

Abstract

Project Code: MRG5180020

Project Title: Effects of High Sugar Levels on Human Gingival Fibroblasts and Periodontal Ligament Cells Cultured on 3D Chitosan and Chitosan Mixture Scaffolds

Investigator: Pannee Ochareon Faculty of Dentistry, Mahidol University

Yindee Kitiyanant Faculty of Science, Mahidol University

E-mail Address: dtpoc@mahidol.ac.th

scykt@mahidol.ac.th or yindee.kitiyanant@gmail.com

Project Period: May 14, 2008 – August 24, 2012

Abstract:

Cell amplification *ex vivo* is desirable to expedite tissue engineering processes. Chitosan, a derivative of chitin, has been widely fabricated as scaffolds for tissue regeneration. Diabetes mellitus affects a large group of population, who could have benefit from tissue engineering. However, little information has been available for culturing tissues derived from diabetic donors. We investigated the effects of glucose levels (5.4 mM to 59 mM or 97 mg/dl to 1,069 mg/dl) on cultured gingival fibroblasts and periodontal ligament cells from controlled diabetic and non-diabetic donors in the presence vs. absence of chitosan mixture scaffolds (Chitosan with abalone-shell-powder and silk fibers). Cells were seeded in 24-well plates, with or without scaffolds and transwell inserts of three different pore-size-polycarbonate-membranes (0.4, 3, and 8 μ m). Cell attachment, proliferation, and migration were studied under light and scanning electron microscopes at time points between day 1 and 19. The numbers of cells

were counted using a hemocytometer and plotted as growth curves. The results showed that gingival fibroblasts and periodontal ligament cells exhibited different preferences for glucose levels. Despite variations among donors, proliferative activities could be grouped as high, moderate, and low. Cultured gingival fibroblasts and periodontal ligament cells in normal (5.4 mM or 97 mg/dl) or moderately high (19 mM or 340 mg/dl) glucose levels and in the presence or absence of scaffolds could migrate to the bottom of 3 and 8 μ m-pore-size-membranes starting at day 5 as observed under a stereomicroscope. In conclusion, cells from controlled diabetic and non-diabetic donors could be amplified *in vitro* on chitosan mixture scaffolds with normal up to moderately high (19 mM or 340 mg/dl) but not high (32 mM or 583 mg/dl) and very high glucose levels (59 mM or 1,069 mg/dl).

Keywords: Chitosan, diabetes mellitus, gingiva, glucose, scaffold

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : MRG5180020

ชื่อโครงการ : ผลของสภาวะระดับน้ำตาลสูงต่อเซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพันของเหงือกและ

เอ็นยึดปริทันต์ของคน เพาะเลี้ยงบนโครงร่าง 3 มิติของโคโตซานและโคโตซานผสม

ชื่อนักวิจัย : 1. นางสาวพรณี ออเจริญ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

2. ศาสตราจารย์ ยินดี กิตยานันท์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

E-mail Address : dtpoc@mahidol.ac.th

scykt@mahidol.ac.th หรือ yindee.kitivanant@gmail.com

ระยะเวลาโครงการ : 14 พฤษภาคม 2551 ถึง 24 สิงหาคม 2555

บทคัดย่อ :

ผู้ป่วยเบาหวานเป็นประชากรกลุ่มใหญ่ที่ได้รับผลกระทบจากการที่มีระดับน้ำตาลในเลือดสูงเป็นเวลานานและมักสูญเสียอวัยวะโดยถูกผ่าตัดออกไป วิศวกรรมเนื้อเยื่อเป็นศาสตร์ประยุกต์การสร้างเนื้อเยื่อใหม่ โดยการนำเซลล์มาเพาะเลี้ยงบนโครงร่างนอกร่างกายภายใต้สภาวะที่เอื้อต่อการแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนและมีพัฒนาการไปทำหน้าที่เฉพาะ จากนั้นโครงร่างและเซลล์จะถูกนำกลับไปปลูกถ่ายในร่างกาย หากขั้นตอนนี้ใช้เวลาสั้น การสร้างเนื้อเยื่อใหม่ก็จะเกิดได้เร็วขึ้น ผู้ป่วยเบาหวานน่าจะได้รับประโยชน์จากวิศวกรรมเนื้อเยื่อ หากทว่าข้อมูลเกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงเซลล์ของผู้ป่วยเบาหวานมีไม่มาก และยังมีประเด็นขัดแย้งในด้านความสามารถในการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนและการหายของแผล ผู้วิจัยศึกษาผลของระดับน้ำตาลที่พบในคนปกติ (5.4 มิลลิโมล หรือ 97 มก./ดล.) ถึงระดับสูงกว่าปกติประมาณ 10.7 เท่า (59 มิลลิโมล หรือ 1,069 มก./ดล.) ต่อเซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพันของเหงือกและเอ็นยึดปริทันต์ของคนปกติและผู้ป่วยเบาหวานที่อยู่ระหว่างการควบคุมระดับน้ำตาล เพาะเลี้ยงในจานเพาะเลี้ยงขนาด 24 หลุม และ/หรือ บนโครงร่าง 3 มิติของโคโตซานและโคโตซานผสมผงเปลือกหอยเป่าชื่อ ร่วมกับเส้นใยไหม หรือร่วมกับโพลีคาร์บอเนตเมมเบรนในทรานซ์เวลล์อินเสิร์ต ศึกษาการยึด

เกาะ การเพิ่มจำนวนและการเคลื่อนที่ของเซลล์ผ่านรูของเมมเบรน ขนาด 0.4, 3 และ 8 ไมโครเมตร ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงและกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด นับจำนวนเซลล์ที่ระยะเวลาต่าง ๆ จาก 1-19 วัน และแสดงค่าการเพิ่มจำนวนเซลล์ด้วยโกรทเคิร์ฟกึ่งลอค ผลการศึกษาพบว่าเซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพันของเหงือกและเอ็นยึดปริทันต์ของคนปกติและผู้ป่วยเบาหวานที่อยู่ระหว่างการควบคุมระดับน้ำตาล สามารถเจริญแบ่งตัวเพิ่มจำนวนได้เมื่อเพาะเลี้ยงที่ระดับน้ำตาลที่ศึกษา แต่มีความแตกต่างของความหนาแน่นของเซลล์ ความสามารถในการเพิ่มจำนวนเซลล์ขึ้นกับแต่ละบุคคล โดยแบ่งได้ 3 ระดับคือ สูง ปานกลาง และ ต่ำ และพบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ทั้งสองชนิดร่วมกับโครงร่างและเมมเบรน ที่ระดับน้ำตาลปกติและระดับสูงกว่าปกติประมาณ 3.4 เท่า (19 มิลลิโมล หรือ 340 มก./ดล.) นาน 1, 5, และ 7 วัน เซลล์สามารถเคลื่อนผ่านรูของเมมเบรน ขนาด 3 และ 8 ไมโครเมตร ซึ่งพบได้ในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยงเซลล์ แต่เซลล์ไม่สามารถผ่านรูที่มีขนาด 0.4 ไมโครเมตร ทุกช่วงเวลาที่เพาะเลี้ยงเซลล์ จากการสังเกตด้านล่างของโพลีคาร์บอเนตเมมเบรนภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ นอกจากนี้ภาพถ่ายอิเล็กตรอนแบบส่องกราด แสดงถึงความเข้ากันได้ทางชีวภาพของโครงร่างไคโตซานและไคโตซานผสมต่อเซลล์ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับโครงร่าง โดยเซลล์สามารถยึดเกาะบนโครงร่างและเจริญแบ่งตัวเพิ่มจำนวน ณ. เวลาต่างๆที่ศึกษา สรุปได้ว่าสามารถเพาะเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพันของเหงือกและเอ็นยึดปริทันต์ของคนปกติและผู้ป่วยเบาหวานที่อยู่ระหว่างการควบคุมระดับน้ำตาล ร่วมกับโครงร่างไคโตซานและไคโตซานผสมในสภาวะระดับน้ำตาลปกติถึงสูงปานกลาง (19 มิลลิโมล หรือ 340 มก./ดล.) ส่วนระดับน้ำตาลที่สูง (32 มิลลิโมล หรือ 583 มก./ดล.) ถึงสูงมาก (59 มิลลิโมล หรือ 1,069 มก./ดล.) จะส่งผลเสียต่อเซลล์

คำหลัก: กลูโคส, ไคโตซาน, โครงร่าง, เบาหวาน, เหงือก