ขั้นตอนการวิจัย

1. กระบวนการขอรับบริจาคชิ้นเนื้อเหงือกและเอ็นยึดปริทันต์ที่ติดมากับฟันที่ถูกถอนจากผู้ที่มารับบริการทางทันตกรรมที่ ภาควิชาศัลยศาสตร์ช่องปากและแม็กซิลโลเฟเชียล และภาควิชาเวชศาสตร์ช่องปากและปริทันตวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ได้ผ่านการรับรองจากคณะกรรมการการวิจัยในคนของมหาวิทยาลัยมหิดล เลขที่ MU-IRB 2009/004.0601, MU-IRB 2010/024.1901 (1st renewal) และ MU-IRB 2011/009.1101 (2nd renewal) มีผู้เข้าร่วมโครงการ 31 ราย เป็นผู้มีระดับน้ำตาลปรกติ 12 ราย และเป็นเบาหวานที่ควบคุมระดับน้ำตาล 19 ราย

2. เตรียมโครงร่าง 3 มิติ จากไคโตซาน ไคโตซานเสริมด้วยผงเปลือกหอยเป๋าฮื้อ และ ไคโตซานเสริมด้วยผงเปลือกหอยเป๋าฮื้อและเส้นใยไหม

2.1 วัสดุและวิธีการ

2.1.1 ผงไคโตซาน (คุณภาพระดับใช้ทำอาหาร น้ำหนักโมเลกุลสูง กลุ่มอซีติลถูกนำออกจากโครงสร้างของไคติน สูงกว่าร้อยละ 90) บริษัท โบนาฟิเดสมาร์เก็ตติ้งจำกัด ประเทศไทย

2.1.2 เปลือกหอยเป๋าฮื้อที่มีความยาว 2-3 นิ้วที่ถูกแกะเอาเนื้อออกไปแล้ว จากร้านอาหารชายทะเล ที่จังหวัดชลบุรี ล้างน้ำและขจัดส่วนที่เป็นเศษเนื้อเยื่อที่ติดด้านใน (ลักษณะแวววาวของมุก) ออก ล้างน้ำจนสะอาด ทิ้งไว้ให้แห้ง กรอด้านนอกที่มีลักษณะเป็นหินปูนติดสีต่าง ๆ (แคลไซต์) ออกด้วยหัวกรอมอเตอร์ไฟฟ้าชนิดหมุนช้า จนเหลือแต่ชั้นที่มีลักษณะแข็งมากเป็นมันแวววาวของเปลือกหอยมุก (อราโกไนท์) ล้างน้ำให้สะอาด ตากแห้ง ทุบให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ โดยวางในครกหินตำด้วยสากหิน ต่อไปนำไปบดให้ละเอียดโดยใส่ลงโถเครื่องบดชนิดหมุนด้วยมอเตอร์ อาศัยการกระแทกด้วยลูกหินเป็นเวลา 6-8 ชั่วโมง นำผงเปลือกหอยที่ละเอียดไปร่อนผ่านตระแกรงขนาด 300 ไมโครเมตร ผงเปลือกหอยที่มีขนาดเล็กกว่าหรือ

เท่ากับ 300 ไมโครเมตร จะผ่านตระแกรงได้และถูกเก็บไว้ในขวดที่อุณหภูมิห้องและใส่ในกล่องพลาสติค ที่มีสารดูดความชื้นอยู่ด้วย ก่อนที่จะนำไปใช้งานต่อไป ส่วนผงเปลือกหอยที่ยังไม่ได้ขนาดที่ต้องการ ถูกนำไปบดซ้ำ และทำเช่นเดิม

2.1.3 รังไหม (Bombyx mori) ที่ปราศจากตัวดักแด้ จากจังหวัดขอนแก่น ถูกนำมาล้างด้วยน้ำก๊อก และนำไปต้มในน้ำสบู่ (สบู่ซักผ้าสีขาว) ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็น เทน้ำออก นำรังไหมที่ต้มแล้วไปล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง แล้วนำไปแช่ในสารละลายด่าง โซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 นอร์มอล โดยทำซ้ำ 2 ครั้ง ๆ ละ 1 ชั่วโมง ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง แต่ละครั้งแช่ไว้ 5 นาที เพื่อขจัด เซอร์ริซิน (ส่วนของโปรตีนที่ทำหน้าที่คล้ายกาวที่เชื่อมเส้นใยไหมให้ติดกัน) รินน้ำล้างออก วางให้สะเด็ดน้ำ อบรังไหมให้แห้งภายในตู้อบ 37 องศาเซลเซียส 6-8 ชั่วโมง เก็บรังไหมแห้งในภาชนะพลาสติก เมื่อจะนำมาใช้ หยิบรังไหมแห้งออกมาชั่งน้ำหนักแล้วดึงเส้นใยไหมออกจากรังไหม เก็บเส้นใยไหมในภาชนะพลาสติกมีฝาปิดซึ่งจะใช้เป็นแบบหล่อโครงร่างไคโตซานผสมเส้นใยไหมต่อไป

2.1.4 สารเคมี

2.1.4.1 สารละลายกรดอซิติก ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์

2.1.4.2 สารละลายด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1 นอร์มอล

2.1.4.3 สารละลายโซเดียมไตรโพลีฟอสเฟส 10% ใช้สำหรับครอสลิงค์โครงสร้างไคโตซานของโครงร่างแบบอิออน

2.2 การเตรียมเจล 2% ไคโตซานและ เจล 2% ไคโตซานผสม

2.2.1 เตรียมเจล 2%ไคโตซานในกรดอซิติกความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ (น้ำหนัก : ปริมาตร) โดยการเทผงไคโตซานลงในสารละลายกรด คนให้เข้ากันนาน 20 นาทีจนได้เนื้อเจล

เนียนมีฟองอากาศอยู่ภายใน เจลไคโตซานถูกนำไปใช้ทำเจลไคโตซานผสม หรือนำไปขึ้นรูปโครงร่างต่อไป

2.2.2 เตรียมเจล 2%ไคโตซานผสมกับ 5% ผงเปลือกหอยเป๋าฮื้อ (ปริมาตร : น้ำหนัก)

2.2.3 เตรียมเจล 2%ไคโตซานผสมกับ 5%ผงเปลือกหอยเป๋าฮื้อ และผสมกับ 0.1% เส้นใยไหม (ปริมาตร : น้ำหนัก)

2.3 การขึ้นรูปโครงร่างชนิดแผ่นหนา

2.3.1 ใช้ถาดทำขนมพลาสติกรูปสี่เหลี่ยม ขนาด 10 x 10 x 1.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร ชนิดมีฝาปิด และชนิดทรงกระบอกใช้กระบอกฉีดยา ขนาด 20 มิลลิลิตร เป็นเบ้าหล่อแบบ

2.3.2 ใช้กระบอกฉีดยาขนาด 20 มิลลิลิตร ดูด 2%ไคโตซานเจล และ 2%เจลไคโตซานผสมผงเปลือกหอยเป๋าฮื้อ ลงในเบ้าหล่อแบบถาดๆ ละ100 มิลลิลิตร สำหรับ 2%เจลไคโตซานผสมผงเปลือกหอยเป๋าฮื้อและเส้นใยไหม ใช้กระบอกฉีดยาขนาด 20 มิลลิลิตร ดูด 2%เจลไคโตซานผสมผงเปลือกหอยเป๋าฮื้อ 100 มิลลิลิตร ใส่ลงในเบ้าหล่อแบบถาดที่มีเส้นใยไหมน้ำหนัก 0.1 กรัมวางแผ่กระจายอยู่

2.3.3 ปิดฝาถาดแบบหล่อ นำไปวางในตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส โดยวางให้อยู่ในระนาบแนวนอน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.4 การครอสลิงค์เจลแข็งด้วยสารละลาย10%โซเดียมไตรโพลีฟอสเฟส

2.4.1 นำแบบหล่อออกจากตู้แช่แข็ง เปิดก๊อกน้ำให้น้ำไหลผ่านด้านล่างและด้านข้างของแบบหล่อเพื่อละลายน้ำแข็งบริเวณขอบของเจลแข็งที่อยู่ชิดกับถาด

2.4.2 ใช้กระบอกฉีดยาขนาด 20 มิลลิลิตร ดูดสารละลาย10%โซเดียมไตรโพลีฟอสเฟส ฉีดลงไปบริเวณด้านข้างของเจลแข็งที่ชิดกับถาด โดยให้สารละลายแทรกลงไปถึงด้านล่างและเจลแข็งลอยตัวขึ้นมา ทิ้งไว้ 5 นาที เทสารเดิมออก แล้วเติมสารใหม่ให้คลุมด้านบนของโครงร่าง แช่ต่อไปอีก 20 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น 5 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที

2.4.3 การเก็บโครงร่างที่ครอสลิงค์ในลักษณะแช่แข็ง ทั้งชิ้นใหญ่ หรือตัดเป็นชิ้นเล็กขนาดต่างๆ แล้วนำกลับไปเก็บในตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมงหรือมากกว่าจนกว่าจะถูกนำมาใช้

2.4.4 การเก็บโครงร่างที่ครอสลิงค์ในลักษณะแห้ง (Figure 1) นำโครงร่างออกจากตู้แช่แข็ง นำไปทำให้แห้งโดยการไลโอฟิไลซ์ หรืออบแห้ง การไลโอฟิไลซ์ส่วนของน้ำจะระเหิดไปภายใต้ระบบสูญญากาศและอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง การอบแห้งส่วนของน้ำจะระเหยออกไปภายในตู้อบหรือวางบนแผ่นความร้อน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นเก็บโครงร่างในซองกระดาษ ปิดผนึกหรือใส่ลงในจานเพาะเลี้ยงขนาด 24 หลุม นำไปอบฆ่าเชื้อด้วยแก๊สโพลีเอทีลีน เป็นเวลา 6-8 ชั่วโมง เพื่อใช้ทดสอบต่อไป

3. ศึกษาลักษณะทางกายภาพได้แก่ รูปร่าง ความแข็งแรง การสลายตัว และการยอมให้เซลล์หรือของเหลวไหลผ่าน ของโครงร่างทั้ง 3 ชนิด ในห้องปฏิบัติการภายใต้สภาวะระดับน้ำตาลสูงเปรียบเทียบกับสภาวะปกติ

3.1 ศึกษาลักษณะทางกายภาพ ของเจลไคโตซานและไคโตซานผสม โดยสังเกตจากความหนืดขณะผสมและขณะที่เจลถูกดูดหรือฉีดออกจากกระบอกฉีดยาโดยผ่านรู (เส้นผ่าศูนย์กลาง 1.5 มิลลิเมตร) ของกระบอกฉีดยา ขนาด 20 มิลลิลิตร ปริมาตรของเจลภายหลังถูกแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง ปริมาตรของเจลแข็งที่ถูกครอสลิงค์แล้ว โครงร่างสภาพแห้งหลังถูกไลโอฟิไลซ์ และอบฆ่าเชื้อด้วยก๊าซโพลีเอที

ลีน โครงร่างสภาพเปียกเมื่อถูกนำไปแช่ในน้ำ/อาหารเลี้ยงเซลล์ หรือเมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ร่วมกับโครงร่างที่ระยะเวลาต่าง ๆ ความแข็งแรงของโครงร่างเมื่อถูกหยิบ จับ ยก เคลื่อนย้าย ด้วยมือหรือคีมสำหรับจับ/คีบ หรือถูกตัดด้วยกรรไกร หรือใบมีด การยอมให้ของเหลวไหลผ่าน การบวมน้ำ การยอมให้เซลล์ผ่าน การหดตัวเมื่อเสียน้ำ การติดสีย้อม Safranin O และ Toluidine blue และ สภาพความเป็นกรด-ด่างของเจล/โครงร่าง

3.2 วัดสภาพความเป็นกรด-ด่างของโครงร่าง ด้วยกระดาษวัด pH โดยจุ่มแถบกระดาษวัด pH ลงในเจลที่ผสมเสร็จแล้ว หรือวัด pH ของน้ำที่ใช้แช่โครงร่างในขั้นตอนการล้างโครงร่างภายหลังการถูก ครอสลิงค์ หรือสังเกตจากการเปลี่ยนแปลงของสีฟีนอลเรด ที่ใส่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ เมื่อนำโครงร่างมาแช่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีฟีนอลเรด หรือขณะเพาะเลี้ยงเซลล์ร่วมกับโครงร่าง ปรกติที่ pH เข้าใกล้ 7 หรือ เป็นกลาง (สีเหลืองอ่อน) ฟีนอลเรดเป็นสีแดงบานเย็น หากเป็นกรดจะเปลี่ยนเป็นสีส้มและสีเหลือง และถ้าเป็นด่างจะเป็นสีแดงบานเย็นถึงแดงเข้มหรือม่วง

4. เตรียมเก็บชิ้นเนื้อจากช่องปากได้แก่ เหงือก และเอ็นยึดปริทันต์ ของคนปกติและคนที่เป็นโรคเบาหวานขณะที่มีการควบคุมระดับน้ำตาลในเลือด

เตรียมน้ำยา (อาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่มียาปฏิชีวนะผสมอยู่) สำหรับเก็บชิ้นเนื้อที่รับบริจาค ใส่หลอดบรรจุมีฝาปิด ขนาด 15 มล. แช่หลอดสำหรับบรรจุชิ้นเนื้อด้วยน้ำแข็งไว้จนถึงเวลานำชิ้นเนื้อรับบริจาคมาใส่ นำหลอดบรรจุที่มีชิ้นเนื้อแช่น้ำแข็งตลอดเวลาจนมาถึงห้องปฏิบัติการ

ที่ห้องปฏิบัติการ ภายในตู้ไบโอเฮสาด (Biohazard) และเครื่องมือปลอดเชื้อ แยกเซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพันของเหงือกที่ติดอยู่บริเวณคอฟันของฟันที่ถูกถอนออกมา หรือชิ้นเหงือกที่ถูกตัดจากผู้บริจาคที่มารักษาทางปริทันต์ สำหรับเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ ใช้ใบมีดขูดเอ็นยึดปริทันต์ที่ติดอยู่รอบรากฟันออก ใช้มีดตัดชิ้นเนื้อเป็นชิ้นเล็ก ๆ ขนาด 1 x 1 ตารางมิลลิเมตร โดยเนื้อเยื่อต้องจุ่มอยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์

ตลอดเวลา ใส่ชิ้นเนื้อลงใน Flask ขนาด 150 มิลลิลิตร โดยใส่อาหารเลี้ยงเซลล์เพียงพอให้คลุมชิ้นเนื้อเป็นชั้นบาง ๆ เท่านั้น เพาะเลี้ยงเซลล์โดยใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM (ซึ่งเอื้อต่อการเจริญและแบ่งเซลล์ของเซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน) ที่มี 10% FBS (Fetal Bovine Serum), antibiotics และ antimycotic ผสมอยู่ด้วย เลี้ยงจนเซลล์เคลื่อนตัวออกมาจากชิ้นเนื้อ (Explant) เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 2-3 วัน จนได้จำนวนเซลล์เพียงพอ ใช้ทริปซิน (Trypsin) ทำให้เซลล์แยกตัวจากเซลล์อื่น และยกตัวจากพื้น Flask ที่เซลล์เกาะอยู่ ย้ายเซลล์โดยใช้หลอดแก้วดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีเซลล์ลอยอยู่ (Cell suspension) ไปใส่ใน Flask ขนาด 75 มิลลิลิตร เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ 15 มิลลิลิตร เซลล์ที่เพาะเลี้ยงนี้จัด เป็น Primary culture เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 2-3 วัน จนได้จำนวนเกือบเต็ม Flask จึงทำ Subculture ครั้งแรก เซลล์ที่ได้ จัดเป็นสายพันธุ์เซลล์ (Cell line) และ เป็นเซลล์รุ่นที่หนึ่ง (First passage) ซึ่งส่วนหนึ่งจะถูกเก็บในตู้แช่แข็ง -80 องศาเซลเซียส ส่วนที่เหลือเพาะเลี้ยงต่อเป็นเซลล์รุ่นที่สอง (Second passage) จนได้จำนวนเพียงพอสำหรับใช้ศึกษาในขั้นต่อไป เซลล์ที่นำมาศึกษาเป็นเซลล์เพาะเลี้ยงรุ่นที่ 3-7

5. ศึกษาพฤติกรรมของสายพันธุ์เซลล์ เนื้อเยื่อเกี่ยวพันของเหงือกของคนปรกติและผู้ป่วยเบาหวานที่อยู่ระหว่างการควบคุมระดับน้ำตาล เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ในจานเพาะเลี้ยงขนาด 24 หลุม ที่ระดับน้ำตาลกลูโคสปรกติเท่ากับ 5.4 มิลลิโมล (97.2 มก./ดล.) เป็นระยะเวลา 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, และ19 วัน ศึกษาความสามารถในการเจริญและแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเซลล์ เปรียบเทียบความหนาแน่นของเซลล์ในจานเพาะเลี้ยงขนาด 24 หลุม (เมื่อหว่านเซลล์ตั้งต้นที่จำนวน 3,000 เซลล์/มล., พื้นที่หลุมมีค่า 2.01 ตารางซม.) ที่สังเกตได้จากการย้อมเซลล์และศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง ร่วมกับการนับเซลล์ที่ระยะเวลาต่าง ๆโดยใช้ฮีโมไซโตมีเตอร์ (Hemocytometer) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับ และนำค่าที่นับได้มาแสดงเป็นโกรตเคิร์ฟกึ่งล็อค (Semi-Log Growth Curve)

6. ศึกษาผลของระดับน้ำตาลต่อเซลล์เพาะเลี้ยง ที่ระยะเวลาต่างๆ

เพาะเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพันของเหงือก ที่มาจากคนปรกติและคนที่เป็นเบาหวานที่อยู่ระหว่างการควบคุมระดับน้ำตาล ในจานเพาะเลี้ยงขนาด 24 หลุม (เมื่อหว่านเซลล์ตั้งต้นที่จำนวน 2,000 เซลล์/มล., พื้นที่หลุมมีค่า 2.01 ตารางซม.) ที่ระดับน้ำตาลกลูโคสปรกติและสูงกว่าปรกติ เท่ากับ 5.4 มิลลิโมล (97.2 มก./ดล.), 8.1 มิลลิโมล (145.8 มก./ดล.), 10.8 มิลลิโมล (194.4 มก./ดล.), 12.2 มิลลิโมล (219.6 มก./ดล.), 14.4 มิลลิโมล (259.2 มก./ดล.), 18.9 มิลลิโมล (340.2 มก./ดล.), 32.4 มิลลิโมล (583.2 มก./ดล.), และ 59.4 มิลลิโมล (1,069.2 มก./ดล.). เป็นระยะเวลา 1, 3, 5 หรือ 7, 10, และ 14 หรือ 18 วัน เซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพันของเหงือกของคนปรกติและผู้ป่วยเบาหวานที่อยู่ระหว่างการควบคุมระดับน้ำตาล สามารถเจริญและแบ่งตัวเพิ่มจำนวนได้ที่ความเข้มข้นของระดับน้ำตาลกลูโคสที่ศึกษา โดยมีความแตกต่างของความหนาแน่นของเซลล์ในจานเพาะเลี้ยงขนาด 24 หลุม ที่สังเกตได้จากการย้อมสีและศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงร่วมกับการนับเซลล์ที่ระยะเวลาต่างๆโดยใช้ฮีโมไซโตมีเตอร์ (Hemocytometer) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับ และนำค่าที่นับได้มาแสดงเป็นโกรตเคิร์ฟกึ่งล็อค (Semi-Log Growth Curve) และนำไปคำนวณหาค่าจำนวนรอบวงจรชีวิตของเซลล์ (Cell Cycle)

7. การทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพของโครงร่างไคโตซานผสมผงเปลือกหอยเป๋าฮื้อและใยไหมกับเซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพันของเหงือกของคนปรกติ และเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ของคนปรกติ โดยวิธี MTT

เพาะเลี้ยงเซลล์ร่วมกับโครงร่าง เป็นเวลา 2, 3, 8, 13, และ 18 วัน โดยเปลี่ยนอาหารใหม่ทุก 2-5 วัน โดยก่อนเปลี่ยน จะดูดอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์แต่ละชนิดร่วมกับโครงร่างและไม่มีโครงร่าง (ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุมเชิงบวก) มาทดสอบกับเซลล์ชนิดเดียวกันในจานเพาะเลี้ยงขนาด 96 หลุม ซึ่งลงเซลล์ไว้ ล่วงหน้า 1 วัน จำนวน 5,000 เซลล์/200 ไมโครลิตร/หลุม นำไปใส่ในตู้อบที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชม. ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกแล้วใส่สารละลาย MTT นำไปใส่ตู้อบ 3 ชม. ดูดสารละลาย MTT ออก ล้างด้วยสารละลาย

พีบีเอส แล้วเติมสารละลาย ดีเอมเอสโอ เพื่อทำให้เยื่อหุ้มของเซลล์แตกออก และสารฟอร์มาแซน [เป็นสารที่มีสีและเป็นสารที่เกิดจากปฏิกิริยารีดักชัน ระหว่าง เกลือเตตระโซเลี่ยม (MTT) กับเอนไซม์ ดีไฮโดรจีเนส และ รีดักเตส] ถูกปล่อยออกมาและถูกละลาย ได้สารละลายสีน้ำเงิน นำจานเพาะเลี้ยงขนาด 96 หลุมนี้ไปอ่านค่าดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่นแสง 540 นาโนเมตร นำค่าที่อ่านได้มาคำนวนค่าร้อยละของเซลล์ที่รอดชีวิต โดยเปรียบเทียบกับค่ามาตรฐาน (ค่าที่อ่านได้จากหลุมที่ไม่ได้ใส่อาหารที่ผ่านการเพาะเลี้ยงร่วมกับโครงร่างมาทดสอบ)

8. ทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพโครงร่าง 3 มิติที่ผลิตขึ้นกับเซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพันของเหงือก และเอ็นยึดปริทันต์ของคนปรกติและผู้ป่วยเบาหวานที่อยู่ระหว่างการควบคุมระดับน้ำตาล

เพาะเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพันของเหงือก และเอ็นยึดปริทันต์ของคนปรกติและผู้ป่วยเบาหวานที่อยู่ระหว่างการควบคุมระดับน้ำตาลโดยใช้ทรานซ์เวลล์อินเสิร์ต ขนาด 6.5 มม. ที่มีโพลีคาร์บอเนตเมมเบรนที่มีรูขนาด 0.4, 3, และ 8 ไมโครเมตร ร่วมกับจานเพาะเลี้ยงขนาด 24 หลุม นาน 1, 5, 7 และ 14 วัน ในสภาวะที่อาหารเพาะเลี้ยงเซลล์มีระดับน้ำตาลกลูโคสปรกติคือ 5.4 มิลลิโมล (97 มก./ดล.) เปรียบเทียบกับ ระดับน้ำตาลกลูโคสสูงปานกลาง (ความเข้มข้นของกลูโคสสูงกว่าปรกติ 3.4 เท่า) คือ 19 มิลลิโมล (340 มก./ดล.). ณ จุดของเวลาที่กำหนด ทำการย้อมสี เซลล์ เมมเบรน และ โครงร่าง ด้วย Toluidine blue ศึกษาโครงร่าง เซลล์ที่อยู่ภายในของทรานซ์เวลล์อินเสิร์ต (ด้านบนของแผ่นโพลีคาร์บอเนตเมมเบรน) และเซลล์ที่อยู่ด้านนอก(ด้านล่างของแผ่นโพลีคาร์บอเนตเมมเบรน) ของทรานซ์เวลล์อินเสิร์ต ภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ และกล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนแบบส่องกราด และถ่ายภาพไว้