Executive Summary

ผู้ป่วยโรคเบาหวานเป็นประชากรกลุ่มใหญ่ ที่มีการสูญเสียเนื้อเยื่อหรืออวัยวะของร่างกาย โดยมีสาเหตุจากการลุกลามของแผลที่หายยากอันเนื่องมาจากสภาวะที่ร่างกายมีระดับน้ำตาลในเลือดสูงและไม่มีการควบคุม จนต้องตัดชิ้นส่วนของร่างกายออกไป ผู้ป่วยเบาหวานที่ควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดได้ดีจะมีความเสี่ยงต่อการเกิดอาการแทรกซ้อนต่ำกว่าผู้ป่วยเบาหวานที่ควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดได้ไม่ดี ดังนั้นการควบคุมระดับน้ำตาล (Glycemic control) ให้มีค่าอยู่ในระดับต่ำในผู้ที่เป็นเบาหวานหรือผู้ที่เสี่ยงต่อการเป็นเบาหวานเป็นสิ่งจำเป็น หากสามารถควบคุมให้อยู่ในระดับใกล้เคียงกับเกณฑ์ปรกติของผู้ไม่เป็นเบาหวานนับได้ว่าอยู่ในระดับที่ดีเยี่ยม หากทว่าส่วนใหญ่แล้ว การควบคุมระดับน้ำตาลที่ยอมรับว่าอยู่ในระดับที่ควบคุมได้มักมีค่าสูงกว่าเกณฑ์ ดังนั้นค่าที่ควบคุมได้และถือว่าดี จึงขึ้นกับอายุผู้ป่วย และ ความอ่อนแอของผู้ป่วยต่อภาวะระดับน้ำตาลสูง

องค์การอนามัยโลก (WHO) กำหนดเกณฑ์การพิจารณาระดับน้ำตาลในเลือดดังนี้: ปรกติคือ 80-100 มก./ดล. (หลังงดอาหารก่อนวัดระดับน้ำตาล 8-12 ชม.) หรือค่าเท่ากับ 200 มก./ดล. หรือ ต่ำกว่า (หลังรับประทานอาหาร postprandial) กลุ่มเสี่ยงต่อเบาหวานคือ 100-126 มก./ดล. (หลังงดอาหาร) กลุ่มผู้เป็นเบาหวานคือ สูงกว่า 126 มก./ดล. (หลังงดอาหาร) ค่าฮีโมโกลบินเอหนึ่งซี (HbA1c) มักใช้เพื่อติดตามดูว่าการควบคุมระดับน้ำตาลในช่วงระยะเวลา 2-3 เดือนที่ผ่านมาว่าเป็นอย่างไร หากควบคุมระดับน้ำตาลได้ดีจะมีค่าฮีโมโกลบินเอหนึ่งซี ต่ำกว่า 7% ค่า HbA1c ของผู้ที่มีเมตาโบลิซึมของน้ำตาลปรกติ มีค่าระหว่าง 4-6% ผู้ที่มีระดับน้ำตาลในเลือดที่สูงเกินเกณฑ์ปรกติแต่ยังไม่มีอาการแสดงออกของโรค หากปล่อยทิ้งไว้ให้เรื้อรัง เนื้อเยื่อของร่างกายจะมีอาการแทรกซ้อนต่างๆ แสดงออกมา

งานวิศวกรรมเนื้อเยื่อเป็นเทคโนโลยีที่ช่วยเสริมสร้างเนื้อเยื่อหรืออวัยวะขึ้นมาใหม่เพื่อทดแทนส่วนเดิมที่ขาดหายหรือถูกทำลายไป คณะผู้วิจัยได้วิจัยพัฒนาโครงร่างสำหรับงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อจาก

วัสดุชีวภาพที่หาได้ง่ายในประเทศและมีราคาถูก ผลิตเป็นโครงร่างที่มีส่วนผสมของไคโตซานและไคโตซานเสริมด้วยวัสดุชีวภาพชนิดอื่น เช่น ผงเปลือกหอยเป๋าฮื้อ (Abalone shell powder) และ/ หรือ เส้นใยไหม (Silk) โครงสร้างของโครงร่างถูกเชื่อมโยงกัน (ครอสลิงค์) ด้วยอิออนโดยการแช่โครงร่างด้วยสารละลายโซเดียมไตรโพลีฟอสเฟส ทำให้ได้โครงร่างที่มีความแข็งแรงและยืดหยุ่นต่างๆ กัน ซึ่งดีกว่าโครงร่างที่ไม่ได้ถูกครอสลิงค์ การเติมผงเปลือกหอยเป๋าฮื้อจะเปลี่ยนโครงสร้างของโครงร่างไคโตซาน โดยที่ผงเปลือกหอยเป๋าฮื้อถูกยึดไว้กับโครงร่างไคโตซานซึ่งมีไคโตซานทำหน้าที่คล้ายกาว เมื่อส่วนผสมที่เป็นน้ำระเหิดไป โครงร่างจึงไม่แบนแฟบเข้าหากัน

ผลการศึกษาจากโครงการนี้พบว่าการเพาะเลี้ยงเซลล์ ที่มาจากคนปรกติ (เซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพันของเหงือก, n = 3; เซลล์เอ็นยึดปริทันต์, n = 3) และคนที่เป็นเบาหวานที่อยู่ระหว่างการควบคุมระดับน้ำตาล (เซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพันของเหงือก, n = 7; เซลล์เอ็นยึดปริทันต์, n = 1) ในจานเพาะเลี้ยงขนาด 24 หลุม ที่ระดับน้ำตาลกลูโคสปรกติเท่ากับ 5.4 มิลลิโมล (97.2 มก./ดล.) มีความผันแปรของการเจริญเติบโตและความสามารถในการแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนของเซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพันของเหงือกของผู้บริจาคเนื้อเยื่อเป็นรายบุคคล โดยพบว่ามีทั้ง เซลล์จากผู้สูงอายุและอายุน้อยที่เป็นเบาหวานที่อยู่ระหว่างการควบคุมระดับน้ำตาล และเซลล์จากผู้ที่มีระดับน้ำตาลปรกติ ที่สามารถเจริญเติบโตและแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนได้เร็ว ปานกลาง และช้า ไม่แตกต่างกัน

การเพาะเลี้ยงเซลล์ ที่มาจากคนปรกติและคนที่เป็นเบาหวานที่อยู่ระหว่างการควบคุมระดับน้ำตาล ในจานเพาะเลี้ยงขนาด 24 หลุม 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.). พบว่า เมื่อเลี้ยงเซลล์เป็นระยะเวลา 1, 3, 7, 10, 14, และ18 วัน เซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพันของเหงือกของคนปรกติและผู้ป่วยเบาหวานที่อยู่ระหว่างการควบคุมระดับน้ำตาล สามารถเจริญและแบ่งตัวเพิ่มจำนวนได้ที่ความเข้มข้นของระดับน้ำตาลกลูโคสที่

ศึกษา (ปรกติ ถึง 10.7 เท่าของปรกติ) โดยมีความแตกต่างของความหนาแน่นของเซลล์ในจานเพาะเลี้ยงขนาด 24 หลุม ที่สังเกตได้จากการย้อมเซลล์ และศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงร่วมกับการนับเซลล์ที่ระยะเวลาต่างๆโดยใช้ฮีโมไซโตมีเตอร์ (Hemocytometer) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับ และนำค่าที่นับได้มาแสดงเป็นโกรตเคิร์ฟกึ่งล็อค (Semi-Log Growth Curve) จาก โกรตเคิร์ฟกึ่งล็อค สามารถจำแนกเซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพันของเหงือกตามความสามารถในการแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวน (Proliferative activity) ณ วันที่ 14 และ 18 ของการเพาะเลี้ยงได้เป็น 3 กลุ่ม คือความสามารถสูง (High), ปานกลาง (Moderate) และ ต่ำ (Low) โดยกลุ่มที่มีความสามารถในการเพิ่มจำนวนสูง มีค่าคำนวณจำนวนรอบเซลล์ (Cell Cycle) ประมาณ 8-9 รอบ, ปานกลาง มีค่าคำนวณจำนวนรอบเซลล์ประมาณ 6 รอบถึงต่ำกว่า 8 รอบ, ต่ำ มีค่าคำนวณจำนวนรอบเซลล์ ประมาณต่ำกว่า 6 รอบ และจากวันที่ 14 ถึงวันที่ 18 กลุ่มที่มีความสามารถสูง มีแนวโน้มเพิ่มจำนวนได้อีก (Exponential phase), กลุ่มที่มีความสามารถปานกลาง เข้าช่วงที่เซลล์หยุดแบ่งเซลล์เนื่องจากเซลล์อยู่ชิดกันมากจนเกิด contact inhibition ขึ้น (Plateau phase) กลุ่มที่มีความสามารถต่ำแม้มีแนวโน้มเพิ่มจำนวนได้อีก และยังอยู่ในเอ็กซโพเนนเชียลเฟสแต่มีความสามารถในการเพิ่มจำนวนต่ำ

การเพาะเลี้ยงเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ ที่มาจากคนปรกติ (n = 3) และคนที่เป็นเบาหวานที่อยู่ระหว่างการควบคุมระดับน้ำตาล (n = 1) มีขนาดของกลุ่มตัวอย่างที่ศึกษาน้อยมาก เนื่องจากเซลล์ที่ได้จากฟันที่ถูกถอนของผู้บริจาคส่วนใหญ่มีเนื้อเยื่อปริทันต์เหลืออยู่น้อยมาก เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงประสบปัญหาหลายประการ เช่น ขนาดของเนื้อเยื่อไม่เพียงพอที่จะใช้เพาะเลี้ยง เซลล์เจริญเติบโตช้าหรือแบ่งตัวเพิ่มจำนวนได้ไม่เพียงพอ หรือเพาะเลี้ยงไประยะหนึ่งมีการติดเชื้อแบคทีเรีย แม้จะมีผู้เข้าร่วมโครงการบริจาคทั้งหมด 31 รายก็ตาม ด้วยเหตุนี้ การวางแผนเก็บเนื้อเยื่อไว้ล่วงหน้าเพื่อใช้ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อ หากเป็นไปได้ ควรเก็บฟันที่วางแผนว่าจะต้องถอนเพื่อการจัดฟัน ไว้สำหรับบุคคลนั้น ซึ่งฟันเหล่านี้มักเป็นฟันที่อยู่ในสภาพดีไม่มีพยาธิสภาพ ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปริทันต์และทำโกลตเคิร์ฟ เพื่อดูศักยภาพในการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์ก่อนนำไปเก็บแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 องศา

เซลเซียส และนำออกมาใช้ในคราวจำเป็นโดยก่อนนำมาใช้ นำเซลล์ออกจากตู้แช่แข็ง มาเพาะเลี้ยงและทำโกรตเคิร์ฟ เพื่อดูศักยภาพในการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์ภายหลังการนำไปเก็บแช่แข็งเป็นเวลานานว่ายังสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้หรือไม่

โครงร่าง 3 มิติที่ผลิตขึ้นได้ผ่านการทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพกับเซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพันของเหงือกของคนปรกติ และเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ของคนปรกติ โดยวิธี MTT โดยนำอาหารที่มีระดับน้ำตาลปรกติที่ผ่านการเพาะเลี้ยงร่วมกับโครงร่างมาทดสอบกับเซลล์ชนิดเดียวกันในจานเพาะเลี้ยงขนาด 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 แล้วเติม สารละลาย ดีเอมเอสโอ เพื่อทำให้เยื่อหุ้มของเซลล์แตกออก และสารฟอร์มาแซนถูกละลาย ได้สารละลายสีน้ำเงิน นำจานเพาะเลี้ยงขนาด 96 หลุมนี้ไปอ่านค่าดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่นแสง 540 นาโนเมตร นำค่าที่อ่านได้มาคำนวนค่าร้อยละของเซลล์ที่รอดชีวิต โดยเปรียบเทียบกับค่ามาตรฐาน (ค่าที่อ่านได้จากหลุมที่ใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่ได้ผ่านการเพาะเลี้ยงร่วมกับโครงร่างมาทดสอบ) เนื่องจากต้องใช้ เซลล์จำนวนมากในการทำ MTT assay จึงไม่สามารถทดสอบกับเซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพันของเหงือก และ เซลล์เนื้อเยื่อปริทันต์ของคนที่เป็นเบาหวานที่อยู่ระหว่างการควบคุมระดับน้ำตาลได้ เนื่องจากมีเซลล์จำนวนจำกัด และยังต้องใช้เซลล์อีกจำนวนมากในการเพาะเลี้ยงร่วมกับโครงร่าง 3 มิติ

โครงร่าง 3 มิติที่ผลิตขึ้นได้ผ่านการทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพกับเซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพันของเหงือก และเอ็นยึดปริทันต์ของคนปรกติและผู้ป่วยเบาหวานที่อยู่ระหว่างการควบคุมระดับน้ำตาล เพาะเลี้ยงโดยใช้ทรานซ์เวลล์อินเสิร์ต 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 ระดับสูงปานกลาง คือ 19 มิลลิโมล (340 มก./ดล. หรือสูงกว่าปรกติประมาณ 3.4 เท่า). พบว่าเซลล์ทั้งสองชนิดไม่

สามารถแทรกผ่านเมมเบรนที่มีรูขนาด 0.4 ไมโครเมตร ทุกช่วงเวลาที่ศึกษา ณ วันที่ 5 เริ่มสังเกตพบเซลล์ทางด้านล่างของเมมเบรนที่มีรูขนาด 3 และ 8 ไมโครเมตร โดยพบว่ารูที่มีขนาดใหญ่มีเซลล์ผ่านมาทางด้านล่างมากกว่า และพบว่าเซลล์มีจำนวนมากขึ้น ณ วันที่ 7 และ 14 ตามลำดับ

ผลจากการศึกษาโครงการนี้ พบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพันของเหงือกที่นำมาจากผู้บริจาคที่มีระดับน้ำตาลในเลือดปรกติ และสูงกว่าปรกติ โดยเพาะเลี้ยงร่วมกับอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีระดับน้ำตาลผันแปรจาก ระดับปรกติ ถึงสูงกว่าปรกติเล็กน้อย สูงกว่าปรกติปานกลาง หรือ สูงกว่าปรกติมาก พบว่า เซลล์ที่คุ้นเคยกับสภาวะระดับน้ำตาลปรกติหรือสูงกว่าปรกติเล็กน้อยสามารถเจริญ แบ่งตัวเพิ่มจำนวนได้ดีที่ระดับน้ำตาลปรกติหรือสูงกว่าปรกติเล็กน้อย (1.4-2.2 เท่า) ถึงปานกลาง (2.59-3.4 เท่า) ส่วนระดับน้ำตาลที่สูงกว่าปรกติมาก (5.8-10.7 เท่า) ส่งผลกระทบต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์แบบกระทันหันในช่วงแรกของการเพาะเลี้ยงอย่างชัดเจนและส่งผลต่อเนื่องไปจนถึงวันที่ 14 ของการเพาะเลี้ยง

การศึกษาศักยภาพของเซลล์ของผู้เป็นโรคเบาหวานโดยการเพาะเลี้ยงเซลล์ในห้องปฏิบัติการและการทำโกรตเคิร์ฟ รวมถึงการทราบค่าระดับน้ำตาลที่ผู้ป่วยเบาหวานสามารถควบคุมได้ จะเป็นข้อมูลสำคัญที่จะช่วยในการตัดสินใจว่าควรทำวิศวกรรมเนื้อเยื่อในผู้ป่วยเบาหวานที่สามารถควบคุมระดับน้ำตาลรายใดบ้าง ทำให้บุคคลกลุ่มนี้ไม่ต้องพลาดโอกาสหากมีความจำเป็นที่จะต้องทำวิศวกรรมเนื้อเยื่อ