



ผลของเพลาทเลท ริช ไฟบรินต่อการเพิ่มจำนวนและการสร้างแคลเซียม
ของเซลล์สร้างกระดูกของหนูในห้องปฏิบัติการ

EFFECTS OF PLATELET-RICH FIBRIN ON THE PROLIFERATION AND
CALCIFICATION OF MICE OSTEOBLASTS *IN VITRO*

ธัญญา ธารเสนา¹ ดุษฎี หอมดี² อรุณ ทิรมพงษ์³ และ วราภรณ์ สุวรรณรงค์⁴

¹ นักศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาปริทันตวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น,

thananya2531@hotmail.com

² ผู้ช่วยศาสตราจารย์ (ดร.) ภาควิชาปริทันตวิทยา และกลุ่มวิจัยโรคอ้วนเรื้อรังในช่องปากและโรคทางระบบที่สัมพันธ์กับสุขภาพ

ช่องปาก คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, nootdoosadee@hotmail.com

³ รองศาสตราจารย์ ภาควิชาปริทันตวิทยา และกลุ่มวิจัยเฉพาะทางเลเซอร์วิทยาทางทันตแพทยศาสตร์ คณะทันตแพทยศาสตร์

มหาวิทยาลัยขอนแก่น, aroontee@yahoo.com

⁴ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาปริทันตวิทยา และกลุ่มไบโอฟิล์ม คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, warsuw@kku.ac.th

บทคัดย่อ

เป้าหมายในการรักษาความพิการของกระดูกในช่องปาก คือการส่งเสริมให้เกิดการสร้างใหม่ของกระดูกในบริเวณที่มีการละลายของกระดูกที่เกิดได้จากหลายสาเหตุ เช่น การถอนฟัน การศึกษาวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความเข้มข้นของเพลาทเลท ริช ไฟบริน ต่อการเพิ่มจำนวนและการสร้างแคลเซียมของเซลล์สร้างกระดูกของหนูในห้องปฏิบัติการ โดยทำการทดลองในเซลล์ไลน์ MC3T3-E1 ในการศึกษาหลังจากเซลล์ไลน์ MC3T3-E1 สัมผัสกับเพลาทเลท ริช ไฟบริน ที่ความเข้มข้นต่างๆ (ร้อยละ 6.25 – 50) เป็นเวลา 1 และ 7 วัน จากนั้นประเมินความมีชีวิตของเซลล์สร้างกระดูก โดยวัดความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์ด้วยการใช้เพรสโตโตบลู เปรียบเทียบกับเซลล์สร้างกระดูกที่ไม่ได้สัมผัสกับเพลาทเลท ริช ไฟบริน ผลการศึกษาเมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์ MC3T3-E1 กับเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์แอลฟา-เอ็มอีเอ็ม ที่มีไฟตัลโบไวน์ ซิรั่ม ร้อยละ 1 พบว่าความเข้มข้นของเพลาทเลท ริช ไฟบรินที่ร้อยละ 50 มีประสิทธิภาพในการกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์ MC3T3-E1 ได้ดีที่สุดที่ระยะเวลา 1 วัน แต่พบว่าลดลงในวันที่ 7 วัน ส่วนในการศึกษาการสร้างแคลเซียมหลังจากเซลล์สร้างกระดูกหลังจากสัมผัสกับเพลาทเลท ริช ไฟบรินที่ความเข้มข้นต่างๆ (ร้อยละ 6.25 – 50) เป็นเวลา 21 วัน พบว่า ที่ความเข้มข้นร้อยละ 6.25 มีการสร้างแคลเซียมมากกว่าในความเข้มข้นอื่นๆ จากการศึกษาสรุปได้ว่าในวันที่ 1 เพลาทเลท ริช ไฟบริน ที่ความเข้มข้นร้อยละ 50 มีประสิทธิภาพในการเพิ่มจำนวนสูงที่สุด ส่วนในวันที่ 7 เพลาทเลท ริช ไฟบริน ที่ความเข้มข้นร้อยละ 50 มีประสิทธิภาพในการเพิ่มจำนวนสูงที่สุด และที่ความเข้มข้น 6.25 มีประสิทธิภาพในการสร้างแคลเซียมมากที่สุด

คำสำคัญ: เพลาทเลท ริช ไฟบริน, เซลล์สร้างกระดูก, การเพิ่มจำนวน



ABSTRACT

The ultimate goal of osseous defect treatment is regeneration of bone resorbed, for example, by tooth loss. This study aimed to investigate the effect of platelet-rich fibrin (PRF) on proliferation and calcification of osteoblast cell line MC3T3-E1 in vitro. Osteoblast cells were exposed to PRF at various concentrations (6.25 to 50 percent) for a period of 1 and 7 days wherein the viability of osteoblast cells was assessed by Prestoblu assay. Osteoblast cells not exposed to PRF served as comparison control. Results show that PRF concentration of 50 percent had the highest effect on increased osteoblast cells proliferation for a period of 1 day and PRF concentration of 6.25 percent had the highest effect on increased osteoblast cells proliferation for a period of 7 days. Furthermore, the concentration of 6.25 percent had the highest effect on increased calcification. In conclusion, PRF was effective in stimulating osteoblast proliferation and calcification in vitro.

Keywords: Platelet-rich fibrin, osteoblast, proliferation

1. บทนำ

ความพิการของกระดูก (osseous defect) ในช่องปากนั้น เกิดขึ้นได้จากหลายสาเหตุ เช่น การละลายตัวของกระดูกภายหลังการถอนฟัน การสูญเสียกระดูกจากโรคปริทันต์ การห้อยย้อยของโพรงอากาศแมกซิลลาร์ (Pneumatization of maxillary sinus) เป็นต้น ซึ่งเป็นปัญหาต่อการใส่ฟันเทียมของผู้ป่วยทั้งด้านการทำหน้าที่ และความสวยงาม ในการรักษาสามารถรักษาได้หลายวิธี เช่น การปลูกกระดูก (bone graft) เป็นการเพิ่มปริมาณกระดูกในรอยพิการ โดยกระดูกที่นำมาปลูกควรมีคุณสมบัติที่ดี คือ การสร้างกระดูก (osteogenesis) คือ การสร้างและการพัฒนาให้เกิดกระดูกโดยไม่มีเซลล์ต้นกำเนิดการสร้างกระดูกจากแหล่งอื่นเลย การเหนี่ยวนำการสร้างกระดูก (osteinduction) คือ การเหนี่ยวนำให้เซลล์ต้นกำเนิดเซลล์กระดูก (osteoprogenitor cells) พัฒนาเป็นเซลล์สร้างกระดูก (osteoblast) และการชักนำเนื้อเยื่อกระดูก (osteoconduction) คือ กระดูกปลูกถ่ายที่สามารถเป็นโครงร่างให้เซลล์กระดูกเจริญเข้ามาและสร้างกระดูกใหม่ได้ (Giannoudis, Dinopoulos, & Tsiridis, 2005)(Misch & Dietsch, 1993) กระดูกที่นำมาปลูกนั้นมีหลายชนิด ได้แก่ กระดูกปลูกถ่ายในตนเอง (autogenous bone graft, autograft) เป็นการนำกระดูกจากตัวผู้ป่วยเองมาปลูกในความพิการ เช่น กระดูกสะโพก (iliac bone) กระดูกแนวประสานคาง (mandibular symphysis) บริเวณส่วนท่ายของขากรรไกรล่าง (mandibular ramus) เป็นต้น ซึ่งกระดูกปลูกถ่ายในตนเองถือว่าเป็นวิธีมาตรฐานในการปลูกกระดูก เนื่องจากมีคุณสมบัติทั้งการสร้างกระดูก การเหนี่ยวนำการสร้างกระดูก และการชักนำเนื้อเยื่อกระดูก (Giannoudis et al., 2005)(Burchardt, 1983) นอกจากนี้กระดูกปลูกถ่ายในตนเองยังลดโอกาสการเกิดการปฏิเสธเนื้อเยื่อปลูกถ่าย (graft rejection) และการติดโรคจากบุคคลอื่น (disease transmittion)(Conrad E.U 1995) แต่อย่างไรก็ตามพบว่ากระดูกปลูกถ่ายในตนเองมีข้อเสีย คือ ผู้ป่วยต้องมีบริเวณที่ได้รับการผ่าตัดหลายตำแหน่ง มีข้อจำกัดของปริมาณกระดูกปลูกถ่ายที่สามารถนำมาได้ ผู้ป่วยเจ็บปวดภายหลังการผ่าตัด และเกิดปัญหาแทรกซ้อนอื่นๆ ได้ (Kneser et al., 2006) จากข้อจำกัดเหล่านี้จึงมีการพัฒนากระดูกปลูกถ่ายเอกพันธุ์ (allogenic bone graft; allograft) เป็นการนำกระดูกของบุคคลอื่นที่ผ่านกระบวนการต่างๆ เช่น กระดูกสดแช่แข็ง (fresh-frozen bone) กระดูกปลูกถ่ายเอกพันธุ์ที่ทำให้แห้งภายใต้อุณหภูมิต่ำ (freeze-dried bone allograft; FDDB) และกระดูกปลูกถ่ายเอกพันธุ์ที่



ผ่านการละลายแร่ธาตุทำให้ร่างกายได้อุณหภูมิต่ำ (demineralized freeze-dried bone allograft; DFDBA) ก่อนนำมาใช้งาน แต่กระดูกปลูกถ่ายเอกพันธ์มีข้อเสีย คือ มีการละลายตัวของกระดูกปลูกถ่ายง่ายกว่ากระดูกปลูกถ่ายในตนเอง เหลือเพียงคุณสมบัติการเหนียวสำหรับการสร้างกระดูก มีโอกาสเกิดการปฏิเสธเนื้อเยื่อจากผู้อื่น และ การคิดเชื้อจากบุคคลอื่น ได้ กระดูกปลูกถ่ายวิวิธพันธุ์ (xenografts) เป็นกระดูกที่ได้มาจากต่างสปีชีส์ เช่น วัว (bovine) สุกร (porcine) ซึ่งมีโอกาสเกิดการปฏิเสธเนื้อเยื่อได้ง่ายกว่ากระดูกที่ได้จากมนุษย์ นอกจากนี้ยังมีกระดูกสังเคราะห์ที่เรียกว่ากระดูกปลูกถ่ายเฉื่อย (alloplast) เช่น ไฮดรอกซีอะพาไทต์ (hydroxyapatite) แคลเซียมฟอสเฟต (calcium phosphate) ซึ่งมีคุณสมบัติในการชักนำเนื้อเยื่อกระดูก มีความแข็งแรงเป็นโครงค้ำยันให้เซลล์สร้างกระดูก และมีความเข้ากันได้กับเนื้อเยื่อกระดูก การชักนำให้กระดูกคืนสภาพ (Guided bone regeneration; GBR) เป็นการเหนียวทำให้เกิดการสร้างกระดูกในบริเวณความพิการ โดยอาศัยเซลล์ที่จำเพาะ เช่น เซลล์ต้นกำเนิด (pluripotent cells) และเซลล์สร้างกระดูก (osteogenic cells) เคลื่อนที่จากอวัยวะข้างเคียงมาที่บริเวณบาดแผล (Dahlin et al., 1988) โครงค้ำยัน (scaffold) เช่น แผ่นเยื่อกั้น (barrier membrane) วัสดุปลูกถ่าย และ โมเลกุลส่งสัญญาณ (signaling molecule) (Drosse et al., 2008) เช่น ไซโตไคน์ (cytokine) หรือ โกรต แฟกเตอร์ (growth factor) ทำหน้าที่เหนียวทำให้เกิดการเคลื่อนที่ของเซลล์มายังบริเวณความพิการ เกิดการเติบโตและสร้างกระดูกขึ้นมาใหม่ได้ (Dahlin et al., 1988) โมเลกุลส่งสัญญาณที่เกี่ยวกับการสร้างกระดูกมีหลายชนิด เช่น เพลทเลท-ดีไرف์ โกรต แฟกเตอร์ (platelet-derived growth factor; PDGF) อินซูลิน-ไลค์ โกรตแฟกเตอร์ (insulin-like growth factor; IGF) ไฟโบรบลาส โกรต แฟกเตอร์ (fibroblast growth factor; FGF) ทรานส์ฟอร์มมิง โกรต แฟกเตอร์-เบตา (transforming growth factor- β ; TGF- β) วาสคิวลา เอนโดทีเลียล โกรต แฟกเตอร์ (vascular endothelial growth factor; VEGF) และ โบนมอร์โฟเจนิค โปรตีน (bone morphogenic proteins; BMPs) (Hughes et al., 2006) ซึ่งในปัจจุบันมีการศึกษาการประยุกต์นำรีคอมบิแนนท์ เพลทเลท-ดีไرف์ โกรต แฟกเตอร์ ร่วมกับกระดูกปลูกถ่ายเอกพันธ์ หรือกระดูกปลูกถ่ายเฉื่อยในการรักษาความพิการของกระดูกบริเวณง่ามรากฟันร่วมกับกระดูกปลูกถ่ายเอกพันธ์ พบการสร้างใหม่ของกระดูกบริเวณง่ามรากฟันขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับการไม่ใส่รีคอมบิแนนท์ เพลทเลท-ดีไرف์ โกรต แฟกเตอร์ (Nevins et al., 2005)(Nevins et al., 2003) และมีการผลิตผลิตภัณฑ์รีคอมบิแนนท์ เพลทเลท-ดีไرف์ โกรต แฟกเตอร์-บีบี ร่วมกับบีต้า-ทีซีพี (rhPDGF-BB/ β -TCP: GEM 21S[®]) เพื่อใช้ในการรักษาความพิการต่างๆ ในช่องปาก แต่เนื่องจากมีข้อควรระวังในการใช้ผลิตภัณฑ์ในกรณีมารดาให้นมบุตร ผู้ป่วยที่มีประวัติการแพ้ผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนประกอบของรีคอมบิแนนท์ เพลทเลท-ดีไرف์ โกรต แฟกเตอร์-บีบี หรือ บีต้า-ทีซีพี เป็นต้น นอกจากนี้ผลิตภัณฑ์ยังมีราคาค่อนข้างสูง จึงได้มีการคิดค้นในการลดข้อจำกัดต่างๆ โดยได้มีการคิดค้นการนำไฟบรินที่ได้จากการปั่นเลือดของตัวผู้ป่วยเอง ซึ่งมีโกรตแฟกเตอร์หลายชนิดมาใช้ร่วมกับการปลูกกระดูกในบริเวณความพิการต่างๆ ได้ เช่น เพลทเลท ริช ไฟบริน (platelet-rich fibrin; PRF) เพลทเลท ริช ไฟบริน เป็นการนำเลือดของตัวผู้ป่วยเองมาผ่านกระบวนการปั่นเหวี่ยงเพื่อให้เกิดการแยกตัวของเลือดเป็น 3 ส่วน ได้แก่ ส่วนเม็ดเลือดแดง (red corpuscles base) อยู่บริเวณก้นหลอดปั่นเลือด ส่วนการแข็งตัวของไฟบริน (fibrin clot) อยู่ส่วนกลางของหลอดปั่นเลือด และส่วนของพลาสมาที่ไม่มีเซลล์ (acellular plasma) อยู่ส่วนบนของหลอดปั่นเลือด ในไฟบรินประกอบด้วยโมเลกุลส่งสัญญาณหลายชนิด เช่น เพลทเลท-ดีไرف์ โกรต แฟกเตอร์-เอบี (PDGF-AB) ทรานส์ฟอร์มมิง โกรต แฟกเตอร์-เบตาวัน (TGF β -1) อีพิดีเดอมอล โกรต แฟกเตอร์ (epidermal growth factor; EGF) และ วาสคิวลา เอนโดทีเลียล โกรต แฟกเตอร์ และทรอมโบสปอนดินวัน (thrombospondin-1; TSP-1) ได้ในช่วง 7 วันแรก (Su et al., 2009)(Dohan et al., 2006a)(Dohan et al., 2006b)(Dohan et al., 2009) ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญในการ



ส่งเสริม โบน มีเซนไคมอล สเต็มเซลล์ (bone mesenchymal stem cell; BMSC) ให้เกิดการเพิ่มจำนวนเซลล์ (proliferation) เปลี่ยนแปลงของเซลล์ไปเป็นเซลล์ที่มีคุณสมบัติเฉพาะ (differentiation) และเคลื่อนที่ (migration) ของเซลล์ นอกจากนั้น เพลทเลท ริช ไฟบริน ยังมีการเตรียมที่ง่าย สะดวก ประหยัด และลดความเสี่ยงในการตอบสนองของร่างกายผู้ป่วย และการสร้างแอนติบอดีได้ จากการศึกษาของ Jong-WonLee และคณะ (2012) ศึกษาเปรียบเทียบการเหนี่ยวนำการสร้างกระดูกใหม่ด้วยวิธีการใช้เพลทเลท ริช ไฟบริน (กลุ่มทดลอง) และไม่ใช่ เพลทเลท ริช ไฟบริน (กลุ่มควบคุม) ในกระต่าย พบการสร้างใหม่ของกระดูกในกลุ่มทดลองร้อยละ 29.30 ส่วนในกลุ่มควบคุมพบร้อยละ 11.06 และพบกระดูกที่สร้างใหม่ยึดเกาะกับรากฟันเทียมในกลุ่มทดลองคิดเป็นร้อยละ 39.43 ในกลุ่มควบคุมคิดเป็นร้อยละ 17.11 ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่อย่างไรก็ตาม ก็ยังพบการสร้างใหม่ของกระดูกในปริมาณที่ไม่เป็นที่น่าพอใจ จึงทำให้นำไปสู่การศึกษานี้ คือ เพื่อศึกษาศึกษาารูปแบบความเข้มข้นของเพลทเลท ริช ไฟบรินต่อการเพิ่มจำนวนและการสร้างแคลเซียม ของเซลล์ MC3T3-E1 เพื่อนำมาใช้เป็นข้อมูลในการนำมาประยุกต์ใช้ในการเพิ่มประสิทธิภาพการเหนี่ยวนำการสร้างกระดูกทางคลินิกต่อไป

2. วัตถุประสงค์การวิจัย

- 2.1 เพื่อศึกษาผลของเพลทเลท ริช ไฟบรินต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์สร้างกระดูก
- 2.2 เพื่อศึกษาผลของเพลทเลท ริช ไฟบรินต่อการสร้างแคลเซียมของเซลล์สร้างกระดูก

3. การดำเนินการวิจัย

การเตรียมเพลทเลท ริช ไฟบริน

เจาะเลือดจากเส้นเลือดดำมีเดียน คิวบิทัล (median cubital vein) จากอาสาสมัคร ด้วยเข็มขนาด 20 นิ้ว ลงในหลอดสำหรับปั่นเลือดให้ได้เพลทเลท ริช ไฟบริน ปริมาณ 10 มิลลิลิตร จำนวน 2 หลอด นำไปปั่นในเครื่อง A-PRF™ ที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 14 นาที จะได้ส่วนประกอบของเพลทเลท ริช ไฟบริน 3 ส่วน ได้แก่ ส่วนของพลาสมาที่ไม่มีเซลล์ ไฟบริน และส่วนเม็ดเลือดแดง จากนั้นนำส่วนของไฟบรินวางบนตะแกรงเพื่อแยกส่วนน้ำออกจากแผ่นไฟบริน นำแผ่นเพลทเลท ริช ไฟบริน ที่เหลือจากการรักษาโรคเนื้อเยื่อรอบรากฟันเทียมอีกเสบทางคลินิกใส่ในหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร โดยเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ตามอัตราส่วน คือ เพลทเลท ริช ไฟบริน 1 แผ่นต่ออาหารเลี้ยงเซลล์แอลฟา-เอ็มอีเอ็มปริมาตร 5 มิลลิลิตร (หากเหลือแผ่นเพลทเลท ริช ไฟบริน 2 ส่วนใน 5 ส่วน จะเติมอาหารเลี้ยงเซลล์แอลฟา-เอ็มอีเอ็มปริมาตร 2 มิลลิลิตร) ใส่ตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ ร้อยละ 5 เป็นเวลา 7 วัน เตรียมความเข้มข้นของเพลทเลท ริช ไฟบรินให้มีความเข้มข้นร้อยละ 6.25, 12.5, 25 และ 50

การหาความเข้มข้นของเพลทเลท ริช ไฟบรินที่กระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไลน์ MC3T3-E1 ณ เวลาต่างๆ

ตรวจสอบปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตของเซลล์โดยใช้พรอสโตบลู โดยกลุ่มทดลอง ได้แก่ เซลล์ไลน์ MC3T3-E1 ที่ใส่เพลทเลท ริช ไฟบริน ที่ความเข้มข้นร้อยละ 6.25, 12.5, 25 และ 50 และกลุ่มควบคุม ได้แก่ เซลล์ไลน์ MC3T3-E1 ในอาหารเลี้ยงเซลล์แอลฟา-เอ็มอีเอ็ม ที่มีพีดีบีโวนัวร์ ซีรัม ร้อยละ 10 และร้อยละ 1

จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เป็นเวลา 1 และ 7 วัน เมื่อครบตามเวลาดูดสารละลายออกจากหลุม ล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลไลน์ จากนั้นเติมสารละลายพรอสโตบลู



อ่านค่าความมีชีวิตของเซลล์ โดยใช้เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ไมโครเพลทรีดเดอร์ ที่ความยาวกระตุ้น (excitation wavelength) 560 นาโนเมตร และความยาวคลื่นคายพลังงาน (emission wavelength) 590 นาโนเมตร ที่เวลา 0, 30 และ 60 นาที ซึ่งความเข้มข้นของเพลทเลท ริช ไฟบริน ในความเข้มข้นต่างๆ จะถูกทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง และคำนวณหาค่าเฉลี่ยร้อยละการอยู่รอดของเซลล์ไลน์ MC3T3-E1

การทดสอบการสร้างแคลเซียมของเซลล์ไลน์ MC3T3-E1 ตามความเข้มข้นของเพลทเลท ริช ไฟบริน

ตรวจสอบการสร้างแคลเซียมของเซลล์โดยใช้อะริซาไรน เรด โดยแบ่งกลุ่มทดลอง ได้แก่ เซลล์ไลน์ MC3T3-E1 ที่ใส่เพลทเลท ริช ไฟบริน ในความเข้มข้นร้อยละ 6.25, 12.5, 25 และ 50 และกลุ่มควบคุม ได้แก่ เซลล์ไลน์ MC3T3-E1 ในอาหารเลี้ยงเซลล์แอลฟา-เอ็มอีเอ็ม ที่มีฟัลโบลีน ซีรัม ร้อยละ 10 และร้อยละ 1

จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เป็นเวลา 21 วัน ในอาหารเลี้ยงเซลล์เหนี่ยวนำให้เกิดการพัฒนาเป็นเซลล์สร้างกระดูก (osteogenic media) เมื่อครบตามเวลาดูสารละลายออกจากหลุม ล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ จากนั้นตรึงเซลล์ด้วยเมทานอลอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วล้างด้วยน้ำปราศจากไอออน 2 ครั้ง เติมสารละลายอะลิซารินหลุมละ 370 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ 2 นาที จากนั้นดูสารละลายอะลิซารินทิ้ง แล้วล้างด้วยน้ำปราศจากไอออน 3 ครั้ง แล้วทิ้งไว้ให้แห้ง

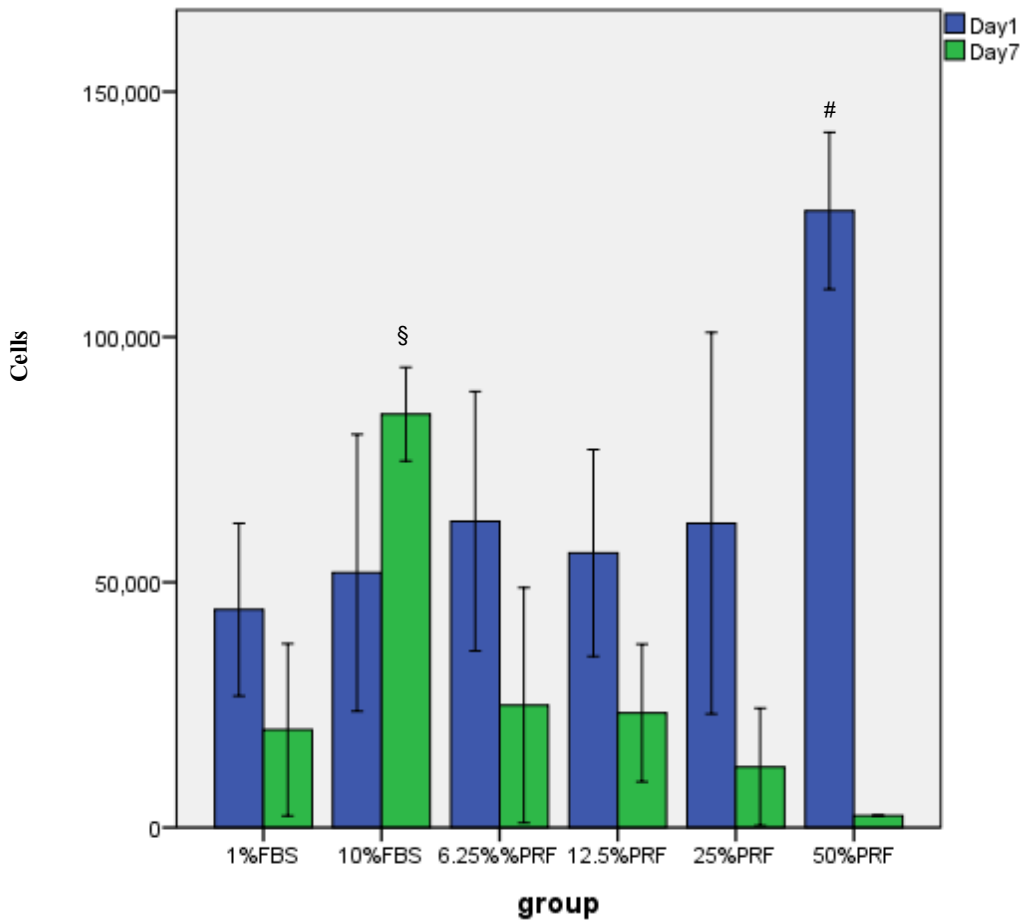
ละลายสีที่ติดด้วย 10% cetylpyridium chloride ใน 10 มิลลิโมล โซเดียมฟอสเฟต (sodium phosphate) ปริมาตร 1 มิลลิลิตรต่อหลุม เขย่าประมาณ 20 นาที เพื่อให้สีที่ย้อมละลาย นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร โดยใช้เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ไมโครเพลทรีดเดอร์

การวิเคราะห์ข้อมูล

ใช้โปรแกรม SPSS statistics ในการวิเคราะห์ผลเปรียบเทียบร้อยละของปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตของเซลล์ไลน์ MC3T3-E1 เมื่อทดสอบในเพลทเลท ริช ไฟบรินที่ความเข้มข้นต่างๆ และ ณ เวลาต่าง กำหนดค่าระดับนัยสำคัญ (α) เท่ากับ 0.05 โดยใช้สถิติ Kruskal-Wallis one-way ANOVA with adjusted.

4. ผลการวิจัย

จากการเปรียบเทียบถึงประสิทธิภาพในการกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์สร้างกระดูกของเพลทเลท ริช ไฟบริน ที่ความเข้มข้นร้อยละ 6.25, 12.5, 25 และ 50 และกลุ่มควบคุม คือ ในอาหารเลี้ยงเซลล์แอลฟา-เอ็มอีเอ็ม ที่มีฟัลโบลีน ซีรัม ร้อยละ 1 (กลุ่มควบคุมเชิงลบ) และ อาหารเลี้ยงเซลล์แอลฟา-เอ็มอีเอ็ม ที่มี ฟัลโบลีน ซีรัม ร้อยละ 10 (กลุ่มควบคุมเชิงบวก) เมื่อครบเวลา 1 และ 7 วัน นำมาวัดผลความมีชีวิตของเซลล์ด้วยสารละลายเพรสโตบลู และนำมาคำนวณจำนวนเซลล์จากสมการมาตรฐาน ได้ผลดังกราฟที่ 1



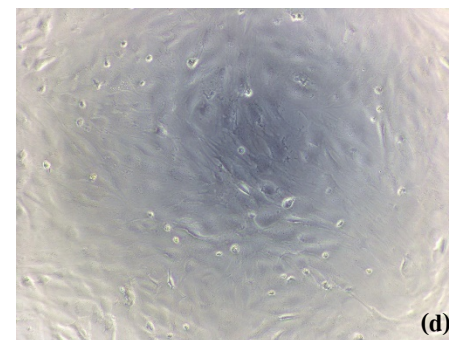
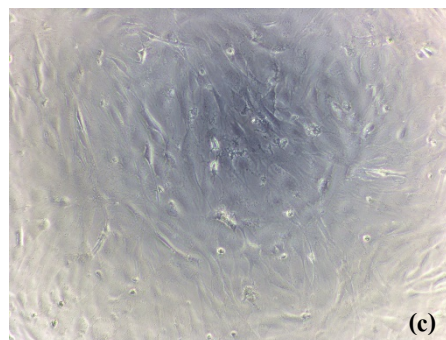
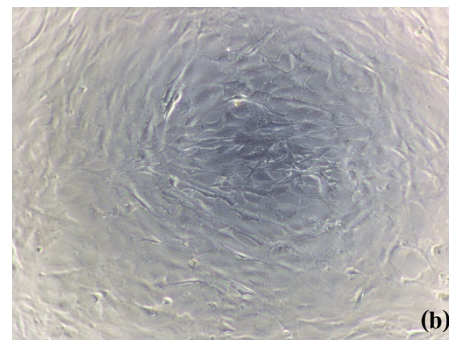
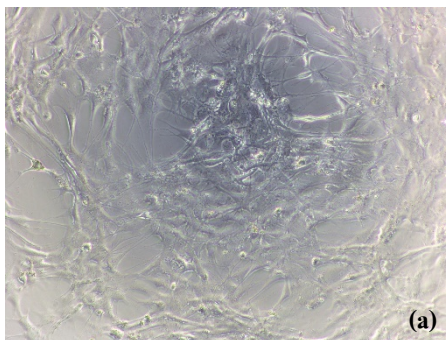
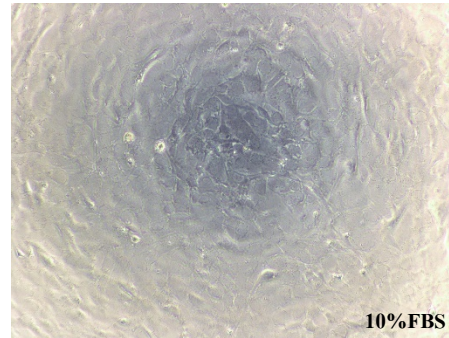
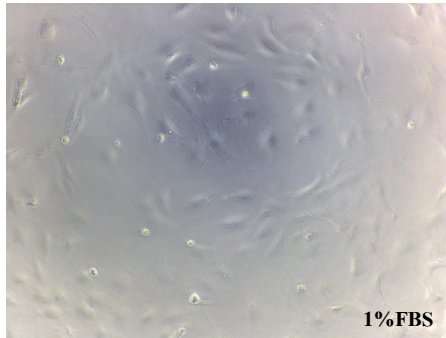
รูปที่ 1 แสดงค่าเฉลี่ยของเซลล์สร้างกระดูกของหนูในแต่ละกลุ่มของเพทเลท ริช ไฟบริน ที่ความเข้มข้นต่างๆ และกลุ่มควบคุม ทดสอบด้วยสถิติ Kruskal-Wallis one-way ANOVA with adjusted # แสดงค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.025$) ในวันที่ 1 และ § แสดงค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.011$) ในวันที่ 7

จากข้อมูลการเพิ่มจำนวนของเซลล์สร้างกระดูกข้างต้น (รูปที่ 1) พบรูปแบบการเพิ่มจำนวนที่เหมือนกันในกลุ่มอาหารเลี้ยงเซลล์แอลฟา-เอ็มอีเอ็ม ที่มี ฟิตัลโโบไวน์ ซีรัม ร้อยละ 1 (กลุ่มควบคุมเชิงลบ), กลุ่มเพทเลท ริช ไฟบริน ความเข้มข้นร้อยละ 6.25, 12.5 และ 25 โดยมีรูปแบบ คือ เมื่อเปรียบเทียบจำนวนเซลล์พบว่าในวันที่ 7 เซลล์มีการลดจำนวนลงจากวันที่ 1 ในขณะที่กลุ่มอาหารเลี้ยงเซลล์แอลฟา-เอ็มอีเอ็ม ที่มี ฟิตัลโโบไวน์ ซีรัม ร้อยละ 10 (กลุ่มควบคุมเชิงบวก) พบการเพิ่มขึ้นของจำนวนเซลล์มากขึ้นอย่างต่อเนื่องตั้งแต่วันที่ 1 ถึงวันที่ 7 แต่ในทางตรงข้ามกลับพบว่า ในกลุ่มเพทเลท ริช ไฟบริน ร้อยละ 50 พบว่าจำนวนเซลล์ลดลงอย่างต่อเนื่องเมื่อเปรียบเทียบจำนวนเซลล์ในวันที่ 1 เมื่อนำข้อมูลที่ได้อาวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่าในวันที่ 7 กลุ่มควบคุมเชิงลบมีจำนวนเซลล์น้อยกว่ากลุ่มควบคุมเชิงบวกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.011$)

ในวันที่ 1 พบว่ากลุ่มเพทเลท ริช ไฟบริน ความเข้มข้นร้อยละ 50 มีจำนวนของเซลล์สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.001 - 0.025$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มอื่นๆ โดยมีจำนวนเซลล์มากกว่ากลุ่มควบคุมเชิงลบและกลุ่มควบคุมเชิงบวกอยู่ 2.83 และ 2.42 เท่าตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกลุ่มการทดลองทุกกลุ่มพบว่าจำนวนเซลล์สร้าง



กระดูกสูงที่สุด คือ เมื่อเลี้ยงเซลล์สร้างกระดูกด้วยเพลาเทเลท ริช ไฟบริน ความเข้มข้นร้อยละ 50 เป็นเวลา 1 วัน และ
น้อยที่สุด คือ กลุ่มเพลาเทเลท ริช ไฟบริน ความเข้มข้นร้อยละ 50 เป็นเวลา 7 วัน โดยมีค่าแตกต่างกันประมาณ 50 เท่า



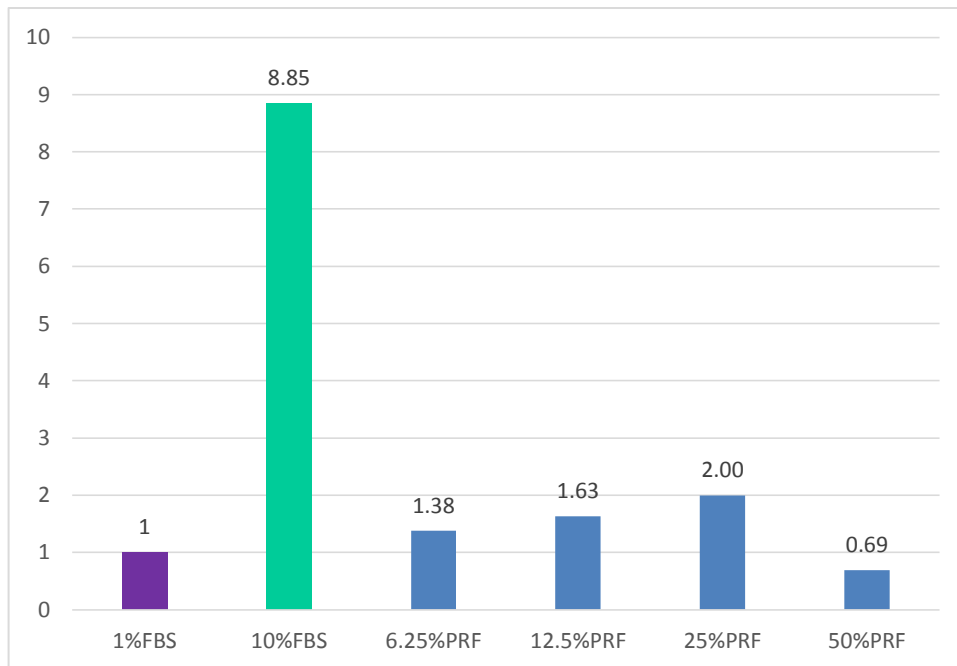
รูปที่ 2 a-d แสดงภาพมิถุนวิทยาของเซลล์ไลน์ MC3T3-E1 ที่ระยะเวลา 7 วัน (10X)

- (a) ภายหลังสัมผัสกับ เพลาเทเลท ริช ไฟบริน ร้อยละ 50 (b) ภายหลังสัมผัสกับ เพลาเทเลท ริช ไฟบริน ร้อยละ 25
(c) ภายหลังสัมผัสกับ เพลาเทเลท ริช ไฟบริน ร้อยละ 12.5 (d) ภายหลังสัมผัสกับ เพลาเทเลท ริช ไฟบริน ร้อยละ 6.25

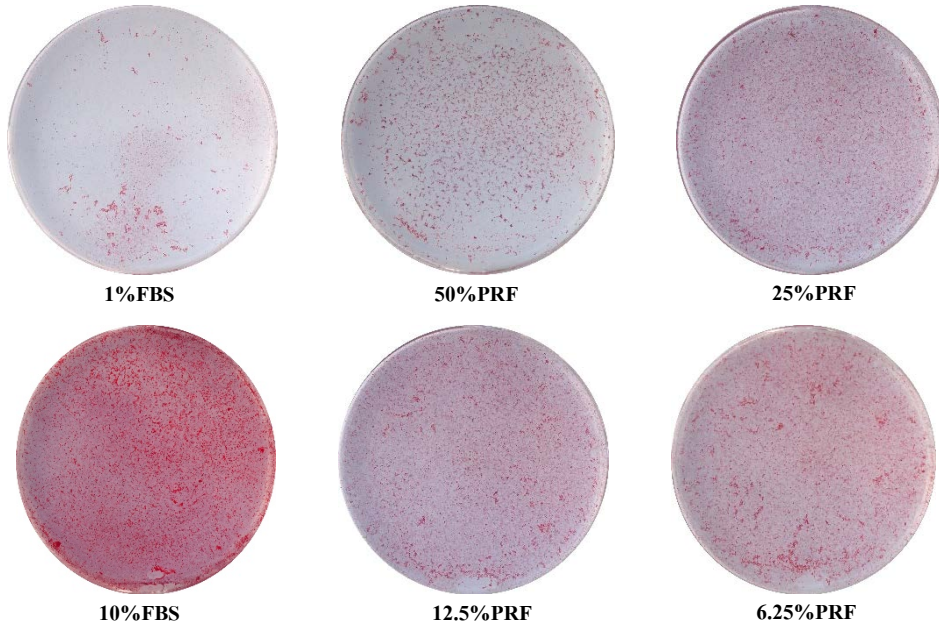
จากรูป 2 a-d พบว่ารูปร่างและลักษณะของเซลล์ที่สัมผัสกับเพลาเทเลท ริช ไฟบริน มีรูปทรงกระสวย (spindle) ปลายแหลม และมีปริมาณที่สูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่เลี้ยงด้วยกลุ่มควบคุมเชิงลบ



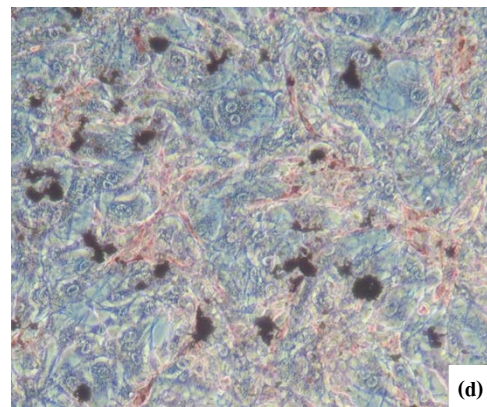
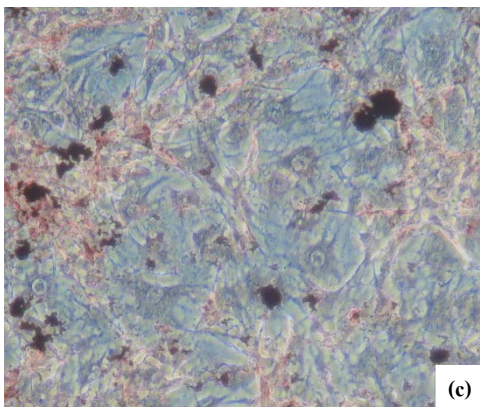
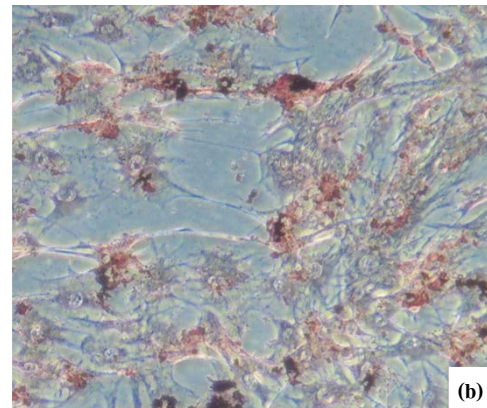
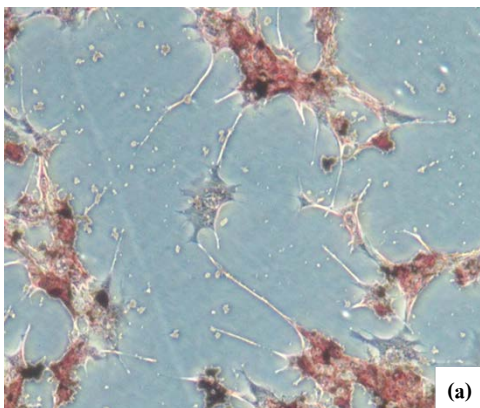
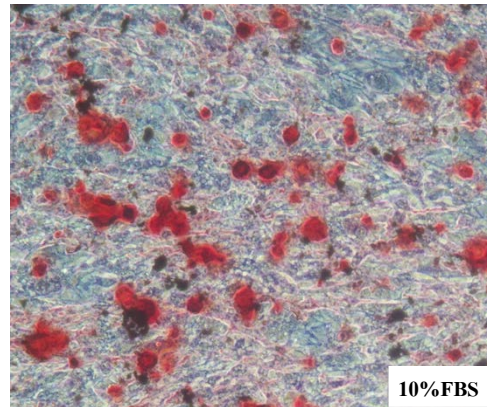
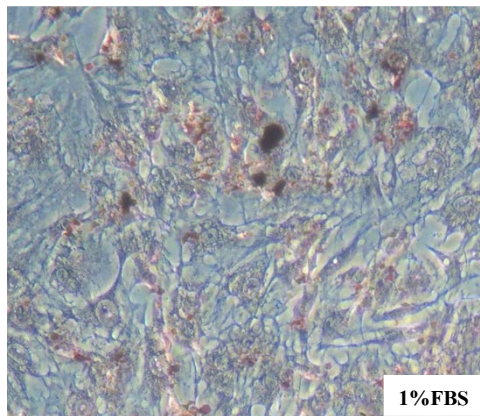
เมื่อเปรียบเทียบถึงประสิทธิภาพของการสะสมตะกอนแคลเซียมของเซลล์สร้างกระดูก ในกลุ่มเพศ เลท ริช ไฟบริน ที่ความเข้มข้นร้อยละ 6.25, 12.5, 25 และ 50 และกลุ่มควบคุมเชิงบวกและเชิงลบ เมื่อครบเวลา 21 วัน นำมาข้อมตะกอนแคลเซียมด้วยสารละลายอะลูซาริน เรด พบว่ากลุ่มที่มีการสะสมตะกอนแคลเซียมที่มากที่สุด คือ กลุ่มควบคุมเชิงบวก พบการสะสมตะกอนแคลเซียมเป็น 8.85 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมเชิงลบ และพบมี การสะสมตะกอนแคลเซียมเป็น 1.38, 1.63, 2.00 และ 0.69 เท่า ในกลุ่มเพศเลท ริช ไฟบริน ร้อยละ 6.25, 12.5, 25 และ 50 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมเชิงลบ และเมื่อนำไปทดสอบทางสถิติพบว่า แต่ละกลุ่มมีความ แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.215$) ดังแสดงในรูปที่ 3



รูปที่ 3 แสดงค่าเฉลี่ยของการสะสมแคลเซียมของเซลล์สร้างกระดูกในแต่ละกลุ่มของ เพศเลท ริช ไฟบริน ที่ความเข้มข้นต่างๆ ณ เวลา 21 วัน เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมเชิงลบ



รูปที่ 4 แสดงการสะสมตะกอนแคลเซียมของเซลล์สร้างกระดูกที่เวลา 21 วัน
ในอาหารเลี้ยงเซลล์เหนี่ยวนำให้เกิดการพัฒนาเป็นเซลล์สร้างกระดูก ที่มีฟีตัล โบวายน ซีรัม ร้อยละ 1
และ 10 และเพปทเลท ริช ไฟบริน ร้อยละ 50, 25, 12.5 และ 6.25



รูปที่ 5 a-f แสดงการสะสมตะกอนแคลเซียมของเซลล์สร้างกระดูกที่เวลา 21 วัน ในอาหารเลี้ยงเซลล์เหนี่ยวนำให้เกิดการพัฒนาเป็นเซลล์สร้างกระดูก (a) สูตรเพลทเลท ริช ไฟบริน ร้อยละ 50 (b) สูตรเพลทเลท ริช ไฟบริน ร้อยละ 25 (c) สูตรเพลทเลท ริช ไฟบริน ร้อยละ 12.5 (d) สูตรเพลทเลท ริช ไฟบริน ร้อยละ 6.25



5. การอภิปรายผล

เซลล์ไลน์ MC3T3-E1 เป็นเซลล์ที่ได้มาจากฝากะโหลกของหนู ซึ่งมีความสามารถในการสร้างอัลคาไลน์ ฟอสฟาเทส (alkaline phosphatase; ALP activity) ในสภาวะพักได้สูง เซลล์มีความสามารถในการเปลี่ยนแปลงไปเป็น เซลล์สร้างกระดูกและเซลล์กระดูกได้ และสามารถสร้างแคลเซียมที่เป็นไฮดรอกซีอะพาไทด์ได้ สามารถกระตุ้นการ แสดงออกของเบสิกไฟโบรบลาสโตไครตแฟกเตอร์เอ็มอาร์เอ็นเอ และโปรตีน ได้ด้วยทรานส์ฟอร์มมิงโกรตแฟกเตอร์ บีต้า และ เบสิกไฟโบรบลาสโตไครตแฟกเตอร์ ในส่วนของโปรสตาแกรนดินเอฟทูแอลฟา (Prostaglandin F_{2α}) สามารถกระตุ้นให้เกิดการสังเคราะห์เอ็มเอและการเพิ่มจำนวนของเซลล์โดยมีการปรับตัวเพิ่มจำนวนตัวรับสัญญาณ ของอินซูลินไลค์โกรตแฟกเตอร์มากขึ้น

การศึกษานี้ใช้การตรวจสอบปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตของเซลล์ไลน์สร้างกระดูกของหนูโดยการใช้เพรสโต บลู ซึ่งเพรสโต บลู เป็นสารประกอบริซาซูริน (resazurin-based compound) ที่สามารถผ่านเข้าสู่เซลล์ได้โดยไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ ทำให้สามารถวัดการเพิ่มจำนวนแบบจลนพลศาสตร์ (kinetic assay) ได้ เมื่อสารเข้าสู่เซลล์ในสภาวะรีดิวซิง (reducing environment) ที่อยู่ในไซโตพลาสซึมของเซลล์ เพรสโต บลู เป็นสารละลายริซาซูริน (resazurin-based solution) ที่มีสีม่วง จะถูกเปลี่ยนไปเป็นริโซรูฟิน (resorufin) ที่มีสีแดง โดยเอนไซม์ในไมโทคอนเดรีย (mitochondrial enzyme) หลายชนิด ซึ่งริโซรูฟินมีคุณสมบัติเป็นสีฟลูออเรสเซนต์ (fluorescence) ทำให้สามารถวัด การแบ่งตัวของเซลล์ได้จากความเข้มของสีแดงที่เกิดขึ้น (Al-Nasiry et al., 2007) ข้อดีของการใช้เพรสโต บลู ในการ ตรวจสอบความมีชีวิตและความเป็นพิษต่อเซลล์ คือ ประหยัดเวลา หรือในกรณีที่เซลล์มีจำนวนน้อยสามารถเพิ่มความไว (sensitivity) ของสารด้วยการเพิ่มระยะเวลาในการบ่มได้นานถึง 24 ชั่วโมง แต่ต้องระวังการปนเปื้อนจากแบคทีเรีย เพรสโต บลู สามารถบ่มได้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 หรือที่อุณหภูมิห้อง โดยไม่ เป็นพิษต่อเซลล์ สามารถนำไปวัดแล้วนำมาทดลองต่อได้ นอกจากนี้ยังไม่ต้องทำการดูแลอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าออกจาก ถาดหลุมเหมือนกับวิธีเอ็มทีที (MTT assay) ที่ต้องดูดออกแล้วใส่โคเมทิลซัลฟอกไซด์เพื่อละลายสีฟอร์มazan ในเซลล์ (Martín-Navarro et al., 2014)(Boncler et al., 2014)

การเคลื่อนที่ของเซลล์กระดูก เกิดการเติบโตและสร้างกระดูกขึ้นมาใหม่ อาศัยโกรตแฟกเตอร์ต่างๆ (Dahlin et al., 1988) (Drosse et al., 2008) เช่น เพลทเลท-ดีไรฟ์ โกรต แฟกเตอร์, อินซูลิน-ไลค์ โกรตแฟกเตอร์, ไฟ โบรบลาสโต โกรตแฟกเตอร์, ทรานส์ฟอร์มมิง โกรต แฟกเตอร์-เบตา, วาสคูลา เอนโดทีเลียล โกรต แฟกเตอร์ และโบ นมอร์โฟเจนิค โปรตีน (Hughes et al., 2006) ซึ่งสามารถพบได้ในเพลทเลท ริช ไฟบริน (Dohan et al., 2009) (Qiao et al., 2017) โดยในการศึกษานี้พิจารณาถึงประสิทธิภาพของเพลทเลท ริช ไฟบริน ต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไลน์ MC3T3-E1 โดยพบว่าความสามารถในการเพิ่มจำนวนของเซลล์ที่สูงที่สุดในวันที่ 1 คือ เพลทเลท ริช ไฟบรินที่ความ เข้มข้นร้อยละ 50 ซึ่งสูงกว่ากลุ่มอื่นๆอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่เมื่อเลี้ยงต่อไปในวันที่ 7 กลับพบว่าเซลล์มีจำนวน ลดลงน้อยกว่ากลุ่มอื่นๆ เช่นเดียวกัน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการตายของเซลล์แบบอะพอโทซิสโดยจากการศึกษาของ Noda และคณะ (1986) พบว่าทรานส์ฟอร์มมิง โกรต แฟกเตอร์ ส่งผลต่อรูปร่างของเซลล์ไลน์สร้างกระดูกของหนู MC3T3-E1 โดยเปลี่ยนรูปร่างจากทรงลูกบาศก์เป็นทรงกระสวย และเมื่อเติมเติมทรานส์ฟอร์มมิง โกรต แฟกเตอร์ความ เข้มข้น 1 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร พบการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ร้อยละ 40 และเมื่อเติมในความเข้มข้น 2 นา โนกรัมต่อมิลลิลิตรพบการยับยั้งการเพิ่มจำนวนอย่างสมบูรณ์ (Rodan, 1986) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Katagiri และคณะ (1990) พบว่า ทรานส์ฟอร์มมิง โกรต แฟกเตอร์ ในความเข้มข้นที่ 1 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ยับยั้งการเพิ่ม



จำนวนของเซลล์ไลน์สร้างกระดูกของหนู MC3T3-E1 (Katagiri et al., 1990) นอกจากนั้นอาจสามารถเกิดได้จากการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีซีรัมที่จำกัด ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมาของ Jilka และคณะ (1998) พบว่าเมื่อมีการเลี้ยงเซลล์แบบไม่มีซีรัมร่วมกับ โบวีน ซีรัม อัลบูมิน ร้อยละ 0.5 (serum free with 0.5% bovine serum albumin) พบการตายของเซลล์แบบอะพอโทซิสที่เพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์แอลฟา-เอ็มอีเอ็ม ที่มีไฟต์ลโบวีน ซีรัม ร้อยละ 10 (Jilka et al., 1998) ซึ่งจากการศึกษานี้พบว่าเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์แอลฟา-เอ็มอีเอ็ม ที่มีไฟต์ลโบวีน ซีรัม ร้อยละ 10 มีการเพิ่มจำนวนขึ้นเรื่อยๆ เช่นเดียวกัน และเมื่อพิจารณาถึงประสิทธิภาพของเพปไทด์ ริช ไฟบริน ต่อการสร้างแคลเซียมของเซลล์พบว่าที่ความเข้มข้นของเพปไทด์ ริช ไฟบริน ร้อยละ 6.25 พบการติดสีของสารย้อมได้มากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่เลี้ยงในเพปไทด์ ริช ไฟบริน ความเข้มข้นอื่นๆ อย่างไรก็ตาม เมื่อเปรียบเทียบกับเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์แอลฟา-เอ็มอีเอ็ม ที่มีไฟต์ลโบวีน ซีรัม ร้อยละ 10 พบว่ามีค่าความสามารถในการเพิ่มจำนวนของเซลล์และการสร้างแคลเซียมของเซลล์ได้น้อยกว่า ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากความแตกต่างของส่วนประกอบและโกรทแฟกเตอร์ จากการศึกษาถึงส่วนประกอบในไฟต์ลโบวีน ซีรัมที่ผ่านมา พบว่ามีโกรทแฟกเตอร์ เช่น อีพีเดอมอล โกรท แฟกเตอร์, โฟโบบราส โกรท แฟกเตอร์, เนิร์ฟ โกรทแฟกเตอร์ (Nerve Growth Factor; NGF) เอ็นโดทีเลียลเซลล์ โกรทแฟกเตอร์ (Endothelial Cell Growth Factor; ECGF), เพปไทด์-ดีไرف โกรท แฟกเตอร์, อินซูลิน-ไลค์ โกรทแฟกเตอร์, ทรานส์เฟอร์ริน โกรท แฟกเตอร์-เบตา เป็นต้น (Gstraunthaler, 2003) นอกจากนี้ยังพบส่วนประกอบอื่นๆ เช่น แอลบูมิน (albumin), กลูโคส, คอเลสเตอรอล, ทรานส์เฟอร์ริน (transferrin), ธาตุเหล็ก เป็นต้น ซึ่งอาจมีความสำคัญในการเพิ่มจำนวนและการสร้างแคลเซียมของเซลล์ได้

6. บทสรุปและข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการศึกษาถึงกลไกในการเพิ่มจำนวนของเซลล์สร้างกระดูกเมื่อถูกกระตุ้นด้วยเพปไทด์ ริช ไฟบริน เพื่อให้ได้ผลสรุปที่ชัดเจนมากขึ้น
2. ควรมีการทดลองในเซลล์มนุษย์เพื่อศึกษาการตอบสนองของเซลล์ที่ใกล้เคียงกับมนุษย์มากยิ่งขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณอาจารย์และบุคลากร คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น และหน่วยวิจัยเซลล์พันธุศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ให้การสนับสนุนและความช่วยเหลือเป็นอย่างดียิ่ง

เอกสารอ้างอิง

- Al-Nasiry, S., Hanssens, M., Luyten, C., & Pijnenborg, R. (2007). The use of Alamar Blue assay for quantitative analysis of viability, migration and invasion of choriocarcinoma cells. *Human Reproduction*, 22(5), 1304–1309.
- Boncler, M., Rózsalski, M., Krajewska, U., Podswdek, A., & Watala, C. (2014). Comparison of PrestoBlue and MTT assays of cellular viability in the assessment of anti-proliferative effects of plant extracts on human endothelial cells. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 69(1), 9–16.
- Burchardt, H. (1983). The biology of bone graft repair. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, (174), 28–42.



- Conrad E.U., Gretch D., Obermeyer K., Moogk M., Sayers M., Wilson J., S. D. M. (1995). Transmission of the Hepatitis-C Virus by Tissue Transplantation *. *The Journal of Bone and Joint Surgery*, 77(2), 214–224.
- Dahlin, C., Linde, a, Gottlow, J., & Nyman, S. (1988). Healing of bone defects by guided tissue regeneration. *Plastic and Reconstructive Surgery*. <https://doi.org/Doi 10.1097/00006534-198805000-00004>
- Dohan, D. M., Choukroun, J., Diss, A., Dohan, S. L., Dohan, A. J. J., Mouhyi, J., & Gogly, B. (2006a). Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part II: Platelet-related biologic features. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology*, 101(3).
- Dohan, D. M., Choukroun, J., Diss, A., Dohan, S. L., Dohan, A. J. J., Mouhyi, J., & Gogly, B. (2006b). Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part III: Leucocyte activation: A new feature for platelet concentrates? *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology*, 101(3).
- Dohan Ehrenfest, D. M., de Peppo, G. M., Doglioli, P., & Sammartino, G. (2009). Slow release of growth factors and thrombospondin-1 in Choukroun's platelet-rich fibrin (PRF): A gold standard to achieve for all surgical platelet concentrates technologies. *Growth Factors*, 27(1), 63–69.
- Drosse, I., Volkmer, E., Capanna, R., Biase, P. De, Mutschler, W., & Schieker, M. (2008). Tissue engineering for bone defect healing: An update on a multi-component approach. *Injury*, 39(SUPPL.2).
- Giannoudis, P. V., Dinopoulos, H., & Tsiridis, E. (2005). Bone substitutes: An update. *Injury*, 36(3), S20–S27.
- Gstraunthaler, G. (2003). Alternatives to the use of fetal bovine serum: serum-free cell culture. *Altex*.
- Hughes, F. J., Turner, W., Belibasakis, G., & Martuscelli, G. (2006). Effects of growth factors and cytokines on osteoblast differentiation. *Periodontology 2000*.
- Jilka, R. L., Weinstein, R. S., Bellido, T., Parfitt, A. M., & Manolagas, S. C. (1998). Osteoblast Programmed Cell Death (Apoptosis): *Journal of Bone and Mineral Research*, 13(5), 793–802.
- Katagiri, T., Lee, T., Takeshima, H., Suda, T., Tanaka, H., & Omura, S. (1990). Transforming growth factor- β modulates proliferation and differentiation of mouse clonal osteoblastic MC3T3-E1 cells depending on their maturation stages. *Bone and Mineral*, 11(3), 285–293.
- Kneser, U., Schaefer, D. J., Polykandriotis, E., & Horch, R. E. (2006). Tissue engineering of bone: The reconstructive surgeon's point of view. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*.
- Martín-Navarro, C. M., López-Arencibia, A., Sifaoui, I., Reyes-Batlle, M., Cabello-Vílchez, A. M., Maciver, S., ... Lorenzo-Morales, J. (2014). PrestoBlue® and AlamarBlue® are equally useful as agents to determine the viability of Acanthamoeba trophozoites. *Experimental Parasitology*, 145(S), S69–S72.
- Misch, C. E., & Dietsch, F. (1993). Bone-grafting materials in implant dentistry. *Implant Dentistry*, 2(3), 158–67.
- Nevins, M., Camelo, M., Nevins, M. L., Schenk, R. K., & Lynch, S. E. (2003). Periodontal regeneration in humans using recombinant human platelet-derived growth factor-BB (rhPDGF-BB) and allogenic bone. *Journal of Periodontology*, 74(9), 1282–92.



- Nevins, M., Giannobile, W. V., McGuire, M. K., Kao, R. T., Mellonig, J. T., Hinrichs, J. E., ... Lynch, S. E. (2005). Platelet-Derived Growth Factor Stimulates Bone Fill and Rate of Attachment Level Gain: Results of a Large Multicenter Randomized Controlled Trial. *Journal of Periodontology*, 76(12), 2205–2215.
- Qiao, J., An, N., & Ouyang, X. (2017). Quantification of growth factors in different platelet concentrates. *Platelets*.
- Rodan, H. N. and G. A. (1986). Type-8 Transforming Growth Factor Inhibits Proliferation and Expression of Alkaline Phosphatase in #Urine Osteoblast-Like Cells. *BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS*, 140(1), 56–65.
- Su, C. Y., Kuo, Y. P., Tseng, Y. H., Su, C. H., & Burnouf, T. (2009). In vitro release of growth factors from platelet-rich fibrin (PRF): a proposal to optimize the clinical applications of PRF. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology*, 108(1), 56–61.