย qRT-PCR

3.8.8.1 นำ DNA ที่สกัดได้จากข้อ 3.7.1 มาทำ PCR amplification โดยใช้ primer ที่เหมาะสม เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน HGB และ ND-1

3.8.9 การฉีด PRP เข้าข้อเข่าในผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมจำนวน 31 ราย และทดสอบสมรรถภาพทางกาย ระดับความเจ็บปวด และ WOMAC score

3.8.9.1 ประเมินระดับความเจ็บปวดโดยใช้ VAS score ประเมินสมรรถภาพทางกาย ก่อนการฉีด PRP โดยใช้

- Sit To Stand test (STS) จับเวลาในการลุกนั่งจากเก้าอี้ 5 ครั้ง
- Time Up and Go test (TUG) จับเวลาที่ใช้ในการเดิน 3 เมตร จากนั้นหันตัวเดินกลับมาที่เดิม
- 3-Minute Walk Test (3 MWT) นับระยะทางที่เดินได้ภายใน 3 นาที
- WOMAC test โดยใช้แบบสอบถามทั้ง 3 หมวด คือ อาการปวดที่สัมพันธ์กับการทำกิจกรรม อาการข้อฝืดหรือติดที่สัมพันธ์กับการทำกิจกรรม และความสามารถในการทำกิจกรรมต่าง ๆ

3.8.9.2 เติม CaCl_2 10% W/V 200 μl ต่อ PRP 5 ml เพื่อกระตุ้นเกล็ดเลือดให้ปลดปล่อย cytokines และ growth factors ซึ่ง CaCl_2 อาจมีผลข้างเคียงทำให้ผู้ป่วยเกิดผื่นแพ้ผิวหนัง อ่อนเพลีย เบื่ออาหาร ปากแห้ง คลื่นไส้ อาเจียนได้ แต่ยังไม่มีการรายงานถึงอาการข้างต้นในผู้ป่วยที่ได้รับการฉีด PRP ในข้อเข่า และไม่พบการทำปฏิกิริยาของสาร CPDA ในหลอดเก็บเลือดกับ CaCl_2 (Raife and Paola, 2004) นอกจากนี้กระบวนการปั่นแยกเกล็ดเลือดทำให้สาร CPDA ตกค้างเหลืออยู่น้อยมากและไม่ส่งผลต่อการออกฤทธิ์ของ CaCl_2 ในการกระตุ้นเกล็ดเลือด (platelet activation)

3.8.9.3 นำ PRP ฉีดเข้าข้อเข่าให้กับผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมโดยแพทย์ โดยผู้ป่วยจะได้รับการฉีดทั้งหมด 2 ครั้งที่ 0 และ 6 สัปดาห์

3.8.9.4 ประเมินสมรรถภาพทางกายและระดับความเจ็บปวดภายหลังจากฉีด PRP อีกครั้งที่ 6, 12 และ 18 สัปดาห์,

3.9 การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูลพื้นฐานและแสดงผลข้อมูลที่ได้เป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (mean \pm standard error of mean (SEM)) เปรียบเทียบจำนวนเกล็ดเลือดใน plasma และ

PRP และเปรียบเทียบปริมาณ cytokines และ growth factors ใน PPP และ PRP ด้วย Paired Student *t*-test เปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ และการแสดงออกของยีนในกลุ่มที่ได้รับ FBS PPP และ PRP ด้วย one-way analysis of variance (One-Way ANOVA โดยใช้ Tukey's post hoc test เปรียบเทียบระดับความเจ็บปวด ผลการทดสอบสมรรถภาพทางกาย และ WOMAC score ในผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมก่อนและหลังได้รับการฉีด PRP เข้าข้อเข่าด้วย Paired Student *t*-test และ Wilcoxon Signed Ranks test ทดสอบความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยต่าง ๆ ด้วย Pearson correlation test โดยใช้โปรแกรม SPSS ในการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติและใช้ค่าความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อ $P\text{-value} < 0.05$



บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 ประชากรที่ใช้ในการศึกษา

อาสาสมัครของการศึกษาในครั้งนี้เป็นอาสาสมัครเพศหญิงจำนวนทั้งหมด 42 ราย โดยแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ได้รับการฉีด PRP ข้อเข่า และนำ PRP ที่เหลือจากการใช้งานมาทดสอบทางห้องปฏิบัติการ จำนวน 40 ราย และกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่เก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อมาเพื่อแยกเพาะเลี้ยง chondrocytes และ synoviocytes จำนวน 3 ราย

อาสาสมัครที่ได้รับการฉีด PRP ข้อเข่ามีอายุเฉลี่ย 67.10 ± 1.45 ปี มี BMI เฉลี่ย $25.34 \pm 0.60 \text{ kg/m}^2$ มีจำนวนเกล็ดเลือดเฉลี่ยใน Plasma และ PRP $2.67 \pm 0.12 \times 10^5$ และ $4.46 \pm 0.18 \times 10^5$ ตามลำดับ ซึ่งเมื่อทดสอบด้วยค่าสถิติ Pair T-Test พบว่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ดังแสดงในตารางที่ 2

สำหรับอาสาสมัครกลุ่มที่เก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อมาเพื่อแยกเพาะเลี้ยง chondrocytes และ synoviocytes มีอายุเฉลี่ย 69.00 ± 2.08 ปี

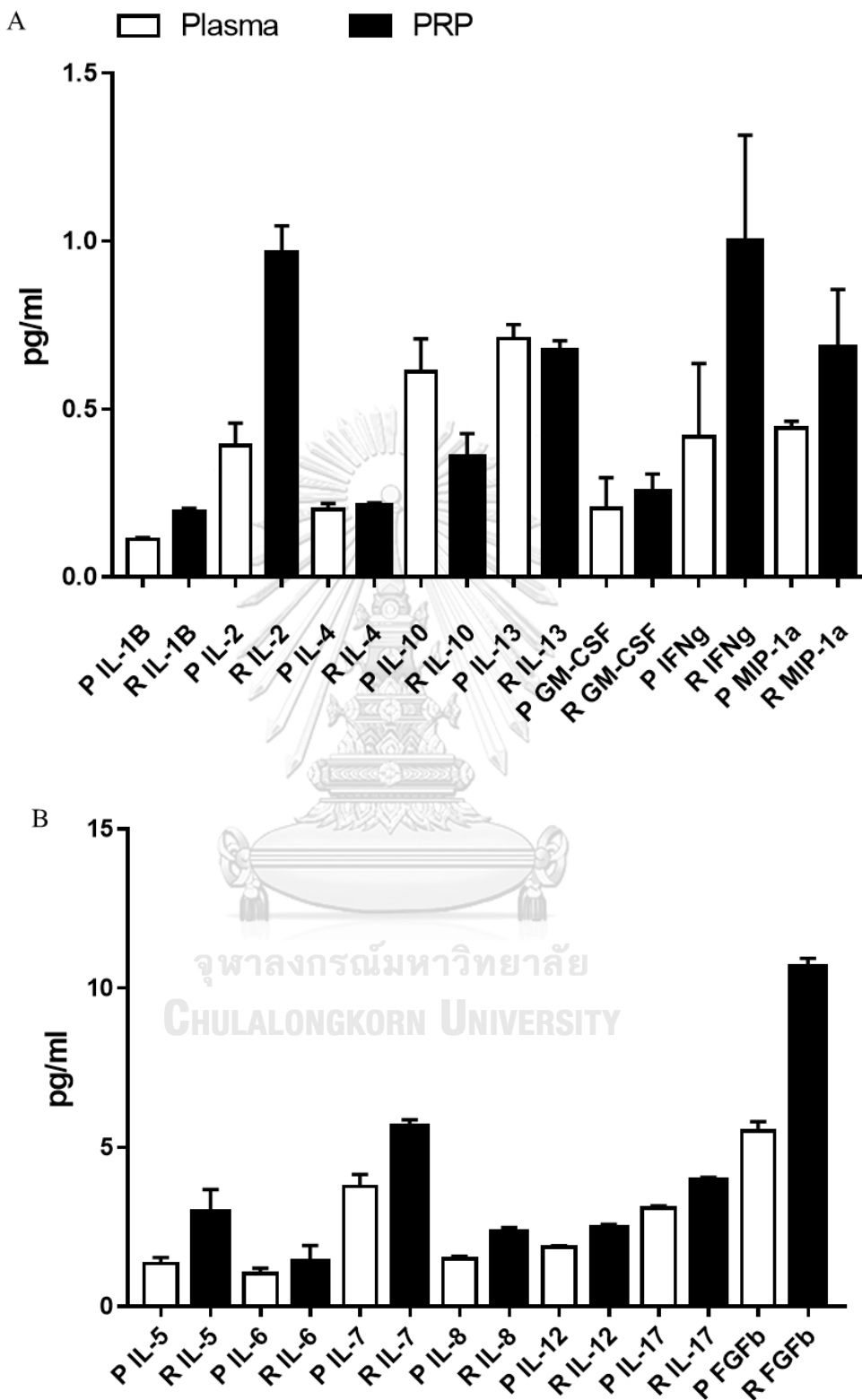
ตารางที่ 2 ข้อมูลพื้นฐานของอาสาสมัครที่ได้รับการฉีด PRP ข้อเข่า และนำ PRP ที่เหลือจากการใช้งานมาทดสอบทางห้องปฏิบัติการ

ข้อมูลอาสาสมัคร	(mean \pm SEM)	<i>P-value</i>
อายุ (ปี)	67.10 ± 1.45	
BMI (kg/m^2)	25.34 ± 0.60	
จำนวนเกล็ดเลือด (cells/ μl)		< 0.001
- Plasma	$2.67 \pm 0.12 \times 10^5$	
- PRP	$4.46 \pm 0.18 \times 10^5$	

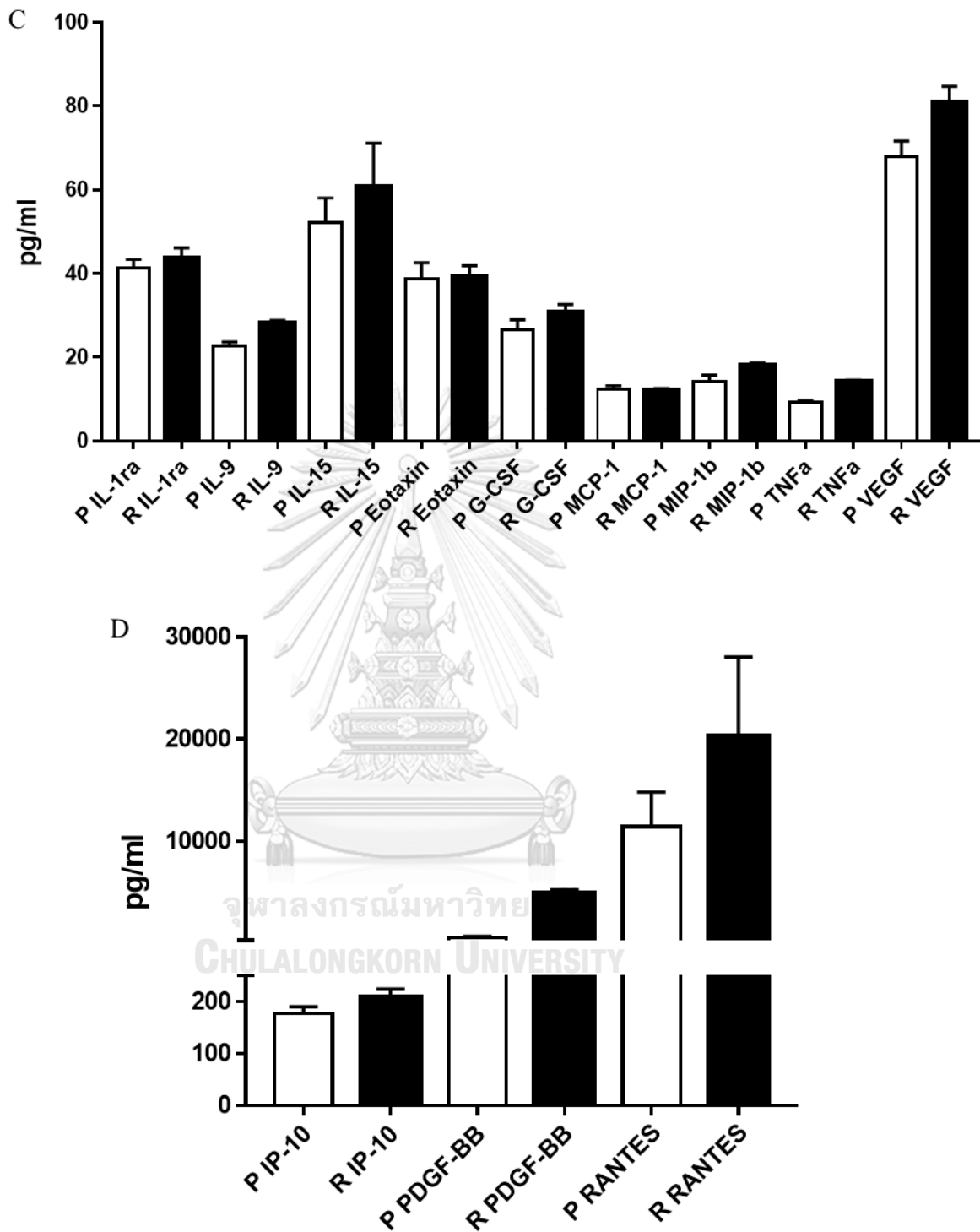
4.2 การศึกษาความเข้มข้นของ cytokines และ growth factors ในพลาสมา และพลาสมาเกล็ดเลือดเข้มข้น

ในอาสาสมัครทั้ง 40 คน เมื่อนำ plasma และ PRP มาตรวจสอบปริมาณ cytokines และ growth factors ทั้ง 27 ชนิดประกอบด้วย IL-1 β , IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, G-CSF, GM-CSF, Eotaxin, RANTES, IFN- γ , TNF- α , IP-10, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , bFGF, VEGF และ PDGF-BB ด้วย Bio-Plex Pro™ Human Cytokine 27-plex Assay แสดงในรูปที่ 2

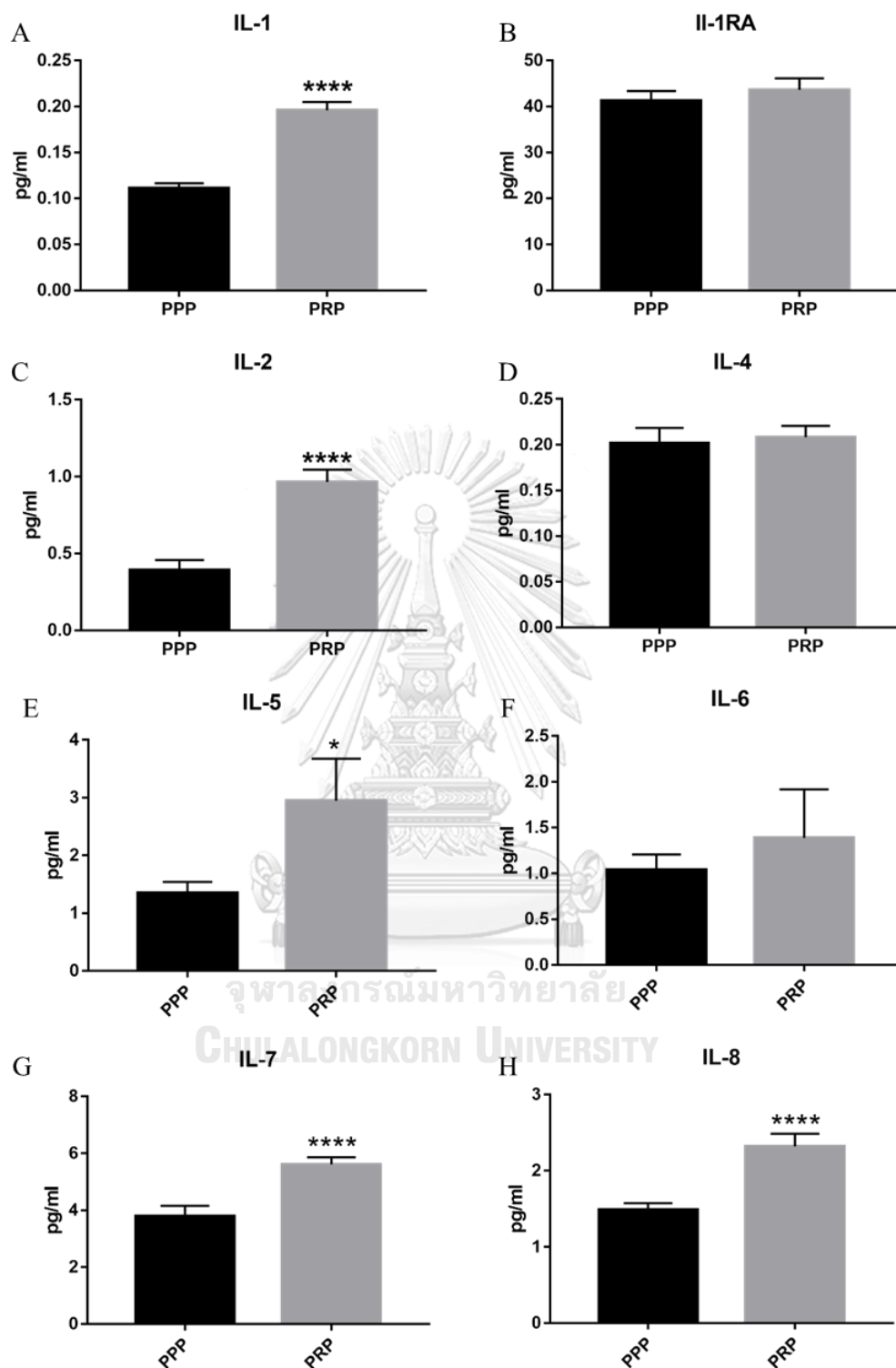
เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยค่าสถิติ Pair T-Test พบว่า ปริมาณของ IL-1 β , IL-2, IL-5, IL-7, IL-8, IL-9, IL-12, IL-17, IFN- γ , TNF- α , IP-10, MIP-1 β , bFGF, VEGF และ PDGF-BB ใน PRP สูงกว่าใน plasma อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) แต่ปริมาณของ IL-10 ใน PRP ต่ำกว่าใน plasma อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ดังแสดงในรูปที่ 3 สำหรับใน IL-1ra, IL-4, IL-6, IL-13, IL-15, G-CSF, GM-CSF, Eotaxin, RANTES, MCP-1, MIP-1 α ไม่พบความแตกต่างระหว่างใน plasma และ PRP



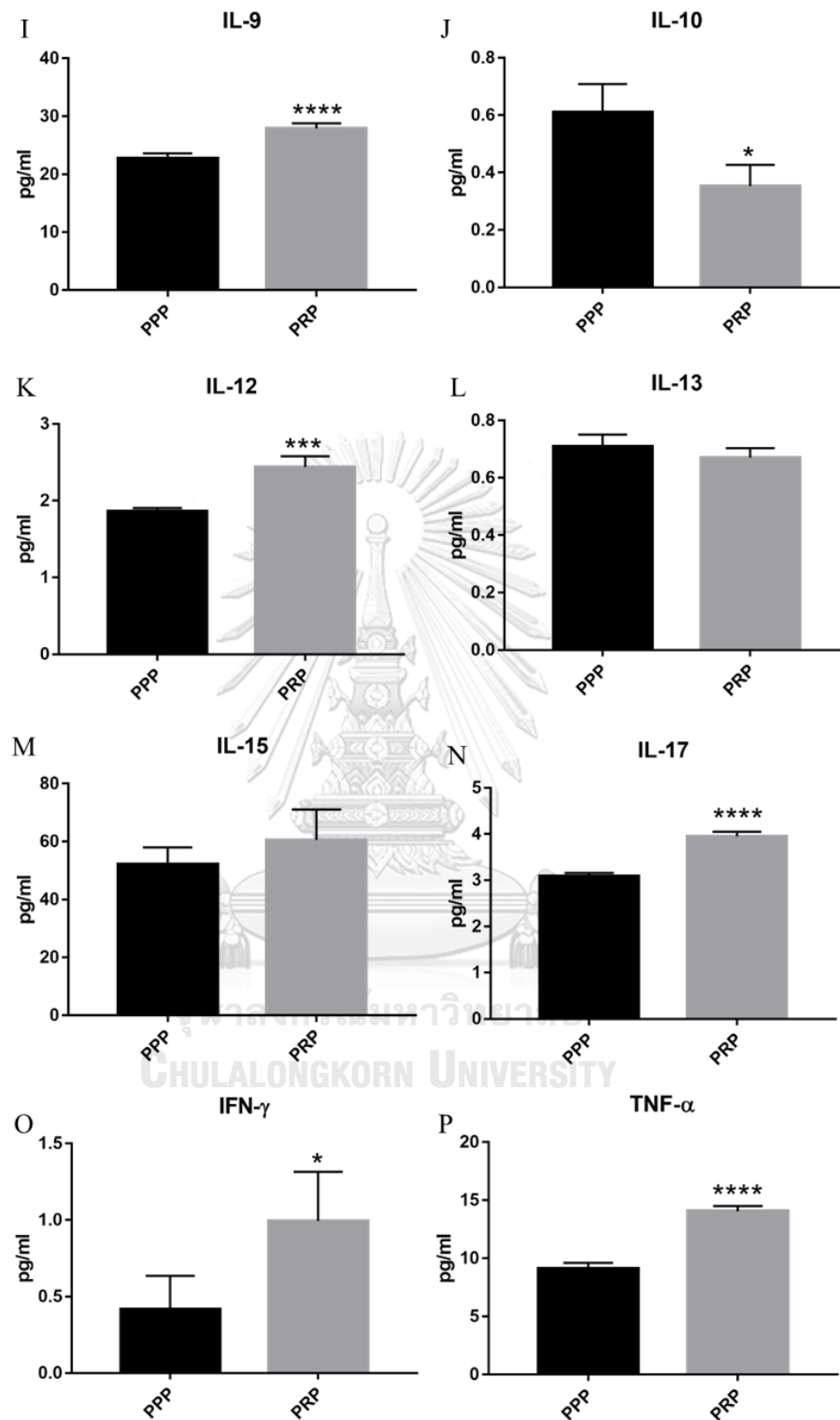
รูปที่ 2 แผนภูมิแสดงปริมาณ cytokines และ growth factors ใน Plasma และ PRP ที่มีค่าเฉลี่ยน้อยกว่า 1 pg/ml (A) และ 1-10 pg/ml (B)



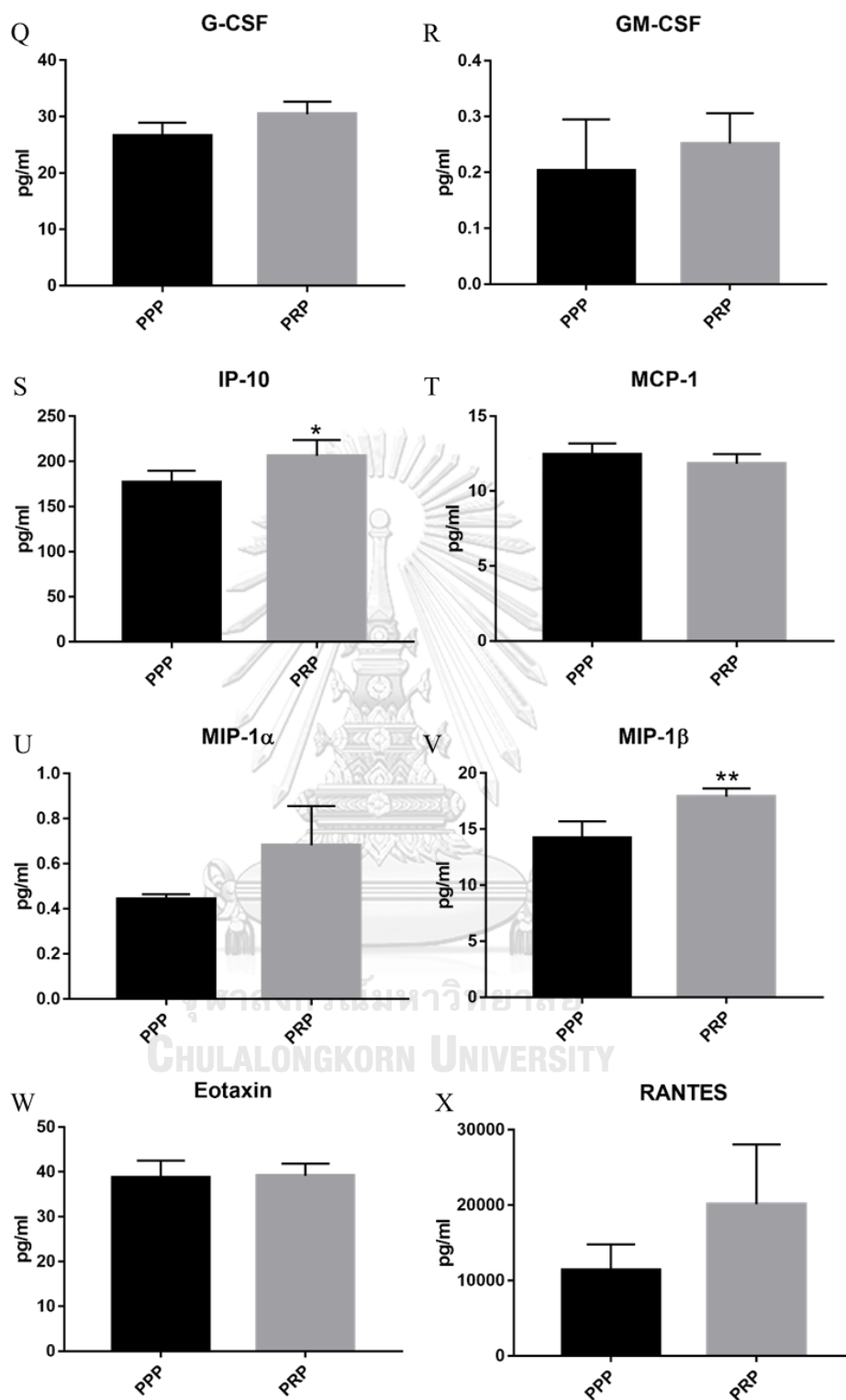
รูปที่ 2 (cont.) แผนภูมิแสดงปริมาณ cytokines และ growth factors ใน Plasma และ PRP ที่มีค่าเฉลี่ย 10-100 pg/ml (C) และมากกว่า 100 pg/ml (D)



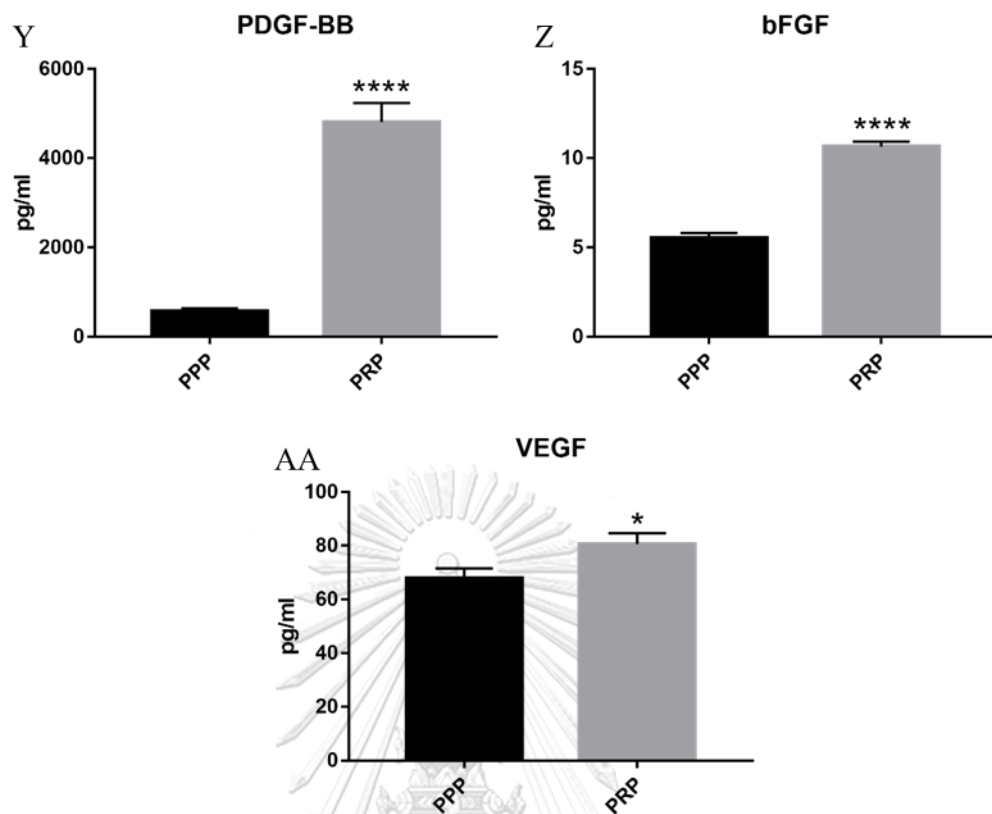
รูปที่ 3 แผนภูมิเปรียบเทียบปริมาณ IL-1 (A) IL-1ra (B) IL-2 (C) IL-4 (D) IL-5 (E) IL-6 (F) IL-7 (G) และ IL-8 (H) ใน Plasma และ PRP (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P = 0.000$)



รูปที่ 3 (cont.) แผนภูมิเปรียบเทียบปริมาณ IL-9 (I) IL-10 (J) IL-12 (K) IL-13 (L) IL-15 (M) IL-17 (N) IFN- γ (O) และ TNF- α (P) ใน Plasma และ PRP (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, ** $P = 0.000$)



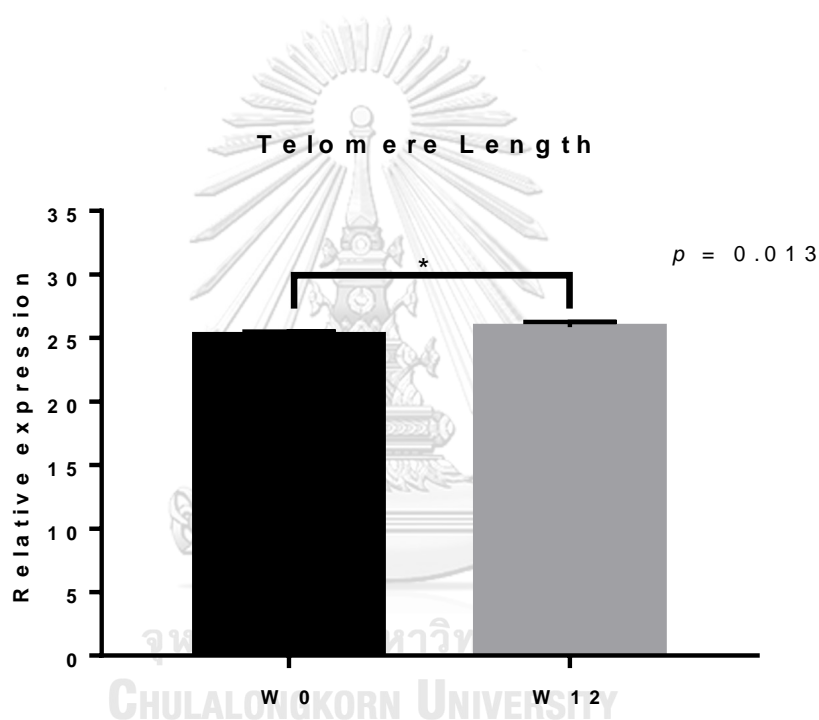
รูปที่ 3 (cont.) แผนภูมิเปรียบเทียบปริมาณ G-CSF (Q) GM-CSF (R) IP-10 (S) MCP-1 (T) MIP-1 α (U) MIP-1 β (V) Eotaxin (W) และ RANTES (X) ใน Plasma และ PRP (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, ** $P = 0.000$)



รูปที่ 3 (cont.) แผนภูมิเปรียบเทียบปริมาณ PDGF-BB (Y) bFGF (Z) และ VEGF (AA) ใน Plasma และ PRP (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P = 0.000$)

4.3 การศึกษา relative telomere length ในผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม

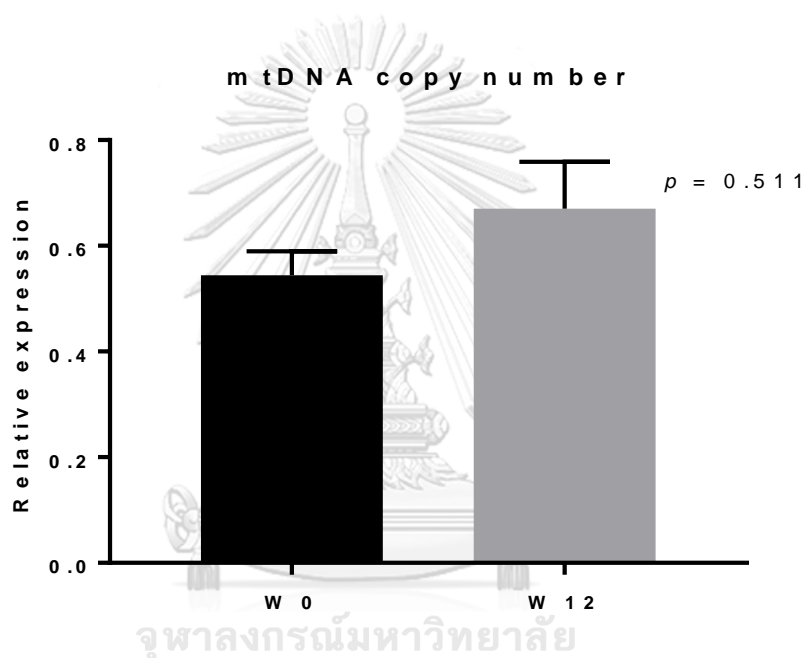
การศึกษา relative telomere length จาก peripheral blood leukocyte ของผู้ป่วยโรคข้อเสื่อม ก่อนและหลังฉีด PRP ข้อเข่าและวิเคราะห์ด้วยค่าสถิติ Pair T-Test พบว่าค่าเฉลี่ยของ relative telomere length ในผู้ป่วยก่อนได้รับการฉีด PRP และหลังได้รับการฉีด PRP เท่ากับ 25.21 ± 0.29 และ 25.84 ± 0.42 ตามลำดับ โดยผลการเปรียบเทียบความแตกต่างของ relative telomere length ของผู้ป่วยโรคข้อเสื่อมก่อนและหลังฉีด PRP ข้อเข่าด้วยค่าสถิติ Pair T-Test พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P = 0.013$) ดังแสดงในรูปที่ 4



รูปที่ 4 กราฟเปรียบเทียบ relative telomere length จาก peripheral blood leukocyte ของผู้ป่วยโรคข้อเสื่อมก่อนและหลังฉีด PRP ข้อเข่า

4.4 การศึกษาจำนวน mtDNA copy number ในผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม

การศึกษาจำนวน mtDNA copy number จาก peripheral blood leukocyte ของผู้ป่วยโรคข้อเสื่อมก่อนและหลังฉีด PRP ข้อเข่าและวิเคราะห์ด้วยค่าสถิติ Pair T-Test พบว่าค่าเฉลี่ยของจำนวน mtDNA copy number ในผู้ป่วยก่อนได้รับการฉีด PRP และหลังได้รับการฉีด PRP เท่ากับ 5.11 ± 1.10 และ 4.22 ± 0.74 ตามลำดับ โดยผลการเปรียบเทียบด้วยค่าสถิติ Pair T-Test พบว่าไม่มีความแตกต่างกันระหว่างก่อนและหลังฉีด ($P = 0.511$) ดังแสดงในรูปที่ 5

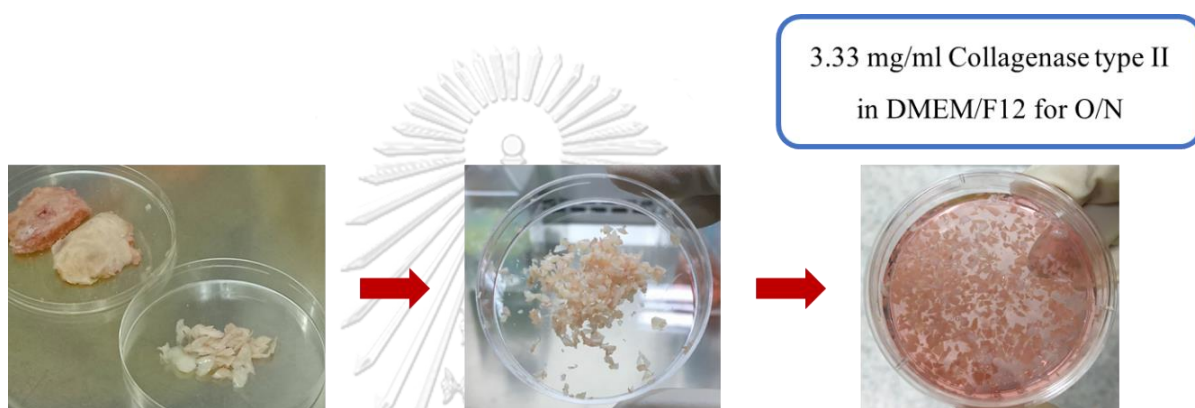


รูปที่ 5 กราฟเปรียบเทียบจำนวน mtDNA copy number จาก peripheral blood leukocyte ของผู้ป่วยโรคข้อเสื่อมก่อนและหลังฉีด PRP ข้อเข่า

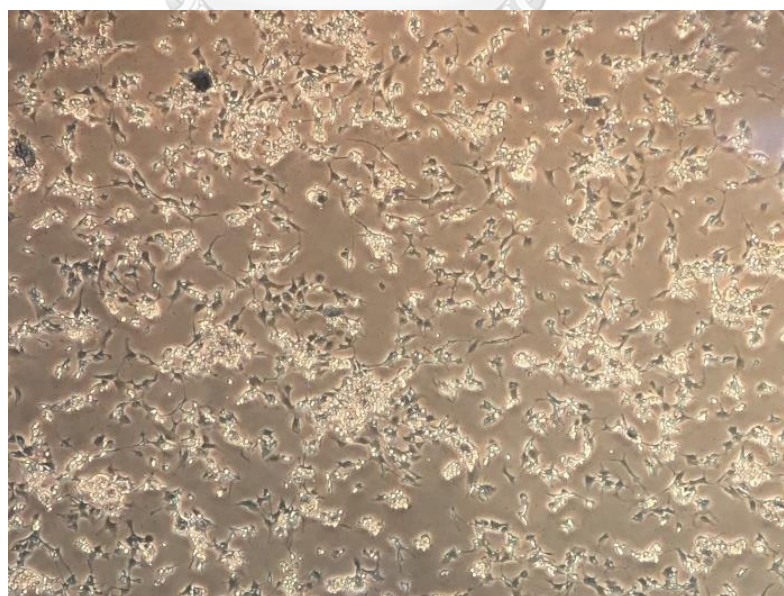
4.5 การแยกเซลล์ chondrocytes และ synoviocytes จาก cartilage และ synovial tissue ของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่เข้ารับการผ่าตัดเปลี่ยนข้อเข่า

4.5.1 การแยกเซลล์ chondrocytes จาก cartilage ของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่เข้ารับการผ่าตัดเปลี่ยนข้อเข่า

การแยกเซลล์ chondrocytes ในการศึกษาครั้งนี้ใช้วิธีการตัดย่อยด้วยเอนไซม์ 2 ชนิด คือ Pronase และ Collagenase type II โดยจะใช้เวลาประมาณ 2-3 สัปดาห์ในการเลี้ยง passage 0 ให้ได้ปริมาณ 80% confluent ใน flask ชนิด T75 ดังแสดงในรูปที่ 6 และ 7



รูปที่ 6 การแยกเซลล์ OA chondrocytes จาก cartilage



รูปที่ 7 เซลล์ OA chondrocytes ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ใน flask ชนิด T75

4.5.2 การแยกเซลล์ synoviocytes จาก synovial tissue ของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่เข้ารับการผ่าตัดเปลี่ยนข้อเข่า

การแยกเซลล์ synoviocytes ใช้การตัดย่อยด้วยเอนไซม์ 2 ชนิด คือ Dnase และ Collagenase โดยจะใช้เวลาประมาณ 1-2 สัปดาห์ในการเลี้ยง passage 0 ให้ได้ปริมาณ 80% confluent ใน flask ชนิด T75 ดังแสดงในรูปที่ 8 และ 9



รูปที่ 8 การแยกเซลล์ OA fibroblast-like synoviocytes จาก synovial tissue

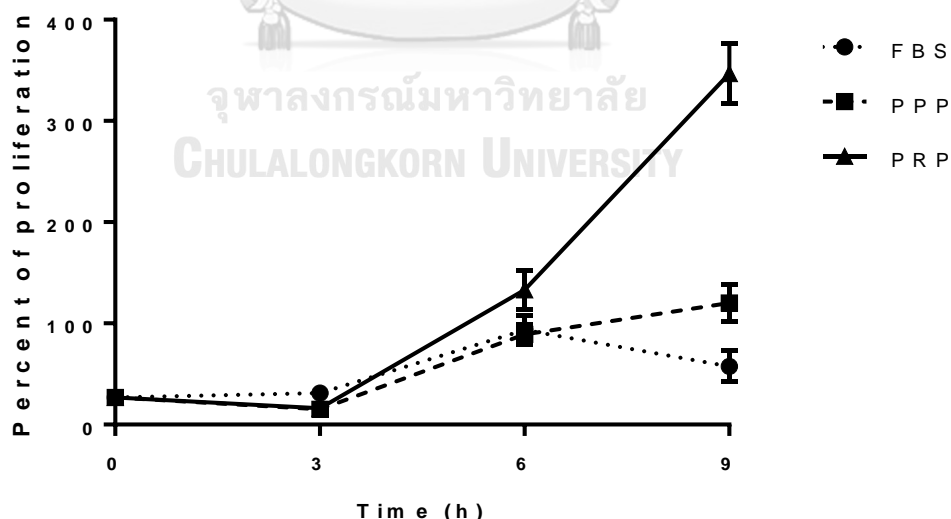


รูปที่ 9 เซลล์ OA fibroblast-like synoviocytes ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ใน flask ชนิด T75

4.6 การศึกษาผลของพลาสมาเกล็ดเลือดเข้มข้นต่ออัตราการเจริญเพิ่มจำนวน (cell proliferation) ของ chondrocytes และ synoviocytes ที่แยกได้จากผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม

4.5.1 การศึกษาผลของพลาสมาเกล็ดเลือดเข้มข้นต่ออัตราการเจริญเพิ่มจำนวน (cell proliferation) ของ chondrocytes ที่แยกได้จากผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม

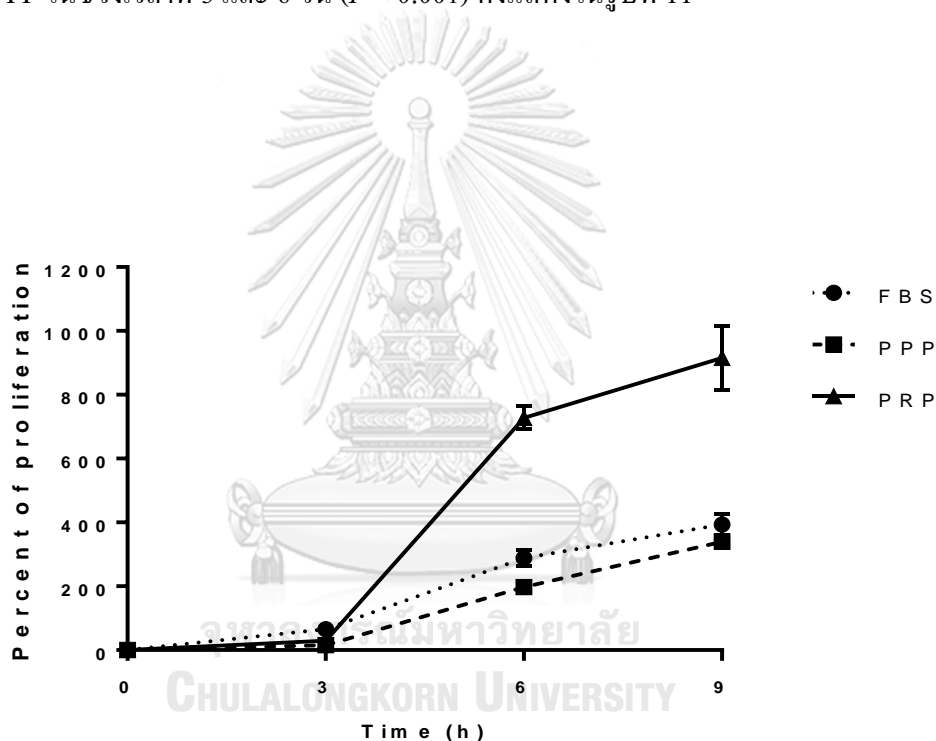
การศึกษาผลของ PRP ต่อการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์ chondrocytes ที่แยกได้จากผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมและวิเคราะห์ด้วยค่าสถิติ One-Way ANOVA โดยเปรียบเทียบกับเซลล์กลุ่มที่ได้รับ FBS และ PPP พบว่า ในช่วงเวลา 3 วันแรกกลุ่มที่ได้รับ PRP มีการเจริญเพิ่มจำนวนน้อยกว่ากลุ่มที่ได้รับ FBS ($P < 0.001$) และไม่พบการเจริญเพิ่มจำนวนที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างเซลล์กลุ่มที่ได้รับ PRP และ PPP แต่ในช่วงเวลาที่ 6 และ 9 วันพบว่า เซลล์ที่ได้รับ PRP มีการเจริญเพิ่มจำนวนมากกว่าเซลล์ที่ได้รับ PPP และ FBS อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.001$) และเมื่อเปรียบเทียบผลการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์ที่ได้รับ FBS และ PPP พบว่าที่ช่วงเวลา 3 และ 9 วัน เซลล์ที่ได้รับ FBS มีการเจริญเพิ่มจำนวนมากกว่าเซลล์ที่ได้รับ PPP ($P < 0.001$) แต่ที่เวลา 3 วันแรกไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างทั้ง 2 กลุ่มนี้ดังแสดงในรูปที่ 10



รูปที่ 10 ร้อยละการเจริญเพิ่มจำนวนเซลล์ (cell proliferation percentage) ของ OA chondrocytes เปรียบเทียบ เวลา 0, 3, 6 และ 9 วัน

4.5.2 การศึกษาผลของพลาสมาเกล็ดเลือดเข้มข้นต่ออัตราการเจริญเติบโต (cell proliferation) ของ synoviocytes ที่แยกได้จากผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม

การศึกษาผลของ PRP ต่อการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์ synoviocytes และวิเคราะห์ด้วยค่าสถิติ One-Way ANOVA พบว่าเซลล์ที่ได้รับ PRP มีการเจริญเพิ่มจำนวนมากกว่าเซลล์ที่ได้รับ PPP ในทุกช่วงเวลาที่ทำการวัด ($P = 0.018$, $P < 0.001$ และ $P < 0.001$ ตามลำดับ) และยังมีการเจริญเพิ่มจำนวนมากกว่าในกลุ่มที่ได้รับ FBS ($P < 0.001$) นอกจากนี้พบว่าเซลล์ synoviocytes กลุ่มที่ได้รับ FBS มีการเจริญเพิ่มจำนวนมากกว่าเซลล์กลุ่มที่ได้รับ PPP ในช่วงเวลาที่ 3 และ 6 วัน ($P < 0.001$) ดังแสดงในรูปที่ 11

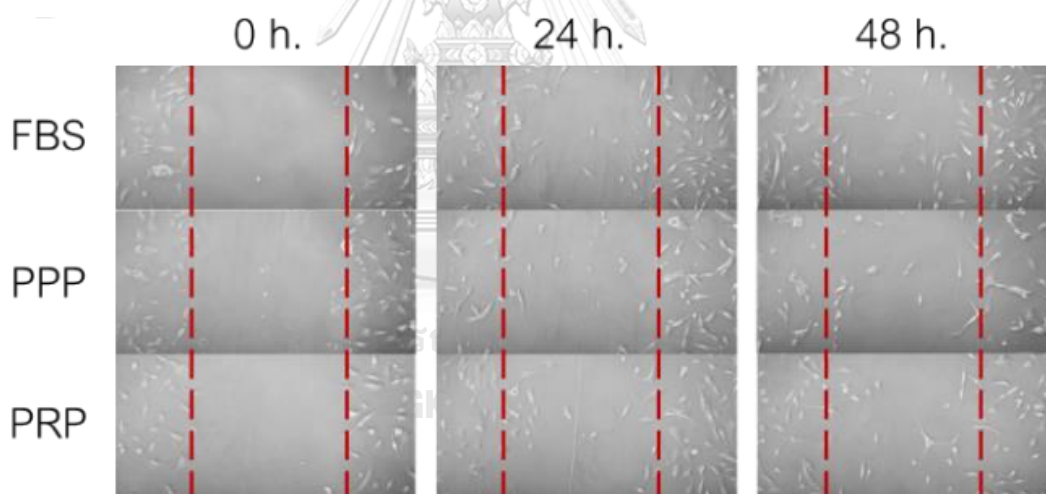


รูปที่ 11 ร้อยละการเจริญเพิ่มจำนวนเซลล์ (cell proliferation percentage) ของ OA fibroblast-like synoviocytes เปรียบเทียบ เวลา 0, 3, 6 และ 9 วัน

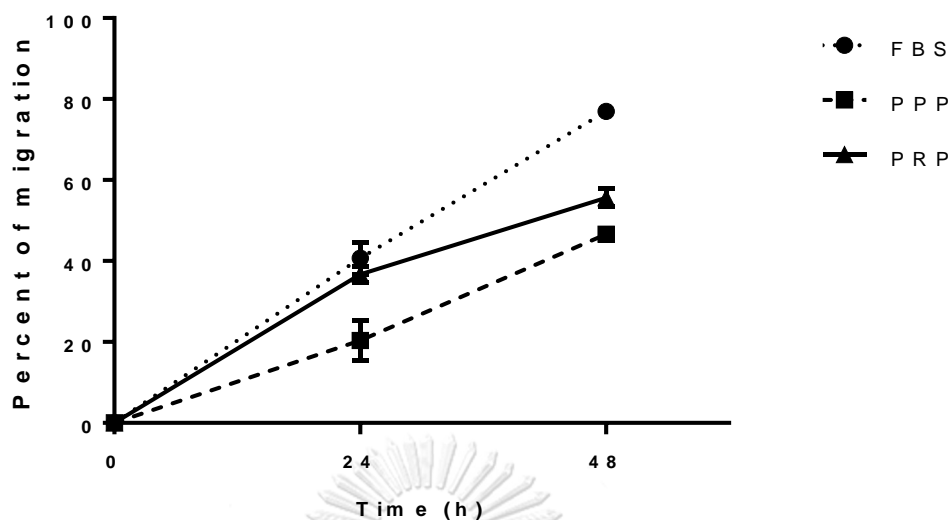
4.6 การศึกษาผลของพลาสมาเกล็ดเลือดเข้มข้นต่ออัตราการเจริญเคลื่อนเซลล์ (cell migration) ของ chondrocytes และ synoviocytes ที่แยกได้จากผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม

4.6.1 การศึกษาผลของพลาสมาเกล็ดเลือดเข้มข้นต่ออัตราการเจริญเคลื่อนเซลล์ (cell migration) ของ chondrocytes ที่แยกได้จากผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม

การศึกษากการเจริญเคลื่อนเซลล์ในเซลล์ chondrocytes และวิเคราะห์ด้วยค่าสถิติ One-Way ANOVA พบว่าที่ 24 ชั่วโมง เซลล์กลุ่มที่ได้รับ FBS มีการเจริญเคลื่อนตัวมากกว่าเซลล์ที่ได้รับ PPP ($P = 0.021$) แต่ไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มที่ได้รับ PRP เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ FBS หรือ PPP สำหรับที่ 48 ชั่วโมงพบว่าเซลล์ทุกกลุ่มการทดลองมีการเจริญเคลื่อนตัวแตกต่างกัน โดยเซลล์กลุ่มที่ได้รับ FBS มีการเจริญเคลื่อนตัวมากกว่าเซลล์ที่ได้รับ PPP และ PRP ($P < 0.001$) และเซลล์ที่ได้รับ PRP มีการเจริญเคลื่อนตัวมากกว่าเซลล์ที่ได้รับ PPP ($P = 0.027$) ดังแสดงในรูปที่ 12 และ 13



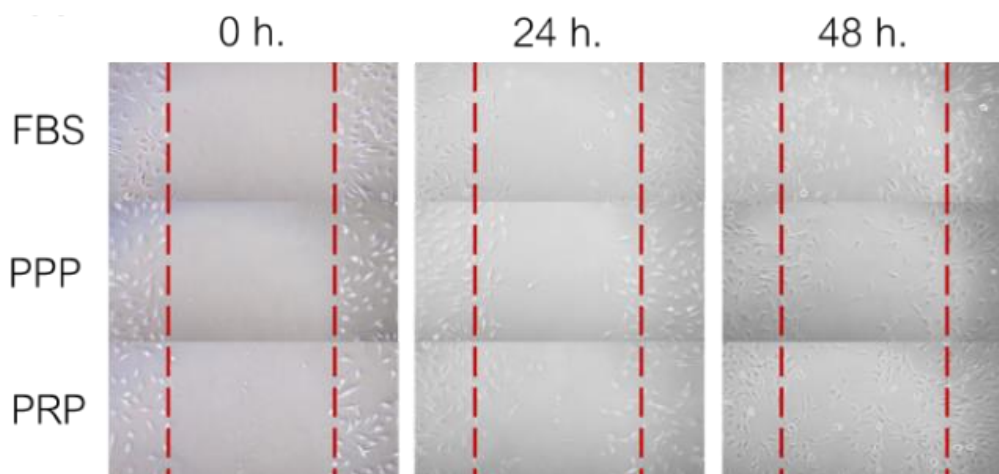
รูปที่ 12 การเจริญเคลื่อนเซลล์ (cell migration percentage) ของ OA chondrocytes ที่เวลา 0, 24 และ 48 ชั่วโมง



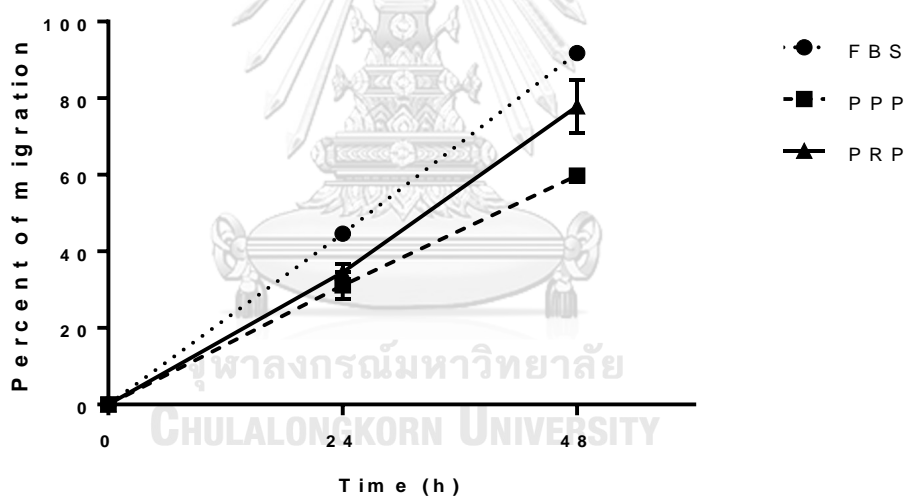
รูปที่ 13 ร้อยละการเจริญเคลื่อนเซลล์ (cell migration percentage) ของ OA chondrocytes
เปรียบเทียบ เวลา 0, 24 และ 48 ชั่วโมง

4.6.2 การศึกษาผลของพลาสมาเกล็ดเลือดเข้มข้นต่ออัตราการเจริญเคลื่อนเซลล์ (cell migration) ของ synoviocytes ที่แยกได้จากผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม

การศึกษากการเจริญเคลื่อนเซลล์ในเซลล์ synoviocytes และวิเคราะห์ด้วยค่าสถิติ One-Way ANOVA พบว่าที่ 24 ชั่วโมง กลุ่มที่ได้รับ FBS มีการเจริญเคลื่อนตัวมากกว่าเซลล์ที่ได้รับ PPP และ PRP ($P = 0.012$ และ 0.001 ตามลำดับ) แต่ในกลุ่มที่ได้รับ PPP และ PRP ไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ สำหรับที่ 48 ชั่วโมงเซลล์กลุ่มที่ได้รับ FBS มีการเจริญเคลื่อนตัวมากกว่าเซลล์ที่ได้รับ PPP และ PRP เช่นเดียวกับที่ 24 ชั่วโมง ($P < 0.001$) และพบว่าเซลล์ที่ได้รับ PRP มีการเจริญเคลื่อนตัวมากกว่าเซลล์ที่ได้รับ PPP ($P = 0.035$) ดังแสดงในรูปที่ 14 และ 15



รูปที่ 14 การเจริญเคลื่อนเซลล์ (cell migration percentage) ของ OA fibroblast-like synoviocytes ที่ เวลา 0, 24 และ 48 ชั่วโมง



รูปที่ 15 ร้อยละการเจริญเคลื่อนเซลล์ (cell migration percentage) ของ OA fibroblast-like synoviocytes เปรียบเทียบ เวลา 0, 24 และ 48 ชั่วโมง

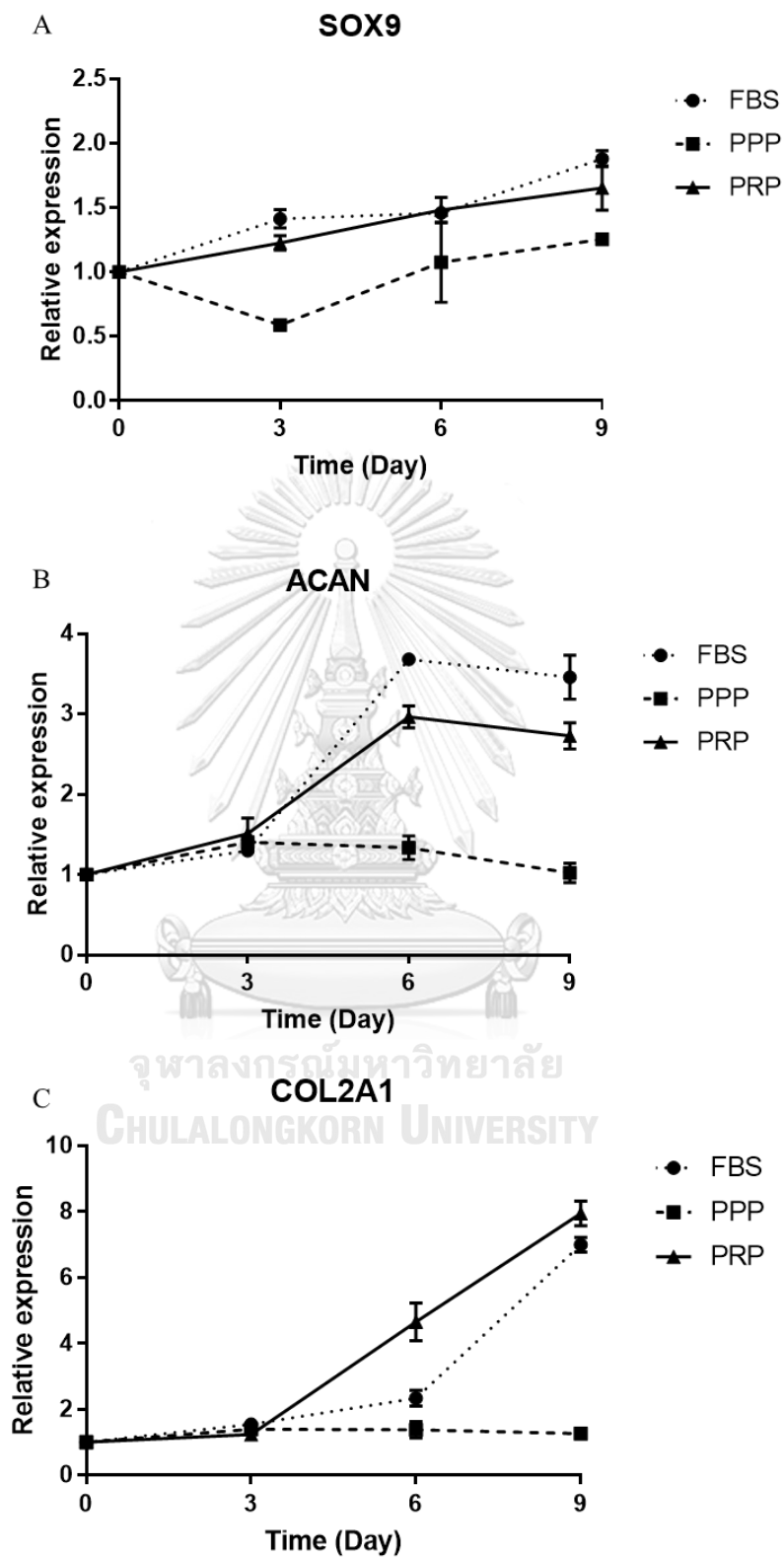
4.7 การศึกษาผลของ PRP ต่อการแสดงออกของยีนใน chondrocytes และ synoviocytes ที่แยกได้จากผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม

4.7.1 การศึกษาผลของ PRP ต่อการแสดงออกของยีน SOX9 Aggrecan และ COL2A1 ใน chondrocytes ที่แยกได้จากผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม

เมื่อเลี้ยงเซลล์ chondrocytes passage 2-3 ในอาหารเลี้ยงทั้ง 3 ชนิดและเก็บ mRNA ที่ 3, 6 และ 9 วัน จากนั้นตรวจวัดปริมาณการแสดงออกของยีน SOX9 Aggrecan และ COL2A1 ด้วย qRT-PCR โดยใช้ GAPDH เป็นตัวเทียบ และใช้ค่าสถิติ One-Way ANOVA ในการวิเคราะห์ผลการศึกษาที่ได้

การแสดงออกของ SOX9 พบว่าในวันที่ 3 เซลล์เลี้ยงในอาหารเลี้ยงที่ผสม PPP มีปริมาณ SOX9 น้อยกว่าเซลล์ที่เลี้ยงใน FBS และ PRP อย่างมีนัยสำคัญ ที่ 6 วัน พบว่าเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารทั้ง 3 ชนิดไม่มีการแสดงออกของ SOX9 ที่แตกต่างกัน และในวันที่ 9 พบว่าเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงที่ผสม FBS มีการแสดงออกของ SOX9 มากกว่าเซลล์ที่เลี้ยงใน PPP และ PRP และเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงที่ผสม PRP การแสดงออกของ SOX9 มากกว่าเซลล์ที่เลี้ยงใน PPP อย่างมีนัยสำคัญ

สำหรับ aggrecan และ COL2A1 พบว่าเซลล์มีการแสดงออกของยีนทั้ง 2 ชนิดเพิ่มมากขึ้น โดยในวันที่ 3 ไม่พบการแสดงออกที่แตกต่างกันในทั้ง 3 กลุ่ม แต่ในวันที่ 6 และ 9 พบว่าเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงที่ผสม PRP มีการแสดงออกของทั้ง aggrecan และ COL2A1 มากกว่ากลุ่มที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงที่ผสม FBS และ PPP และกลุ่มที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงที่ผสม FBS มีการแสดงออกของ aggrecan และ COL2A1 มากกว่ากลุ่มที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงที่ผสม PPP อย่างมีนัยสำคัญดังแสดงในรูปที่ 16



รูปที่ 16 การแสดงออกของ SOX9 (A) aggrecan (B) และ COL2A1 (C) ใน OA chondrocyte

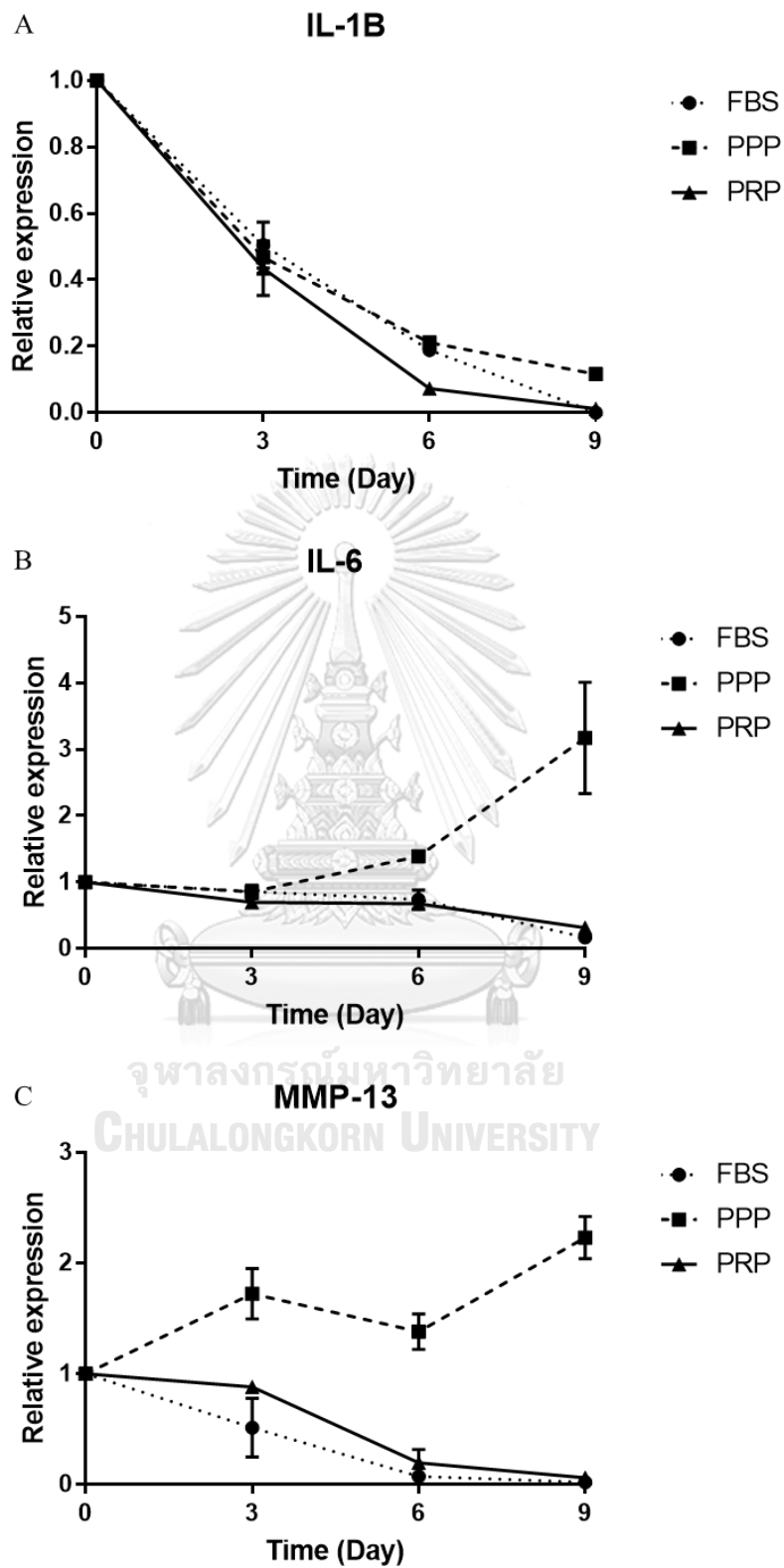
4.7.2 การศึกษาผลของ PRP ต่อการแสดงออกของยีน IL-1B IL-6 และ MMP-13 ใน synoviocytes ที่แยกได้จากผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม

เซลล์ synoviocytes passage 2-3 ที่ในอาหารเลี้ยงทั้ง 3 ชนิดถูกเก็บเก็บ mRNA ที่ 3, 6 และ 9 วัน และนำมาตรวจวัดปริมาณการแสดงออกของยีน IL-1B IL-6 และ MMP-13 ด้วย qRT-PCR โดยใช้ GAPDH เป็นตัวเทียบ และใช้ค่าสถิติ One-Way ANOVA ในการวิเคราะห์ ผลการศึกษาที่ได้เช่นเดียวกับการศึกษาใน chondrocytes พบว่า

การแสดงออกของ IL-1B ลดลงในทั้ง 3 กลุ่ม แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติใน ทั้ง 3 ช่วงเวลาที่ทำการเก็บข้อมูล แต่ใน IL-6 และ MMP-13 พบว่า ในเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงที่ผสม PPP มีการแสดงออกมากขึ้น แต่ในเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงที่ผสม PRP และ FBS มีการแสดงออกที่ลดลง

โดยการแสดงออกของ IL-6 ในวันที่ 3 เซลล์ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงที่ผสม FBS และ PPP มีการแสดงออกมากกว่าเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงที่ผสม PRP อย่างมีนัยสำคัญ แต่ในวันที่ 6 และ 9 พบว่ามีการแสดงออกของของ IL-6 มากกว่าในเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงที่ผสม PRP และ FBS อย่างมีนัยสำคัญ

ในการศึกษา MMP-13 พบว่าในวันที่ 3 และ 6 เซลล์ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงที่ผสม PPP มีการแสดงออกของ MMP-13 มากที่สุด ตามมาด้วยเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงที่ผสม PRP และ FBS ตามลำดับ และทั้ง 3 กลุ่มมีการแสดงออกที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แต่ในวันที่ 9 พบว่าเซลล์ในกลุ่มที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงที่ผสม PRP และ FBS ไม่มีการแสดงออกของ MMP-13 ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ดังแสดงในรูปที่ 17

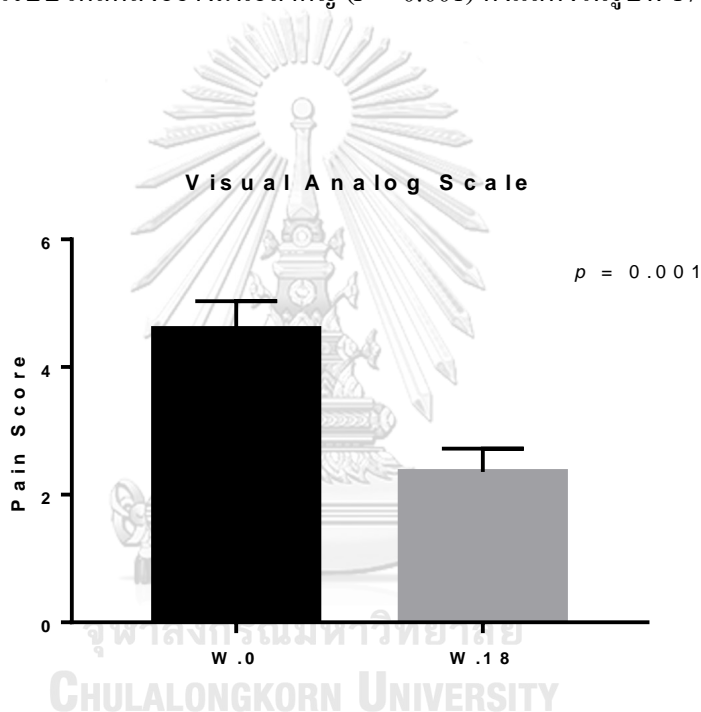


รูปที่ 17 การแสดงออกของ IL-1B (A) IL-6 (B) และ MMP-13 (C) ใน OA fibroblast-like synoviocytes เปรียบเทียบ เวลา 0, 3, 6 และ 9 วัน

4.8 การศึกษาระดับความเจ็บปวด สมรรถภาพทางกาย และความสามารถในการทำกิจกรรมของผู้ป่วยโรคข้อเสื่อมก่อนและหลังได้รับการฉีดพลาสมาเกล็ดเลือดเข้มข้นเข้าในข้อเข่า

4.8.1 การศึกษาผลของการฉีด PRP ข้อเข่าในผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมต่อระดับความเจ็บปวด

การศึกษาระดับความเจ็บปวดบริเวณข้อเข่าของผู้ป่วยทำการศึกษาโดยใช้ Visual Analog Scale (VAS) โดยวัดที่ก่อนฉีด และ 6 สัปดาห์หลังฉีดครบ 2 เข็ม (สัปดาห์ที่ 18) ก่อนฉีด PRP และหลังฉีด ผู้ป่วยมีระดับการปวดเฉลี่ย 4.60 ± 0.43 และ 2.36 ± 0.36 ตามลำดับ และเมื่อวิเคราะห์ด้วยค่าสถิติ Pair T-Test พบว่าหลังได้รับการฉีด PRP เข้าที่ข้อเข่า 2 ครั้ง ผู้ป่วยมีระดับความเจ็บปวดลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($P = 0.001$) ดังแสดงในรูปที่ 17



รูปที่ 18 กราฟเปรียบเทียบ Visual Analog Scale (VAS) ของผู้ป่วยก่อนและหลังได้รับการฉีด PRP

4.8.2 การศึกษาผลของการฉีด PRP ข้อเข่าในผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมต่อสมรรถภาพทางกาย การประเมินสมรรถภาพทางกายของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมทำทั้งหมด 3 วิธี คือ Sit to stand test (STS), Time up and go test (TUG) และ 3-minute walk test (3 MWT) ผลการประเมินแสดงในตารางที่ 3

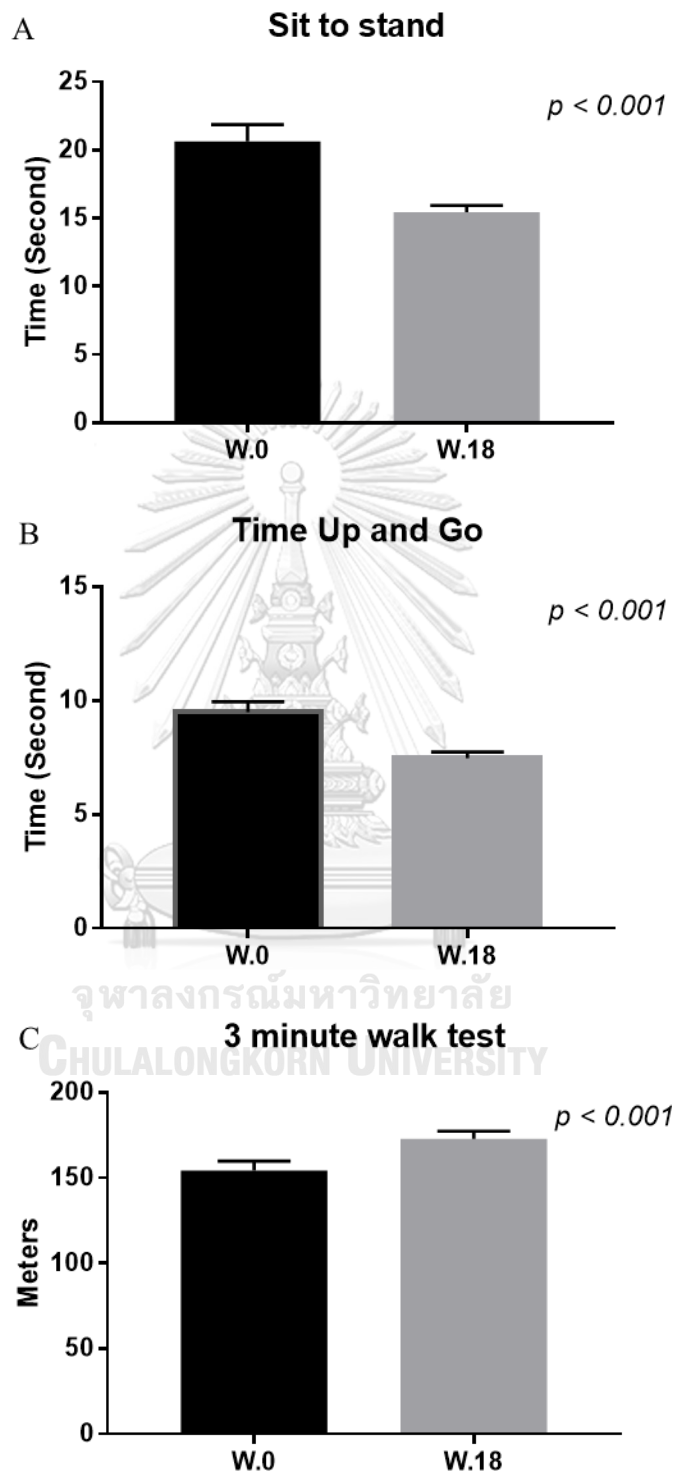
ตารางที่ 3 การประเมินสมรรถภาพทางกายของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม

Time Point	Sit to Stand (วินาที)	Time Up and Go (วินาที)	3 min Walk Test (เมตร)
Baseline	20.66±1.23	9.49±0.47	154.24±5.70
Week 18	15.45±0.50	7.47±0.27	172.84±4.59
<i>P</i> value	< 0.001	< 0.001	< 0.001

เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยค่าสถิติ Wilcoxon Signed Ranks test พบว่า ผลการประเมินสมรรถภาพโดยการจับเวลาในการลุกนั่งจากเก้าอี้ 5 ครั้ง (sit to stand test) ก่อนและหลังการฉีด PRP ผู้ป่วยใช้เวลาในการลุกนั่ง 20.66±1.23 และ 15.45 ± 0.50 วินาที ตามลำดับ ซึ่งผู้ป่วยใช้เวลาในการลุกนั่งจากเก้าอี้ย่น้อยลงอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.001$)

การประเมินจับเวลาที่ใช้ในการเดิน 3 เมตร จากนั้นหมุนตัวเดินกลับมาที่เดิม (time up and go test) ก่อนและหลังการฉีด PRP และวิเคราะห์ด้วยค่าสถิติ Pair T-Test พบว่า ผู้ป่วยใช้เวลาเดิน 9.49±0.47 และ 7.47±0.27 วินาที ตามลำดับ ซึ่งผู้ป่วยใช้เวลาในการเดินน้อยลงอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.001$)

การประเมินนับระยะทางที่เดินได้ภายใน 3 นาที (3-minute walk test) ก่อนและหลังการฉีด PRP และวิเคราะห์ด้วยค่าสถิติ Pair T-Test พบว่าผู้ป่วยสามารถเดินได้ระยะทาง 154.24±5.70 และ 172.84±4.59 เมตร ตามลำดับ ซึ่งผู้ป่วยใช้เดินได้เร็วขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.001$)



รูปที่ 19 กราฟเปรียบเทียบการประเมินสมรรถภาพทางกายของผู้ป่วยด้วย sit to stand test (A) time up and go test (B) และ 3-minute walk test (C) ก่อนและหลังได้รับการฉีด PRP

4.8.3 การศึกษาผลของการฉีด PRP ข้อเข่าในผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมต่อความสามารถในการทำกิจกรรม

การศึกษาผลของการฉีด PRP ข้อเข่าในผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมต่อความสามารถในการทำกิจกรรม ทำโดยใช้ WOMAC test โดยใช้แบบสอบถามทั้ง 3 หมวด คือ อาการปวดที่สัมพันธ์กับการทำกิจกรรม อาการข้อฝืดหรือติดที่สัมพันธ์กับการทำกิจกรรม และความสามารถในการทำกิจกรรมต่าง ๆ ผลการประเมินแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ผลการประเมินความสามารถในการทำกิจกรรมต่าง ๆ

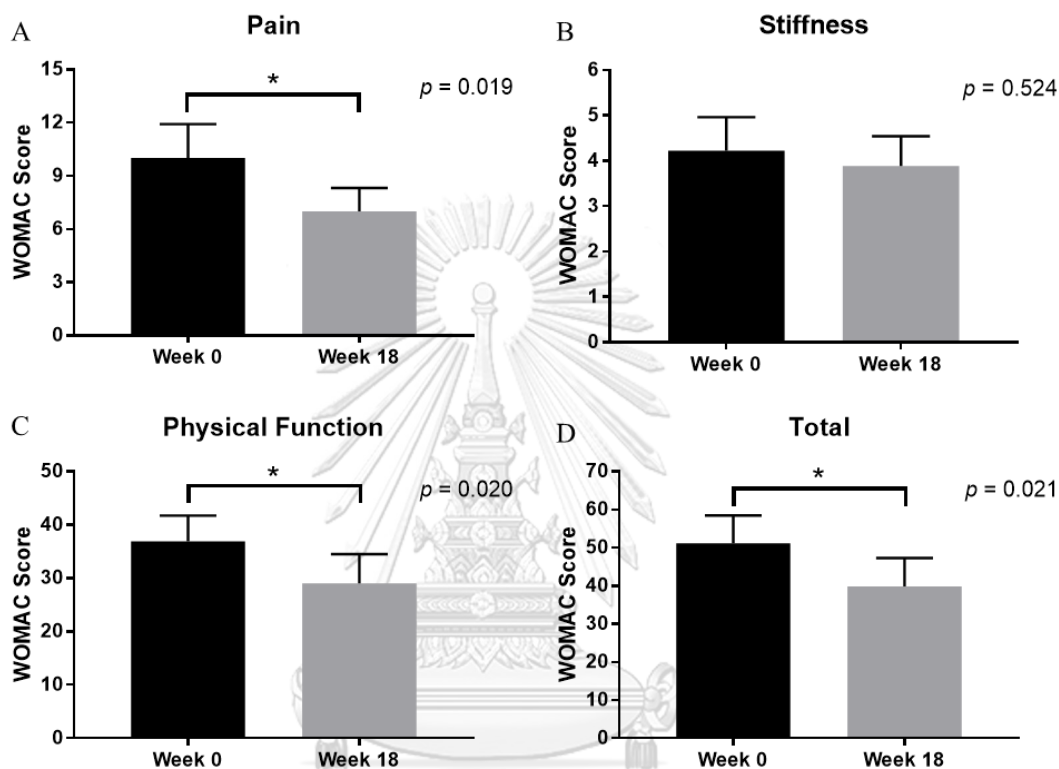
Time Point	WOMAC Index Scores			
	Pain	Stiffness	Physical Function	Total
Baseline	10.00 ± 1.92	4.22 ± 0.74	36.89 ± 4.84	51.11 ± 7.36
Week 18	7.00 ± 1.32	3.89 ± 0.66	29.00 ± 5.52	39.89 ± 7.38
Change	3.00 ± 1.03	0.33 ± 0.50	7.88 ± 2.71	11.22 ± 3.91
P value	0.019	0.524	0.020	0.021

เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยค่าสถิติ Pair T-Test พบว่า หลังการฉีด PRP ผู้ป่วยสามารถทำกิจกรรมต่าง ๆ ได้ดีขึ้น โดยคะแนนการประเมินอาการปวดที่สัมพันธ์กับการทำกิจกรรมก่อนและหลังการฉีดเท่ากับ 10.00 ± 1.92 และ 7.00 ± 1.32 ซึ่งแสดงถึงอาการปวดที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($P = 0.019$)

ในส่วนของอาการข้อฝืดหรือติดที่สัมพันธ์กับการทำกิจกรรมมีคะแนนก่อนและหลังฉีดเท่ากับ 4.22 ± 0.74 และ 3.89 ± 0.66 ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P = 0.524$)

คะแนนของความยากลำบากในการทำกิจกรรมต่าง ๆ ก่อนและหลังการฉีดเท่ากับ 36.89 ± 4.84 และ 29.00 ± 5.52 ตามลำดับ แสดงถึงความลำบากในการทำกิจกรรมต่าง ๆ ในชีวิตประจำวันของผู้ป่วยลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($P = 0.020$)

นอกจากนี้เมื่อทำการวิเคราะห์คะแนนโดยรวมพบวก่อนและหลังฉีดมีคะแนนเฉลี่ยเท่ากับ 51.11 ± 7.36 และ 39.89 ± 7.38 ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าหลังการฉีดโดยรวมแล้วผู้ป่วยสามารถทำกิจกรรมต่าง ๆ ในชีวิตประจำวันได้ดีขึ้น มีความเจ็บปวดและมีอาการข้อติดขัดน้อยลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.021$) ดังแสดงในรูปที่ 20



รูปที่ 20 กราฟเปรียบเทียบคะแนนความสามารถในการทำกิจกรรมต่าง ๆ ของผู้ป่วยด้วย WOMAC score หมวดหมู่ อาการปวดที่สัมพันธ์กับการทำกิจกรรม: pain (A) อาการข้อฝืดหรือติดที่สัมพันธ์กับการทำกิจกรรม: stiffness (B) ความยากลำบากในการทำกิจกรรมต่าง ๆ: physical function (C) และ คะแนนโดยรวม: total score (D) ก่อนและหลังได้รับการฉีด PRP

บทที่ 5

อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

การศึกษาก่อนหน้านี้ได้วิจัยผลของการใช้ PRP ในการรักษาโรคข้อเสื่อม ซึ่งส่วนมากพบว่า มีผลสนับสนุนต่อการรักษาโรค เนื่องจากคุณสมบัติในกระตุ้นการซ่อมแซมเนื้อเยื่อจาก cytokines และ growth factors หลายชนิดในเกล็ดเลือด (17, 34, 35) การศึกษานี้ได้ทำการปั่นแยก PRP จากเลือดของผู้ป่วยโรคข้อเสื่อมโดยทำการปั่น 2 รอบด้วยความเร็วในการปั่นที่ 1,000 และ 2,000 rpm ตามลำดับ และนำมากระตุ้นด้วย CaCl_2 เพื่อให้เกล็ดเลือดปลดปล่อย cytokines และ growth factors ออกมาก่อนจะนำไปฉีดให้กับผู้ป่วย หรือกระตุ้นด้วยการใช้เครื่องส่งความถี่สูง (sonicator) ด้วยคลื่นความถี่ 20 kHz เป็นเวลา 30 นาทีก่อนนำไปตรวจวัด หรือผสมกับอาหารเลี้ยงเซลล์ จำนวนเกล็ดเลือดที่ตรวจนับได้จาก PRP ที่เตรียมจากวิธีการนี้มีปริมาณมากกว่าในเลือดเกือบ 2 เท่า ซึ่งเมื่อเทียบกับการศึกษาของ Perez และคณะในปี 2014 ที่ใช้วิธีการปั่นแยกเกล็ดเลือด 2 ครั้ง และใช้ความเร็วในการปั่นเท่ากัน พบว่าสามารถปั่นแยกเกล็ดเลือดได้เพิ่มขึ้น 5 เท่า (36) จำนวนเกล็ดเลือดใน PRP ที่ได้จากการปั่นในการศึกษานี้แตกต่างกับการศึกษาก่อนหน้าอาจเกิดได้จากหลายสาเหตุ เช่น จำนวนเกล็ดเลือดพื้นฐานของผู้ป่วยน้อยกว่า ปริมาณพลาสมามากกว่า และนอกจากนี้ยังพบว่าบริเวณ buffy coat มีเกล็ดเลือดตกค้างอยู่ และไม่สามารถเก็บขึ้นมาได้เนื่องจากจะทำให้มีการปนเปื้อนของเม็ดเลือดแดง และเม็ดเลือดขาวมากขึ้น ซึ่งควรพัฒนาเทคนิควิธีการในการเก็บ plasma ที่ทำให้สามารถเก็บ PRP ได้อย่างมีประสิทธิภาพมากกว่านี้

จากการตรวจนับจำนวนเกล็ดเลือดในผู้ป่วยโรคข้อเสื่อมแต่ละรายพบว่า ปริมาณเกล็ดเลือดใน PRP ของผู้ป่วยแต่ละรายมีความแตกต่างกัน ซึ่งอาจเกิดได้จากหลายปัจจัย เช่น เพศ อายุ ภาวะทางสุขภาพ และวิถีชีวิต เป็นต้น โดยจำนวนเกล็ดเลือดมีผลต่อปริมาณ cytokines และ growth factors ด้วย (37) ซึ่งจากการวิเคราะห์ผลทางสถิติยังพบว่าจำนวนเกล็ดเลือดมีความสัมพันธ์กับอายุของผู้ป่วยด้วย โดยผู้ป่วยที่มีอายุมากมีเกล็ดเลือดน้อยลงอย่างมีนัยสำคัญ สอดคล้องกับการศึกษานับจำนวนเกล็ดเลือดในประชากรชาวฝรั่งเศส อายุ 16 - 60 ปี พบว่าจำนวนเกล็ดเลือดน้อยลงเมื่อมีอายุมากขึ้น (38) ซึ่งเกิดเนื่องจากเมื่ออายุเพิ่มขึ้น การทำงานของเซลล์ในระบบเลือดทั้งเม็ดเลือด และเซลล์หลอดเลือดจะลดลง และยังมีการศึกษาที่พบว่าเมื่อผู้ป่วยมีอายุมากขึ้นการรักษาด้วยเกล็ดเลือดได้ผลสำเร็จน้อยลง (39)

เมื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณ cytokines และ growth factors ทั้ง 27 ชนิดด้วย Bio-Plex Pro™ Human Cytokine 27-plex Assay พบว่า cytokines 15 ชนิดที่ตรวจพบปริมาณสูงกว่าใน PRP มากกว่าในพลาสมา อย่างมีนัยสำคัญ ได้แก่ IL-1 β , IL-2, IL-5, IL-7, IL-8, IL-9, IL-12, IL-17, INF- γ , TNF- α , IP-10, MIP-1 β , bFGF, VEGF และ PDGF-BB ซึ่งส่วนใหญ่จัดอยู่ในกลุ่ม proinflammatory cytokines และ growth factors ที่กระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์และเนื้อเยื่อที่พบได้ใน granules ของเกล็ดเลือด มีเพียง IL-10 เท่านั้นที่พบใน PRP น้อยกว่าในพลาสมา โดยปริมาณ cytokines และ growth factors ที่วัดได้ใน PRP มีแนวโน้มใกล้เคียงกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่ทำการเปรียบเทียบปริมาณ cytokines และ growth factors ในเพศชายและหญิง (15) ปริมาณ cytokines ที่แตกต่างกันนี้อาจเนื่องมาจากความแตกต่างทางด้านอายุ เชื้อชาติ ภาวะทางสุขภาพ และวิถีชีวิตของกลุ่มประชากรซึ่งมาจากคนละพื้นที่ รวมถึงปริมาณเลือด และวิธีการปั่นแยก PRP ที่แตกต่างกัน ทั้งนี้ในเกล็ดเลือดยังมี cytokines และ growth factor อีกหลายชนิดที่ไม่ได้รวมอยู่ในชุดทดสอบที่ใช้ในการศึกษานี้ เช่น hepatocyte growth factor (HGF), transforming growth factor- β (TGF- β) และ insulin-like growth factor (IGF) เป็นต้น

นอกจากนี้เมื่อนำ plasma และ PRP มาทดลองในเซลล์ทดลองโดยผสมด้วยความเข้มข้น 10% ในอาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์กระดูกอ่อน และเซลล์เยื่อข้อ และนำมาศึกษาอัตราการเจริญเพิ่มจำนวนเซลล์ (proliferation) ด้วย MTT assay และการเคลื่อนที่ของเซลล์ (migration) ด้วย scratch assay พบว่า เซลล์ที่ได้รับ PRP มีการเจริญเพิ่มจำนวนและการเคลื่อนที่ของเซลล์สูงกว่าเซลล์ที่ได้รับพลาสมาอย่างมีนัยสำคัญ สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ที่พบว่า PRP มีความสามารถในการกระตุ้นการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์ทั้งในเซลล์เยื่อข้อ (30) และเซลล์กระดูกอ่อน (28) ซึ่งอาจเป็นผลมาจากปริมาณ growth factors และ cytokines ที่ถูกปลดปล่อยออกมาจาก granules ของเกล็ดเลือดที่มีคุณสมบัติในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์ เช่น PDGF, TGF- β , VEGF, bFGF, EGF, INF- γ และ TNF- α เป็นต้น (5) นอกจากนี้ยังพบว่าในการศึกษาการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์ที่ใช้เวลามากกว่าการศึกษาการเจริญเคลื่อนที่เซลล์พบความแตกต่างระหว่างเซลล์ที่ได้รับพลาสมา และ PRP มาก แสดงให้เห็นว่า PRP มีผลต่อการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์ในระยะยาวมากกว่าซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาทางคลินิกที่พบว่าการฉีด PRP เข้าข้อเข้าให้กับผู้ป่วยโรคข้อเสื่อมมากกว่า 1 ครั้งได้ผลดีกว่าการฉีดให้เพียงครั้งเดียวอย่างมีนัยสำคัญ (26)

การศึกษานี้ยังพบอีกว่าเซลล์เยื่อข้อมีอัตราการเจริญเคลื่อนตัวและการเจริญเพิ่มจำนวนมากกว่าเซลล์กระดูกอ่อน ซึ่งเป็นผลจากธรรมชาติของเซลล์เยื่อข้อที่มีลักษณะเป็น fibroblast-like โดยปกติเซลล์เยื่อข้อมีอัตราการเจริญเพิ่มจำนวนและอัตราการเคลื่อนตัวสูง รวมถึงลักษณะเยื่อข้อมีหลอดเลือดมาเลี้ยงจำนวนมากจึงเกิดกระบวนการเพิ่มจำนวนและการอักเสบได้ง่ายกว่า (7) แตกต่างจากเซลล์กระดูกอ่อนที่โดยธรรมชาติส่วนใหญ่มักอยู่ใน resting phase (G0) และไม่มีหลอดเลือดเข้าไปเลี้ยงในกระดูกอ่อน จึงมีอัตราการเจริญเพิ่มจำนวนและอัตราการเคลื่อนตัวต่ำกว่า (40) ส่งผลให้เมื่อนำมาเลี้ยงในหลอดทดลองเซลล์ทั้ง 2 ชนิดจึงมีอัตราการเจริญเคลื่อนตัวและการเจริญเพิ่มจำนวนที่แตกต่างกัน

การศึกษานี้ยังได้วิเคราะห์ผลของของ PRP ต่อการแสดงออกของยีน IL-1 β , IL-6 และ MMP-13 ในเซลล์เยื่อข้อ และการแสดงออกของยีน SOX9, aggrecan และ COL2A1 ในเซลล์กระดูกอ่อนด้วย การแสดงออกของ IL-1 β , IL-6 และ MMP-13 บ่งชี้ถึงการอักเสบและความเสื่อมของเซลล์เยื่อข้อ (41) และการแสดงออกของ SOX9, aggrecan และ COL2A1 บ่งชี้ถึงความสามารถในการเจริญเติบโตของเซลล์กระดูกอ่อน โดย SOX9 เป็นยีนที่แสดงออกมากในช่วงที่มีการเจริญพัฒนาของเซลล์ chondrocytes และเป็น transcription factor ถือเป็นตัวบ่งชี้ของเซลล์ chondrocytes ในส่วนของ aggrecan และ COL2A1 เป็นยีนที่แสดงออกในช่วงที่เซลล์มีการสร้าง extracellular matrix ซึ่งสามารถใช้เพื่อบ่งบอกความสมบูรณ์ของเซลล์กระดูกอ่อน (42)

เซลล์เยื่อข้อที่เลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสม PRP มีการแสดงออกของ IL-1 β , IL-6 และ MMP-13 น้อยกว่าเซลล์ที่เลี้ยงด้วยอาหารที่ผสมพลาสมา ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาเปรียบเทียบผลของการเลี้ยงเซลล์เยื่อข้อจากผู้ป่วยโรคข้อเสื่อมในอาหารที่ผสม PPP และ PRP พบว่าการแสดงออกของยีน IL-1 β , IL-8 ซึ่งเป็น pro-inflammatory cytokine ลดลง และการแสดงออกของ IL-10 ซึ่งเป็น anti-inflammatory cytokines เพิ่มขึ้น (33) ซึ่งในการศึกษาก่อนหน้าพบว่า IGF-1 และ PDGF-bb ใน PRP มีส่วนในการยับยั้งการทำงานของ PI3K/AKT pathway ซึ่งส่งผลให้มีการแสดงออกของ IL-1 β ลดลง (43)

ในส่วนของเซลล์กระดูกอ่อนที่เลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสม PRP พบว่ามีการแสดงออกของ SOX9, Aggrecan และ COL2A1 มากกว่าเซลล์ที่เลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสมพลาสมา ซึ่งในการศึกษาก่อนหน้าถึงความสัมพันธ์ของการแสดงออกของยีน SOX9, Aggrecan และ COL2A1 ต่อความรุนแรงของโรคข้อเข่าเสื่อมพบว่าเมื่อมีความรุนแรงของโรคเพิ่มขึ้น เซลล์จะมีการแสดงออก

ของยีนดังกล่าวข้างต้นลดลง (31, 32) และยังคงคล้องกับการศึกษาที่พบว่า PRP มีผลเพิ่มการแสดงออกของ COL2A1 ด้วย (28) แสดงถึงความสามารถของ PRP ในการฟื้นฟูความเสื่อมของเซลล์กระดูกอ่อนในผู้ป่วยโรคข้อเสื่อม ซึ่งกระบวนการที่ทำให้มีการแสดงออกของ SOX9, Aggrecan และ COL2A1 เพิ่มขึ้นอาจเกิดเนื่องจาก cytokines และ growth factor หลายชนิดที่พบในเกล็ดเลือด เช่น IL-1 β และ FGF สามารถกระตุ้นการทำงานของ MAP kinase pathway ซึ่งเป็น pathway ที่กระตุ้นการแสดงออกทั้ง SOX9, Aggrecan และ COL2A1 (44)

การศึกษาผลของการฉีด PRP เข้าข้อเข่าผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมพบว่าระดับความเจ็บปวดของผู้ป่วยลดลง และสมรรถภาพทางกายซึ่งประเมินโดย Sit to stand test (STS), Time up and go test (TUG) และ 3-minute walk test (3 MWT) ของผู้ป่วยดีขึ้นแต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งอาจเนื่องจากการฉีด PRP เข้าข้อเข่าไม่ได้มีผลทำให้กระดูกอ่อนผิวข้อของผู้ป่วยสร้างกลับมาได้สมบูรณ์ เป็นเพียงการทำให้เกล็ดเลือดเข้มข้นที่ถูกกระตุ้นปล่อย cytokines เพื่อกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์ที่ถูกทำลาย และลดการอักเสบซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้กระดูกอ่อนผิวข้อถูกทำลายมากขึ้น ซึ่งจำเป็นต้องใช้เวลาในการฟื้นฟูเซลล์ที่เสียหายไป และยังมีเล็อรอยโรคที่ไม่สามารถฟื้นฟูได้ทั้งหมดไว้ จึงทำให้ผลการประเมินในระยะสั้นไม่เห็นผลชัดเจนเพียงพอ แต่เมื่อทำการประเมินความสามารถในการใช้งานข้อด้วยแบบประเมิน WOMAX score พบว่าผู้ป่วยมีผลการประเมินโดยรวมดีขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ โดยมีอาการปวดลดลง และสามารถใช้งานข้อเข่าได้ดีขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ สำหรับอาการข้อติดขัดก็มีแนวโน้มลดลงแต่ไม่มีนัยสำคัญ ซึ่งสอดคล้องกับหลายงานวิจัยก่อนหน้านี้ซึ่งพบว่าการฉีด PRP เข้าข้อเข่าผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมมีผลให้ผู้ป่วยมีผลการประเมินด้วย WOMAC score ดีขึ้นเมื่อเทียบกับการฉีดด้วยน้ำเกลือเข้าข้อเข่า (27) หรือ hyaluronic acid เข้าข้อเข่า (45) แต่ด้วยจำนวนผู้ป่วยที่น้อยกว่า และระยะเวลาในการศึกษาที่สั้นกว่าอาจทำให้ผลการประเมินข้อติดขัดเห็นผลได้ไม่ชัดเจน ดังนั้นควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในผู้ป่วยโรคข้อเสื่อมในอนาคต ซึ่งการที่ผู้ป่วยมีการปวดที่ลดลงอย่างเห็นได้ชัดอาจเป็นผลมาจากการที่ PRP สามารถกระตุ้นการผลิต hyaluronic acid ในเซลล์เยื่อข้อได้เป็นอย่างดี (46) ทำให้มีสารหล่อลื่นในข้อเข่ามากขึ้น และลดอาการปวดเนื่องจากข้อติดขัดได้ ในกระบวนการลดอาการปวดยังมีการศึกษาที่พบอีกว่า PRP มีผลยับยั้งการทำงานของ serotonin receptor (5-HT receptor) (47) ซึ่งส่งผลให้ผู้ป่วยมีอาการปวดลดลง จึงควรทำการศึกษากลไกการตอบสนองต่อ PRP ของ pain receptor ต่าง ๆ เพิ่มเติมในอนาคต

นอกจากนี้เมื่อทำการศึกษาความยาว telomere ในเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยก่อนและหลังได้รับการฉีด PRP พบว่าหลังจากผู้ป่วยได้รับการฉีด PRP เข้าข้อเข่ามีความยาว telomere เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้าที่พบว่า ผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่มีระดับความเจ็บปวดมากมีความยาว telomere ในเม็ดเลือดขาวสั้นกว่าผู้ป่วยที่มีระดับความเจ็บปวดน้อย (48) และในผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่มีระดับความรุนแรงของโรคต่ำกว่ามีความยาว telomere ในเม็ดเลือดขาวยาวกว่าเช่นกัน (49) นอกจากนี้ยังพบว่าในผู้ป่วยที่มีผลการประเมินสมรรถภาพทางกายด้วย WOMAC score ต่ำมีความยาว telomere ยาวกว่าด้วย (50) โดยความยาวของ telomere ที่เพิ่มขึ้นอาจเกิดเนื่อง PRP มีความสามารถในการชักนำให้ stem cell มีการแบ่งตัวสร้างเซลล์ใหม่ (51) รวมถึงการอักเสบทำให้โดยรวมเซลล์ส่วนใหญ่เป็นเซลล์ที่มีความสมบูรณ์มากขึ้น และมีความยาว telomere เพิ่มขึ้น แต่ทั้งนี้ ในการศึกษาเป็นการศึกษาความยาว telomere ในเม็ดเลือดขาว ซึ่งอาจไม่ได้แสดงถึงผลของ PRP ต่อเซลล์ข้อเข่าโดยตรง จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมโดยเก็บเซลล์จาก synovial fluid ของผู้ป่วยที่ได้รับการฉีด PRP เข้าข้อเข่ามาตรวจวัดโดยตรง เพื่อให้ได้ทราบผลที่แน่ชัดมากขึ้น

การศึกษาทางคลินิกในผู้ป่วยนี้ยังเป็นเพียงการศึกษาระยะสั้น โดยใช้เวลาเพียงแค่ 18 สัปดาห์ในการเก็บข้อมูลผู้ป่วย และทำในผู้ป่วยทั้งหมด 30 รายเท่านั้น อีกทั้งเป็นการศึกษาในผู้ป่วยเพศหญิงทั้งหมด เนื่องการผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาโรคข้อเข่าเสื่อมในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย และมีคุณสมบัติตรงตามเกณฑ์เข้าร่วมการศึกษามีจำนวนผู้ชายน้อย ไม่สามารถนำข้อมูลมาใช้เปรียบเทียบได้ อีกทั้งในส่วนของการศึกษาทางคลินิกในครั้งนี้ยังเป็นการศึกษาที่ไม่มีกลุ่มควบคุมจึงอาจทำให้เห็นความแตกต่างได้ไม่ชัดเจนมากนัก เพื่อเป็นการยืนยันผลการศึกษา และประเมินประสิทธิภาพการใช้ PRP ในผู้ป่วยโรคข้อเสื่อมควรมีการศึกษาเพิ่มเติมโดยอาจจะเพิ่มระยะเวลาในการประเมิน เพิ่มจำนวนเข็มในการฉีด เพิ่มจำนวนอาสาสมัครในการศึกษา ทำการศึกษาโดยมีกลุ่ม placebo หรือกลุ่มคนปกติเป็นกลุ่มควบคุม หรืออาจทดลองใช้ PRP ร่วมกับสารหล่อลื่น หรือสารกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์ชนิดอื่น ๆ ได้

โดยสรุปการศึกษาคุณลักษณะและบทบาทของ PRP ในโรคข้อเสื่อม พบว่า PRP มีปริมาณ cytokines และ growth factors ที่มีผลการอักเสบ และกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์กระดูกอ่อนและเซลล์เยื่อข้อ โดยผลของ PRP ต่อการทดสอบทางห้องปฏิบัติการพบว่า เซลล์กระดูกอ่อนและเซลล์เยื่อข้อของผู้ป่วยโรคข้อเสื่อมที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสม PRP มีอัตราการเจริญเพิ่ม

จำนวนและอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสมพลาสมา ซึ่งอาจเป็นผลมาจากจำนวนเกล็ดเลือดที่อยู่ใน PRP มากกว่าพลาสมา ประมาณ 2 เท่า ทำให้ใน PRP มีปริมาณ growth factors และ cytokines มากกว่า รวมถึงการให้ PRP อย่างต่อเนื่องส่งผลให้เซลล์ทั้ง 2 ชนิดมีการเจริญเพิ่มจำนวนมากกว่าเซลล์ที่ได้รับพลาสมา อย่างเห็น ได้ชัด รวมถึงเมื่อทำการวัดการแสดงออกของยีน พบว่าเซลล์กระดูกอ่อนที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงที่ผสม PRP มีการแสดงออกยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญพัฒนาของเซลล์กระดูกอ่อน (SOX9, aggrecan และ COL2A1) มากกว่าในเซลล์ที่เลี้ยงในพลาสมา และเซลล์เยื่อข้อที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงที่ผสม PRP ก็มีการแสดงออกยีนประเภท proinflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6 และ MMP-13) ซึ่งบ่งชี้ถึงการอักเสบน้อยกว่าในเซลล์ที่เลี้ยงในพลาสมา และนอกจากนี้เมื่อทำการทดสอบทางคลินิกโดยการฉีด PRP เข้าข้อเข่าแล้วทำการประเมิน VAS score สมรรถภาพทางกาย พบว่ามีแนวโน้มเพิ่มขึ้น รวมถึงการประเมินด้วยชุดคำถาม WOMAC score ซึ่งมีความจำเพาะต่อการประเมินผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม พบว่าผู้ป่วยมีอาการดีขึ้นอย่างมีนัยสำคัญสอดคล้องกับการศึกษาทางห้องปฏิบัติการ

บรรณานุกรม

1. Hunter DJ, Bierma-Zeinstra S. Osteoarthritis. *Lancet*. 2019;393:1745–59.
2. Wallace IJ, Worthingtonb S, Felsonc DT, Jurmaind RD, Wrene KT, Maijanenf H, et al. Knee osteoarthritis has doubled in prevalence since the mid-20th century. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2017;114(35):9332–6.
3. Alves R, Grimalt R. A Review of Platelet-Rich Plasma: History, Biology, Mechanism of Action, and Classification. *Skin Appendage Disord*. 2018;4(1):18-24.
4. Wu PI-K, Diaz R, Borg-Stein J. Platelet-Rich Plasma. *Physical Medicine and Rehabilitation Clinics of North America*. 2016;27:825–53.
5. Amable PR, Carias RB, Teixeira MV, da Cruz Pacheco I, Correa do Amaral RJ, Granjeiro JM, et al. Platelet-rich plasma preparation for regenerative medicine: optimization and quantification of cytokines and growth factors. *Stem Cell Res Ther*. 2013;4(3):67.
6. วรรณานวก ส. โรคข้อเสื่อมอีกเสบ. ชีวิตวิทยาของกระดูก ชีวเคมีระดับเซลล์และโรคที่พบบ่อย. 2553.
7. Monemdjou R, Fahmi H, Kapoor M. Synovium in the pathophysiology of osteoarthritis. *Therapy*. 2010;7(6):8.
8. Michael JW, Schluter-Brust KU, Eysel P. The epidemiology, etiology, diagnosis, and treatment of osteoarthritis of the knee. *Dtsch Arztebl Int*. 2010;107(9):152-62.
9. Kellgren JH, Lawrence JS. Radiological assessment of osteo-arthritis. *Ann Rheum Dis*. 1957;16(4):494-502.
10. Gremmel T, Frelinger AL, 3rd, Michelson AD. Platelet Physiology. *Semin Thromb Hemost*. 2016;42(3):191-204.
11. Nurden AT. Platelets, inflammation and tissue regeneration. *Thromb Haemost*. 2011;105 Suppl 1:S13-33.
12. Zhu Y, Yuan M, Meng HY, Wang AY, Guo QY, Wang Y, et al. Basic science and clinical application of platelet-rich plasma for cartilage defects and osteoarthritis: a review. *Osteoarthritis Cartilage*. 2013;21(11):1627-37.
13. Dhurat R, Sukesh M. Principles and Methods of Preparation of Platelet-Rich Plasma: A Review and Author's Perspective. *Journal of Cutaneous and Aesthetic Surgery*. 2014;7(14):9.
14. Gato-Calvo L, Magalhaes J, Ruiz-Romero C, Blanco FJ, Burguera EF. Platelet-rich plasma

in osteoarthritis treatment: review of current evidence. *Ther Adv Chronic Dis*. 2019;10:2040622319825567.

15. Mussano F, Genova T, Munaron L, Petrillo S, Erovigni F, Carossa S. Cytokine, chemokine, and growth factor profile of platelet-rich plasma. *Platelets*. 2016;27(5):467-71.
16. Panda A, Jain M, Vanathi M, Velpandian T, Khokhar S, Dada T. Topical autologous platelet-rich plasma eyedrops for acute corneal chemical injury. *Cornea*. 2012;31(9):989-93.
17. Cole JP, Cole MA, Insalaco C, Cervelli V, Gentile P. Alopecia and platelet-derived therapies. *Stem Cell Investig*. 2017;4(88):88.
18. Ahmed M, Reffat SA, Hassan A, Eskander F. Platelet-Rich Plasma for the Treatment of Clean Diabetic Foot Ulcers. *Ann Vasc Surg*. 2017;38:206-11.
19. Sampson S, Gerhardt M, Mandelbaum B. Platelet rich plasma injection grafts for musculoskeletal injuries: a review. *Curr Rev Musculoskelet Med*. 2008;1:164-74.
20. Fukawa T, Yamaguchi S, Akatsu Y, Yamamoto Y, Akagi R, Sasho T. Safety and Efficacy of Intra-articular Injection of Platelet-Rich Plasma in Patients With Ankle Osteoarthritis. *Foot Ankle Int*. 2017;38(6):596-604.
21. Hall MP, Band PA, Meislin RJ, Jazrawi LM, Cardone DA. Platelet-rich plasma: current concepts and application in sports medicine. *J Am Acad Orthop Surg*. 2009;17(10):602-8.
22. Filardo G, Di Matteo B, Kon E, Merli G, Marcacci M. Platelet-rich plasma in tendon-related disorders: results and indications. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2018;26(7):1984-99.
23. Çirci E, Akman YE, Şükür E, Bozkurt ER, Tüzüner T, Öztürkmen Y. Impact of platelet-rich plasma injection timing on healing of Achilles tendon injury in a rat model. *Acta Orthopaedica et Traumatologica Turcica*. 2016;50(3):7.
24. Takamura M, Yasuda T, Nakano A, Shima H, Neo M. The effect of platelet-rich plasma on Achilles tendon healing in a rabbit model. *Acta Orthop Traumatol Turc*. 2017;51(1):65-72.
25. Brkljac M, Kumar S, Kalloo D, Hirehal K. The effect of platelet-rich plasma injection on lateral epicondylitis following failed conservative management. *J Orthop*. 2015;12(Suppl 2):S166-70.
26. Görmeli G, Görmeli CAe, Ataoglu B, Çolak C, Aslantürk O, Ertem K. Multiple PRP injections are more effective than single injections and hyaluronic acid in knees with early

osteoarthritis: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*. 2017;25:8.

27. Smith PA. Intra-articular Autologous Conditioned Plasma Injections Provide Safe and Efficacious Treatment for Knee Osteoarthritis: An FDA-Sanctioned, Randomized, Double-blind, Placebo-controlled Clinical Trial. *Am J Sports Med*. 2016;44(4):884-91.
28. Jeyakumar V, Niculescu-Morzsza E, Bauer C, Lacza Z, Nehrer S. Platelet-Rich Plasma Supports Proliferation and Redifferentiation of Chondrocytes during In Vitro Expansion. *Front Bioeng Biotechnol*. 2017;5(75):75.
29. Moussaa M, Lajeunesse D, Hilal G, Atata OE, Haykald G, Serhala R, et al. Platelet rich plasma (PRP) induces chondroprotection via increasing autophagy, anti-inflammatory markers, and decreasing apoptosis in human osteoarthritic cartilage. *Experimental Cell Research*. 2107;352:11.
30. Gilbertie JM, Long JM, Schubert AG, Berglund AK, Schaer TP, Schnabel LV. Pooled Platelet-Rich Plasma Lysate Therapy Increases Synoviocyte Proliferation and Hyaluronic Acid Production While Protecting Chondrocytes From Synoviocyte-Derived Inflammatory Mediators. *Frontiers in Veterinary Science*. 2018;5(150):11.
31. Eid K, Thornhill TS, Glowacki J. Chondrocyte gene expression in osteoarthritis: Correlation with disease severity. *J Orthop Res*. 2006;24(5):1062-8.
32. Zhong L, Huang X, Karperien M, Post JN. Correlation between Gene Expression and Osteoarthritis Progression in Human. *Int J Mol Sci*. 2016;17(7).
33. Assirelli E, Filardo G, Mariani E, Kon E, Roffi A, Vaccaro F, et al. Effect of two different preparations of platelet-rich plasma on synoviocytes. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2015;23(9):2690-703.
34. Montañez-Heredia E, Irizar S, Huertas PJ, Otero E, Valle MD, Prat I, et al. Intra-Articular Injections of Platelet-Rich Plasma versus Hyaluronic Acid in the Treatment of Osteoarthritic Knee Pain: A Randomized Clinical Trial in the Context of the Spanish National Health Care System. *Int J Mol Sci*. 2016;17(7).
35. Dai WL, Zhou AG, Zhang H, Zhang J. Efficacy of Platelet-Rich Plasma in the Treatment of Knee Osteoarthritis: A Meta-analysis of Randomized Controlled Trials. *Arthroscopy*. 2017;33(3):659-70 e1.
36. Perez AG, Lana JF, Rodrigues AA, Luzo AC, Belangero WD, Santana MH. Relevant

aspects of centrifugation step in the preparation of platelet-rich plasma. *ISRN Hematol.* 2014;2014:176060.

37. Weibrich G, Kleis WK, Hafner G, Hitzler WE. Growth factor levels in platelet-rich plasma and correlations with donor age, sex, and platelet count. *J Craniomaxillofac Surg.* 2002;30(2):97-102.
38. Troussard X, Vol S, Cornet E, Bardet V, Couaillac J-P, Fossat C, et al. Full blood count normal reference values for adults in France. *J Clin Pathol.* 2014;67(4):341-4.
39. Jones CI. Platelet function and ageing. *Mamm Genome.* 2016;27(7-8):358-66.
40. Archer CW, Francis-West P. The chondrocyte. *Int J Biochem Cell Biol.* 2003;35(4):401-4.
41. Hoff P, Buttgereit F, Burmester GR, Jakstadt M, Gaber T, Andreas K, et al. Osteoarthritis synovial fluid activates pro-inflammatory cytokines in primary human chondrocytes. *Int Orthop.* 2013;37(1):145-51.
42. Kozhemyakina E, Lassar AB, Zelzer E. A pathway to bone: signaling molecules and transcription factors involved in chondrocyte development and maturation. *Development.* 2015;142(5):817-31.
43. Montaseri A, Busch F, Mobasheri A, Buhrmann C, Aldinger C, Rad JS, et al. IGF-1 and PDGF-bb Suppress IL-1 β -Induced Cartilage Degradation through Down-Regulation of NF- κ B Signaling: Involvement of Src/PI-3K/AKT Pathway. *PLoS One.* 2011;6(12).
44. Duan L, Ma B, Liang Y, Chen J, Zhu W, Li M, et al. Cytokine networking of chondrocyte dedifferentiation in vitro and its implications for cell-based cartilage therapy. *Am J Transl Res.* 2015;7(2):194-208.
45. Raeissadat SA, Rayegani SM, Hassanabadi H, Fathi M, Ghorbani E, Babae M, et al. Knee Osteoarthritis Injection Choices: Platelet- Rich Plasma (PRP) Versus Hyaluronic Acid (A one-year randomized clinical trial). *Clin Med Insights Arthritis Musculoskelet Disord.* 2015;8:1-8.
46. Xie X, Zhang C, Tuan RS. Biology of platelet-rich plasma and its clinical application in cartilage repair. *Arthritis Res Ther.* 2014;16(1):204.
47. Odem MA, Bavencoffe AG, Cassidy RM, Lopez ER, Tian J, Dessauer CW, et al. Isolated nociceptors reveal multiple specializations for generating irregular ongoing activity associated with ongoing pain. *Pain.* 2018;159(11):2347-62.
48. Sibille KT, Chen H, Bartley EJ, Riley J, 3rd, Glover TL, King CD, et al. Accelerated aging

in adults with knee osteoarthritis pain: consideration for frequency, intensity, time, and total pain sites. *Pain Rep.* 2017;2(3):e591.

49. Mosquera A, Rego-Perez I, Blanco FJ, Fernandez JL. Leukocyte Telomere Length in Patients with Radiographic Knee Osteoarthritis. *Environ Mol Mutagen.* 2019;60(3):298-301.

50. Manoy P, Yuktanandana P, Tanavalee A, Tanpowpong T, Ittipanichpong T, Honsawek S. Telomere shortening is associated with poor physical performance in knee osteoarthritis. *Biomed Rep.* 2020;13(4).

51. Everts P, Onishi K, Jayaram P, Lana JF, Mautner K. Platelet-Rich Plasma: New Performance Understandings and Therapeutic Considerations in 2020. *Int J Mol Sci.* 2020;21(20).





จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	Suphattra Phakham
วัน เดือน ปี เกิด	28 December 1991
สถานที่เกิด	Chiang Mai
วุฒิการศึกษา	Faculty of medicine
ที่อยู่ปัจจุบัน	80 Muangkaew Maerim Chiang Mai 50180
ผลงานตีพิมพ์	A study of waterborne diseases classified to water consumption behaviors in Moo 7 community, Bangluksua sub-district, Ongkharak district, Nakhonnayok province

