

บทสรุปและวิจารณ์

จากโครงการวิจัยนี้ ทำให้ได้สายพันธุ์เซลล์ของเซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพันของเหงือก จำนวน 10 สายพันธุ์เซลล์ (ปกติ 3 สายพันธุ์เซลล์, เบาหวานที่ควบคุมระดับน้ำตาล 7 สายพันธุ์เซลล์) และเป็นสายพันธุ์เซลล์เอ็นยิดปริทันต์ 4 สายพันธุ์เซลล์ (3 สายพันธุ์เซลล์ปกติ, 1 สายพันธุ์เซลล์เบาหวานที่ควบคุมระดับน้ำตาล) จากผู้บริจาครวมทั้งสิ้นจำนวน 31 ราย (12 ราย เป็นผู้ที่ไม่ได้เป็นเบาหวาน และ 19 ราย เป็นเบาหวานที่ควบคุมระดับน้ำตาล) ความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงเซลล์จนได้เป็นสายพันธุ์เซลล์เท่ากับ 50% จากผู้ที่ไม่ได้เป็นเบาหวาน และประมาณ 42% จากผู้เป็นเบาหวานที่ควบคุมระดับน้ำตาล ดังนั้นจะเห็นได้ว่า ผู้ที่ไม่ได้เป็นเบาหวานและผู้เป็นเบาหวานที่ควบคุมระดับน้ำตาล ต่างก็มีโอกาสจะนำไปเพาะเลี้ยงจนได้เป็นสายพันธุ์เซลล์ ใกล้เคียงกัน ความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงที่ได้จากการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ค่อนข้างต่ำเนื่องจากไม่ได้มีการกำหนดการคัดเลือกเนื้อเยื่อที่ได้รับบริจาค และเป็นพื้นที่ผู้ป่วยต้องการถอน ซึ่งอยู่ในสภาพต่าง ๆ กัน

เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ในจานเพาะเลี้ยงขนาด 24 หลุม ซึ่งหว่านเซลล์ตั้งต้นที่จำนวน 3,000 เซลล์/มล., พื้นที่หลุมมีค่า 2.01 ตารางซม. ที่ระดับน้ำตาลกลูโคสปกติเท่ากับ 5.4 มิลลิโมล (97.2 มก./ดล.) เป็นระยะเวลา 1-19 วัน เซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพันของเหงือกของคนปกติและผู้ป่วยเบาหวานที่อยู่ระหว่างการควบคุมระดับน้ำตาล มีค่าผันแปรไปต่าง ๆ กัน โดยเซลล์สามารถเจริญและแบ่งตัวเพิ่มจำนวนได้ และมีความแตกต่างของจำนวนเซลล์ที่นับได้เป็นช่วงกว้างอยู่ระหว่าง 3.5 เท่าถึง 10 เท่า และเมื่อเพาะเลี้ยงในจานเพาะเลี้ยงชนิด 24 หลุม (โดยหว่านเซลล์ตั้งต้นที่จำนวน 2,000 เซลล์/มล., พื้นที่หลุมมีค่า 2.01 ตารางซม.) และเพาะเลี้ยงต่อไปเป็นเวลานาน 1 ถึง 18 วัน หลังการลงเซลล์เริ่มต้น 1 วัน จึงเริ่มเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ค่าระดับน้ำตาลต่าง ๆ กัน (เริ่มจาก 5.4 มิลลิโมล ถึง 59.4 มิลลิโมล) พบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงที่ระยะเวลา 1 วัน เซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพันของเหงือกจะมีจำนวนรอบของวงจรของเซลล์ระหว่างค่าติดลบ ถึง 2 รอบ (ค่าสูงสุดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงที่ระดับน้ำตาลกลูโคสอย่างน้อย 1 ค่าระดับ ที่ใช้

เพาะเลี้ยง ค่าติดตามแสดงให้เห็นว่าเซลล์จำนวนหนึ่งไม่สามารถทนต่อวิธีการเพาะเลี้ยงได้ ทำให้มีจำนวนเซลล์ที่เกาะพื้นหลุมเพาะเลี้ยงมีจำนวนน้อยและเซลล์ที่นับได้จึงน้อยกว่าที่ลงไว้ตอนต้น

เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 14-18 วัน พบว่าเซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพันของเหงือกจะมีจำนวนรอบของวงจรของเซลล์ระหว่าง 6 ถึง ต่ำกว่า 8 รอบ และ ณ วันที่ 18 ได้ค่าสูงสุด ระหว่าง 8-9 รอบ ซึ่งประมาณได้เท่ากับ หนึ่งล้านเซลล์ที่ช่วงระดับน้ำตาลที่ใช้เพาะเลี้ยง ดังนั้นการเพาะเลี้ยงเซลล์ในห้องปฏิบัติการอาจต้องคำนึงถึงระดับน้ำตาลกลูโคสที่ใส่เพิ่มในอาหารเลี้ยงเซลล์ว่าควรปรับให้เหมาะสมกับเซลล์ที่เคยมีประสบการณ์อยู่หรือคุ้นเคยกับระดับน้ำตาลระดับอย่างไรมาก่อน เซลล์ที่คุ้นเคยกับสภาวะระดับน้ำตาลปกติหรือสูงกว่าปกติเล็กน้อยสามารถเจริญ แบ่งตัวเพิ่มจำนวนได้ดีที่ระดับน้ำตาลปกติหรือสูงกว่าปกติเล็กน้อย (1.4-2.2 เท่า) ถึงปานกลาง (2.59-3.4 เท่า) ส่วนระดับน้ำตาลที่สูงกว่าปกติมาก (5.8-10.7 เท่า) ส่งผลกระทบต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์แบบกระทันหันในช่วงแรกของการเพาะเลี้ยงอย่างชัดเจนและส่งผลต่อเนื่องไปจนถึงวันที่ 14-18 ของการเพาะเลี้ยง

การประมาณค่าจำนวนรอบวงจรชีวิตของเซลล์ในการศึกษานี้ อาศัยสมมุติฐานที่ว่าเซลล์ที่เกาะที่พื้นของหลุมเพาะเลี้ยงเซลล์ล้วน อยู่ในวงจรชีวิตของเซลล์ (Cell cycles) ซึ่งหมายความว่า เซลล์อาจอยู่ในระยะ G1, S, G2, หรือ M และจำนวนเซลล์ที่เพิ่มขึ้นเกิดจากการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส

ค่าจำนวนรอบวงจรชีวิตของเซลล์ แสดงถึง ระยะเวลารวมทั้งเซลล์ใช้ในการแบ่งตัวเพิ่มจำนวน ณ จุดตั้งต้นเดียวกัน หากมีการกำหนดให้เซลล์สามารถเข้าสู่ระยะเดียวกันในวงจรชีวิตของเซลล์ เช่นทำให้เซลล์อยู่ในระยะ S phase หรือ M phase ที่จุดตั้งต้นก่อน สำหรับการศึกษาไม่ได้ทำให้เซลล์อยู่ในระยะเดียวกันที่จุดเริ่มต้น ดังนั้น จำนวนเซลล์ที่นับได้แสดงถึงเซลล์ที่เพิ่มขึ้นโดยการแบ่งเซลล์ ค่าจำนวนเซลล์ที่นับได้ขึ้นกับปัจจัยต่างๆ เช่น 1. จำนวนเซลล์ที่สามารถเกาะพื้นหลุมเพาะเลี้ยงในช่วงแรกภายหลังการลงเซลล์ หากมีจำนวนมาก อาจส่งผลต่อจำนวนเซลล์ในเวลาต่อมา 2. เซลล์ที่เกาะพื้นหลุมเพาะเลี้ยงสามารถแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนได้ในอัตราเร็วช้าแตกต่างกัน 3. เซลล์ที่แบ่งตัวบางเซลล์ยังคงความสามารถในการแบ่งตัวได้เร็วช้าแตกต่างกัน (G1, S, G2, และ M สั้น หรือไม่ยืดเยื้อหรือถูก

ขัดขวาง) 4. เซลล์ที่เกาะที่พื้นหลุมเพาะเลี้ยงออกจากวงจรชีวิตของเซลล์ หรือเจริญพัฒนาไป (Differentiate) ซึ่งมีผลให้ไม่สามารถเพิ่มจำนวนได้อีกต่อไป

รูปแบบการเรียงตัวของเซลล์ ในทรานซ์เวลล์อินเสิร์ตที่มีเมมเบรนที่มีรูขนาด 0.4 ไมโครเมตร มีลักษณะหนาแน่นมาก และเมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์นานขึ้น พบการติดสีที่บของกลุ่มเซลล์และ/หรือสารที่เซลล์สร้างขึ้น มีลักษณะต่าง ๆ เช่น เป็นจุดเล็ก ๆ (Grain) เป็นเส้น (Line) เป็นแถบ (Band) เป็นกลุ่ม (Aggregate) หรือ รวมเป็นปื้น (Patch) เนื่องจาก เซลล์ไม่สามารถผ่านรูของเมมเบรนที่มีขนาด 0.4 ไมโครเมตร ซึ่งยอมให้สารต่าง ๆ ผ่านได้แต่เซลล์ผ่านไม่ได้ เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์นานขึ้น เซลล์สร้างสารออกมานอกเซลล์ (Extracellular matrix) และสะสมอยู่ทางด้านบนของเมมเบรน ในทรานซ์เวลล์อินเสิร์ต ดังนั้นเมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ในสภาวะเดียวกัน ระยะเวลาเท่ากัน เซลล์สามารถเคลื่อนผ่านรูของเมมเบรนที่กว้าง 3 และ 8 ไมโครเมตร ลงไปด้านล่างได้ ทำให้ความหนาแน่นของเซลล์ในทรานซ์เวลล์อินเสิร์ตเบาบางลง โดยปรกติแล้วหากเป็นจานเพาะเลี้ยงที่ไม่ได้ใช้ทรานซ์เวลล์อินเสิร์ต เมื่อเซลล์เพิ่มจำนวนขึ้นจนเต็มหลุมจะเกิด Contact inhibition และเกิดการม้วนตัวที่ขอบและมีการหลุดลอก แต่เซลล์ที่เพาะเลี้ยงในทรานซ์เวลล์อินเสิร์ตจะมีทางออกไปอยู่ทางด้านล่างถ้ารูของเมมเบรนมีขนาดใหญ่พอที่เซลล์จะบีบตัวลอดผ่านไปได้ การม้วนตัวของเซลล์จากขอบทางด้านล่างของทรานซ์เวลล์อินเสิร์ต เมื่อเซลล์ที่เคลื่อนมาทางด้านล่างแบ่งตัวเพิ่มจำนวนขึ้นจนหนาแน่น ซึ่งพบได้เมื่อเพาะเลี้ยง นาน 14 วัน

การศึกษาศักยภาพของเซลล์ของผู้เป็นโรคเบาหวานโดยการเพาะเลี้ยงเซลล์ในห้องปฏิบัติการ และการทำโกรตเคิร์ฟ รวมถึงการทราบค่าระดับน้ำตาลที่ผู้ป่วยเบาหวานแต่ละรายสามารถควบคุมได้ จะเป็นข้อมูลสำคัญที่จะช่วยในการตัดสินใจว่าควรทำวิศวกรรมเนื้อเยื่อในผู้ป่วยเบาหวานที่สามารถควบคุมระดับน้ำตาลรายใดบ้าง ทำให้บุคคลกลุ่มนี้ไม่ต้องพลาดโอกาสหากมีความจำเป็นที่จะต้องทำวิศวกรรมเนื้อเยื่อ

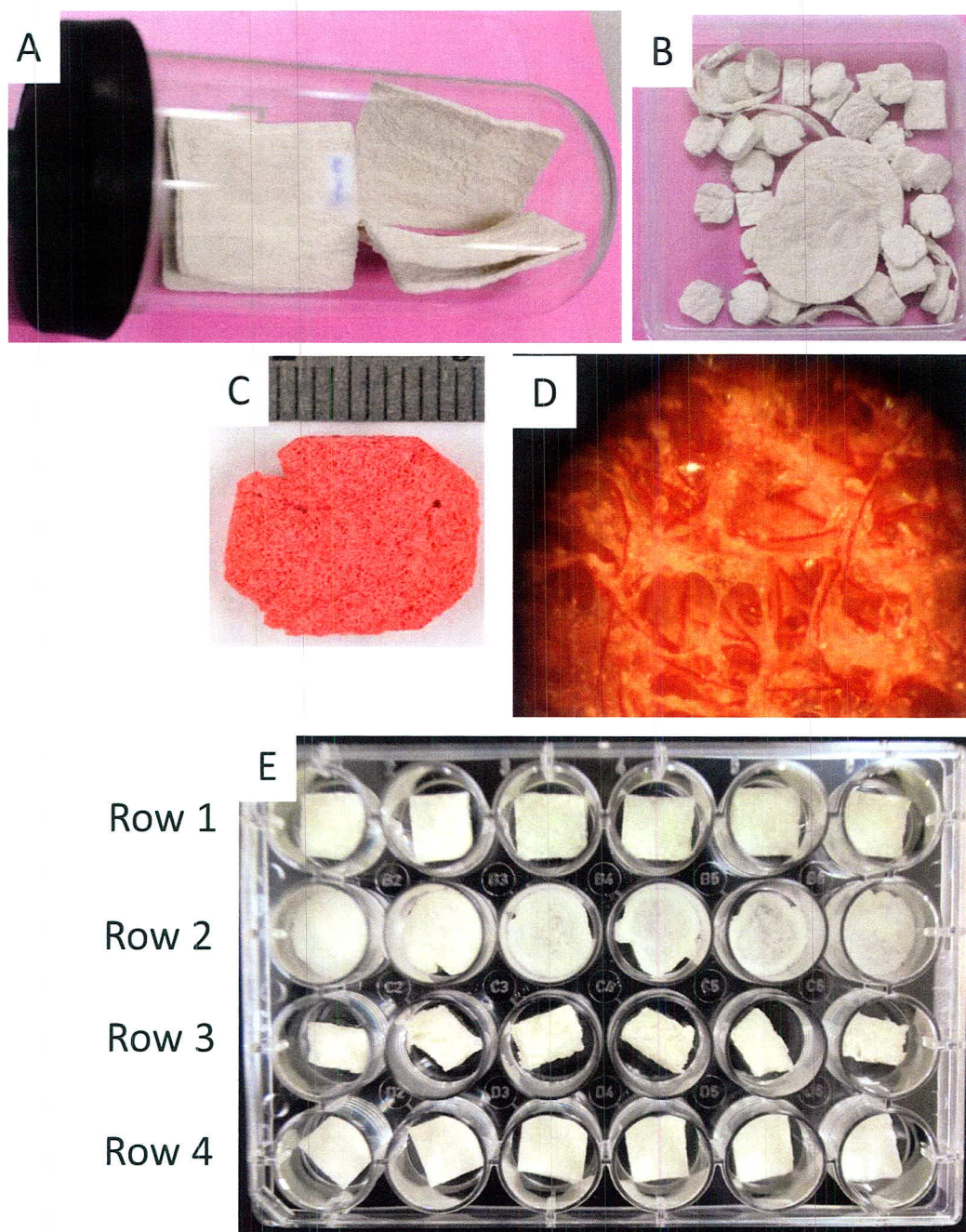


Figure 1. Chitosan Mixture Scaffolds

A. Chitosan scaffolds in a lyophilized container B. Dried chitosan scaffolds cut in various shapes and sizes. Stereo-micrographs of 2%Chitosan-abalone shell powder-silk scaffold stained with Safranin-O; 6.7X magnification (C, each interval of the calibration mark = 1 mm.); 20X magnification (D). E. Dried Chitosan and Chitosan Mixture Scaffolds in 24-Well Plate after Gas Sterilization: Row 1= 2%Chitosan scaffolds; Row 2= 2%Chitosan-silk; Row 3= 2%Chitosan-5%Abalone Shell Powder; Row 4= 2%Chitosan-5%Abalone Shell Powder-Silk.

Table 1. ตารางแสดงการเปรียบเทียบลักษณะทางกายภาพของโครงร่างโคโตซานและโคโตซาน

ผสม

ลักษณะ	โคโตซาน	โคโตซาน- โยโหม	โคโตซาน- ผงเปลือกหอย	โคโตซาน- ผงเปลือกหอย- โยโหม
ความหนาของเจลขณะผสม/ ตัดผ่านรูไซริงซ์ ขนาด 20 มิลลิเมตร	+	++	+++	++++
การขยายตัวของเจลแช่แข็ง	++++	+++	+	++
การหดตัวของเจลแช่แข็ง ภายหลังจากถูกครอสลิงค์	++++	+++	+	++
ความแตกต่างของรูปร่างภาย หลังจากถูกครอสลิงค์เมื่อเทียบกับ แบบหล่อ	++++	+++	+	++
การหดตัวภายหลังจากถูก ไลโอไฟไลซ์	+++	++	+	+
การคงรูปภายหลังจากอบฆ่า เชื้อด้วยก๊าซ	++	++	+++	+++
การบวมน้ำเมื่อถูกนำไปแช่ใน อาหารเลี้ยงเซลล์	+++	+++	+	+
การคงรูปภายหลังจากถูก นำไปแช่ในอาหารเลี้ยงเซลล์	++	+	+++	++++
ความยากในการถูกตัดแต่ง ด้วยกรรไกรภายหลังจากถูก ครอสลิงค์ สภาพเปียก	++	+	++++	+++
ความยากในการถูกตัดแต่ง ด้วยกรรไกรภายหลังจากถูก ครอสลิงค์ โครงร่างสภาพแห้ง	++	+	++++	++++
ความทนทานต่อแรงจากการ เหยียบ จับ ยก เคลื่อนย้าย ด้วย มือหรือคีมสำหรับจับ ของ โครงร่างสภาพแห้ง	++++	++++	++	+++

Table 1. (ต่อ) ตารางแสดงการเปรียบเทียบลักษณะทางกายภาพของโครงร่างโคโตซานและโคโตซาน

ผสม

ลักษณะ	โคโตซาน	โคโตซาน- โยโหม	โคโตซาน- ผงเปลือกหอย	โคโตซาน- ผงเปลือกหอย- โยโหม
ความทนทานต่อแรงจากการ หยิบ จับ ยก เคลื่อนย้าย ด้วย มือหรือคีมสำหรับจับ ของ โครงร่างสภาพเปียก	+	+	+++	++++
การติดสีย้อม Safranin O	++	++	++	++
การติดสีย้อม Toluidine blue	+	++	+	++
สภาพความเป็นกรดของเจล/ โครงร่าง	++	+	-	-
สภาพความเป็น ด่างของเจล/ โครงร่าง	-	-	++	+

Table 2. Tissue Donor Information

Eight donors were dental patients who attended Oral and Maxillofacial Surgery Clinic (DM001-DM009) and three donors attended Periodontics and Oral Medicine Clinic (OM02-OM04)

Donor	HGF	PDL	Sex	Age (yrs)	Normal	DM	FBS (mg/dl)	mmol/L	HbA1c %	Extraction
DM001	X	-	F	62	-	X	144	8	-	41, 31, IDP excision
DM002	X	-	M	16	X	-	-	-	-	18, gingival excision
DM003	X	-	F	64	-	X	130	-	-	14, 15, 16 gingival ex
DM004	X	-	M	75	-	X	161, 113	-	7.2	16, 17
DM005	X	X	M	25	-	X	161	-	-	18, 44
DM007	X	-	F	40	X	-	-	-	-	18, gingival excision
DM008	X	-	M	43	-	X	118	-	-	25
DM009	X	-	F	18	X	-	-	-	-	38
OM02	X	-	F	55	-	X	115	-	-	-
OM03	X	-	F	49	-	X	118	-	-	-
OM04	X	-	F	62	-	X	122	-	-	-

Number of Cells

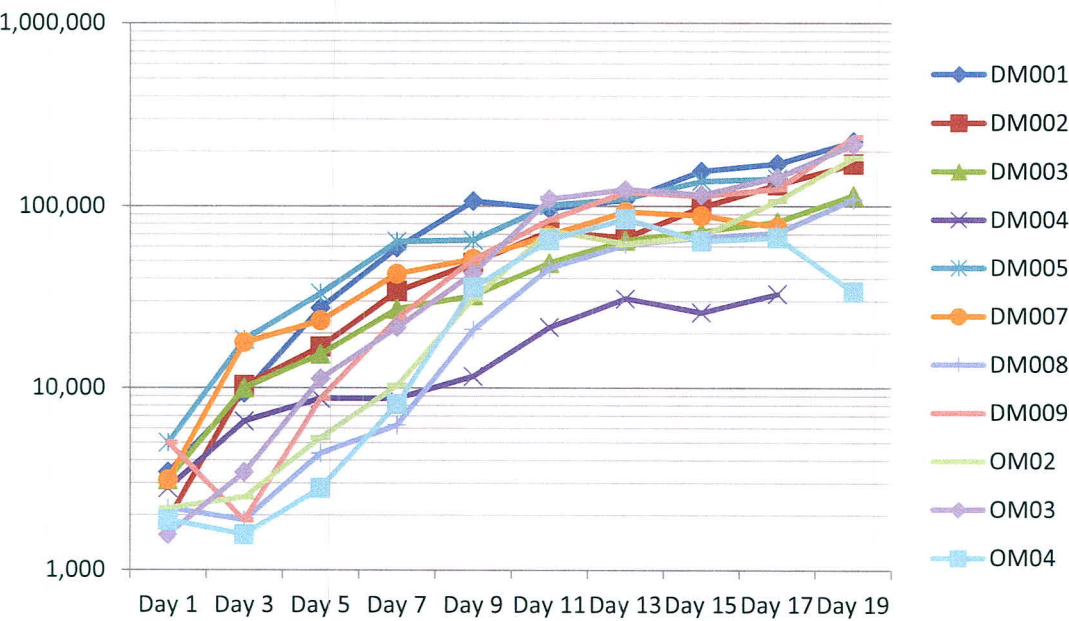


Figure 2. Semi-log Growth Curves of Gingival Fibroblasts from 11 Tissue Donors between Day 1 and Day 19

HGF from 11 donates (DM001-DM005, DM007-DM009 and OM02-OM04) were cultured with DMEM-HG in 24-well plates and were counted at each time point between day 1 and day 19. Y-axis is shown in a logarithmic scale.

Table 3. ตารางแสดงการจัดกลุ่มระดับน้ำตาลกลูโคสที่เติมลงในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์

Glucose Levels	DMEM HG (mM) [A]	Dilution of 50% D-glucose (mM) [B]	Glucose (mM) [A+B]	Glucose (mg/dl) [A+B]
Normal	5.4	-	5.4	97.2
Slightly High (1.46x-1.94x)	5.4	1:1,000 (2.7)	8.1	145.8
		1:500 (5.4)	10.8	194.4
Moderately High (2.2x-3.4x)	5.4	1:400 (6.75)	12.2	219.6
		1:300 (9)	14.4	259.2
		1:200 (13.5)	18.9	340.2
Very High (5.8x-10.7x)	5.4	1:100 (27)	32.4	583.2
		1:50 (54)	59.4	1,069.2

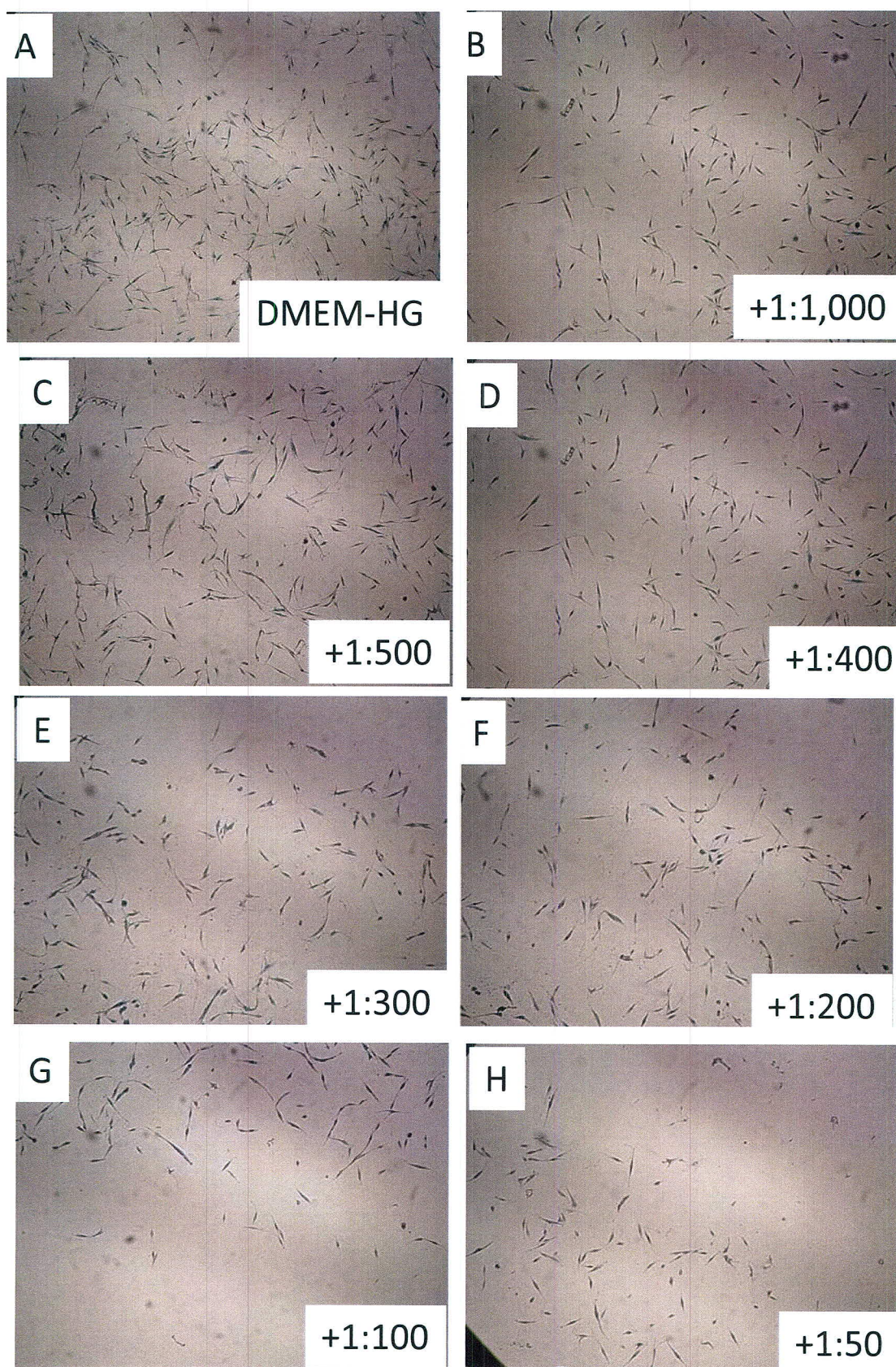


Figure 3. Inverted Micrographs of Normal HGF Cultured in Various Glucose Levels at Day 1 after Initial Cell Seeding (2,000 cells/ml/well)
(A) DMEM-HG (B-H) with additional various dilutions of 50% D-glucose in 24-well plates

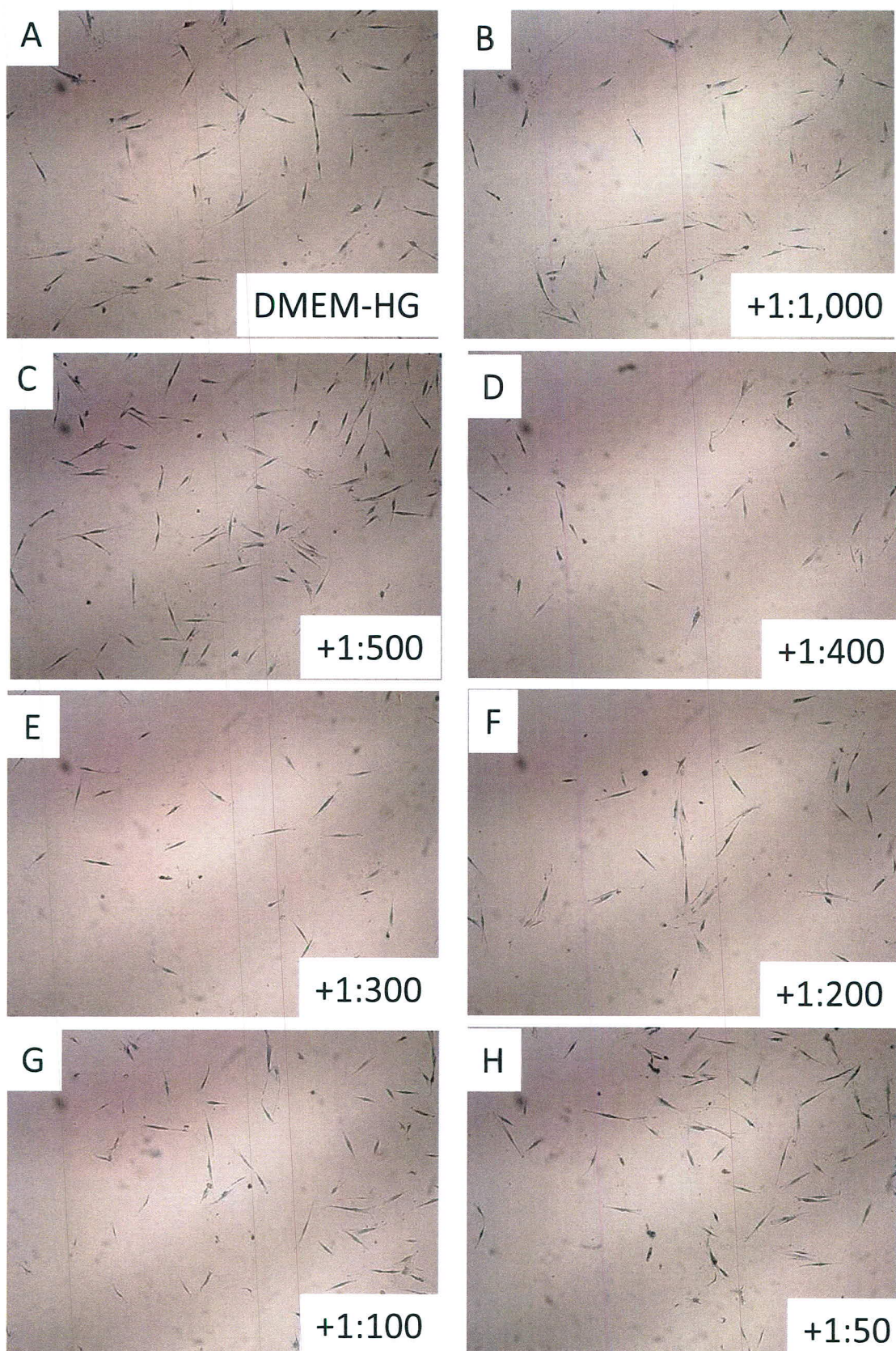


Figure 4. Inverted Micrographs of Controlled Diabetic HGF Cultured in Various Glucose Levels at Day 1 after Initial Cell Seeding (2,000 cells/ml/well)
 (A) DMEM-HG (B-H) with additional various dilutions of 50% D-glucose in 24-well plates

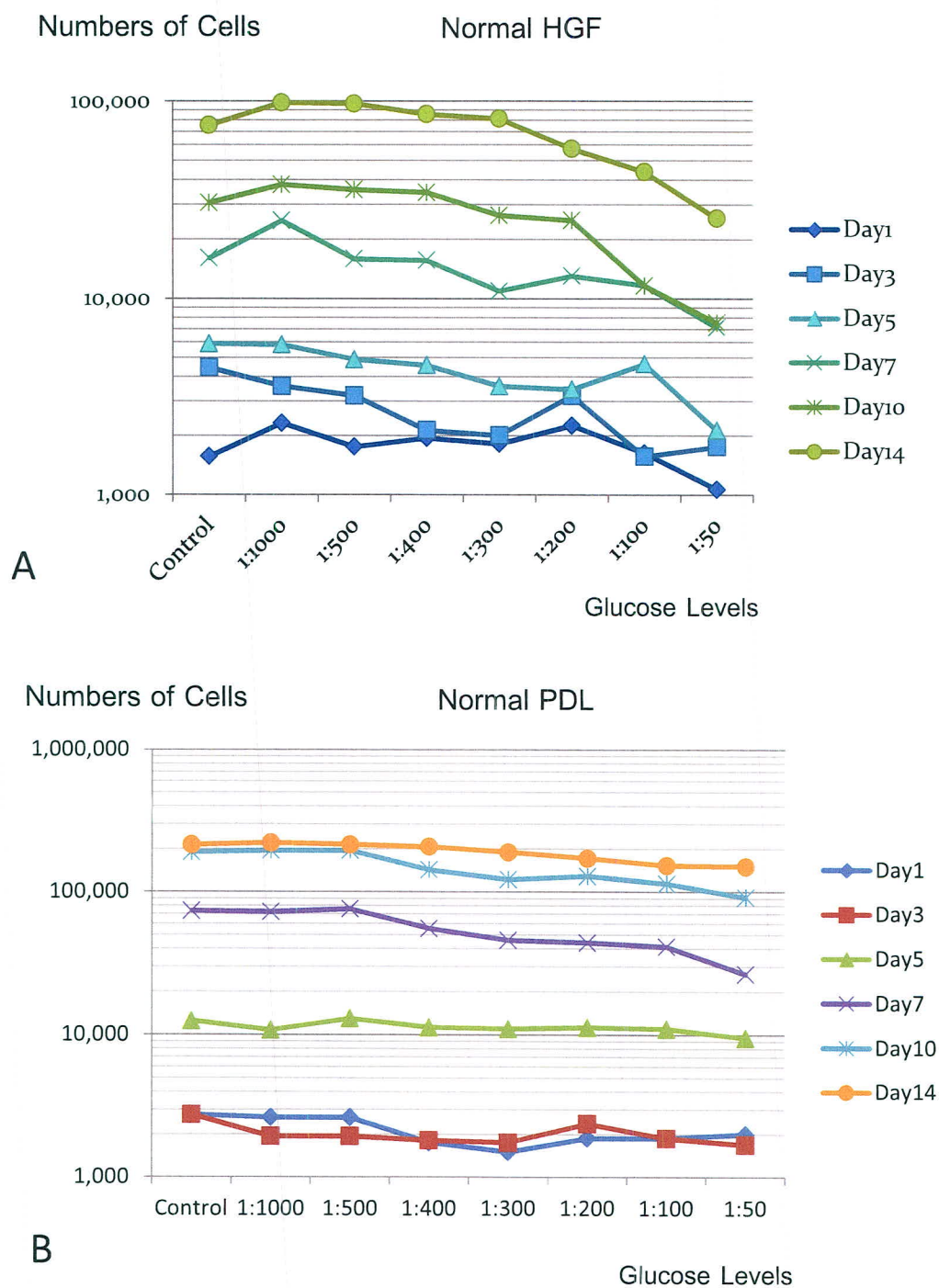


Figure 5. Semi-log Growth Curves of Normal HGF and Normal PDL Donors between Day 1 and Day 14 in the Presence of Various Glucose Levels

Normal HGF (A) and normal PDL (B) were cultured with DMEM-HG, and DMEM-HG with additional various dilutions of 50% D-glucose in 24-well plates and were counted at each time point between day 1 and day 14. Y-axis is shown in a logarithmic scale. X-axis is various glucose levels.

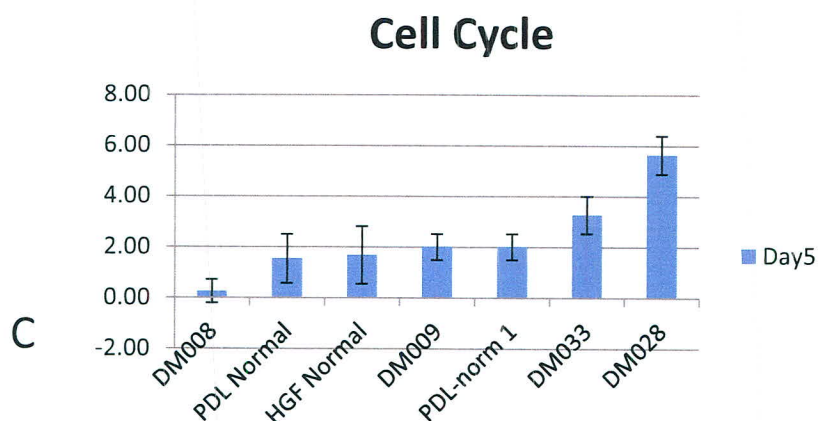
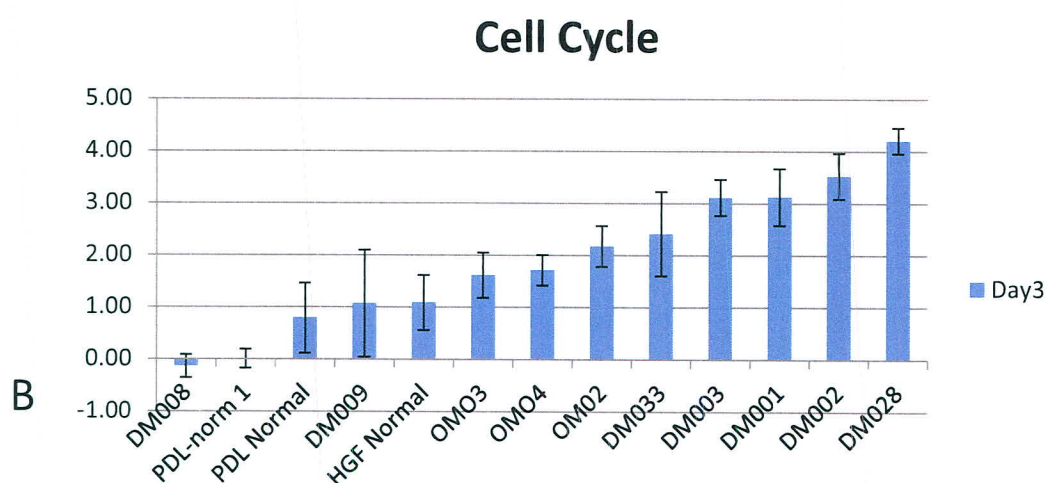
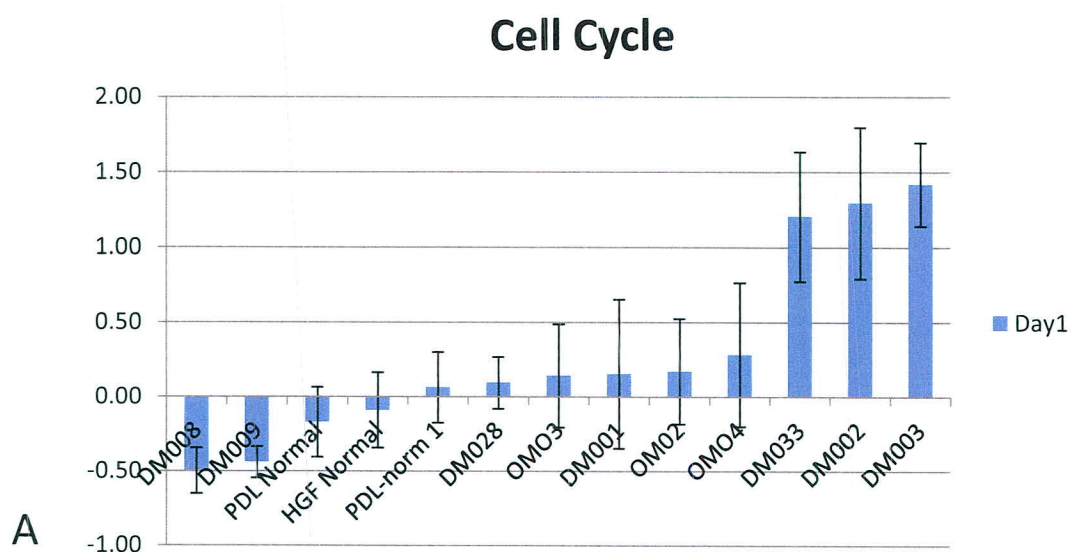


Figure 6 (A-C). Bar Charts showing Means of Cell Cycles from Non-diabetic and Controlled Diabetic Donors from Day 1 to Day 5 Cultured in Various Glucose Levels

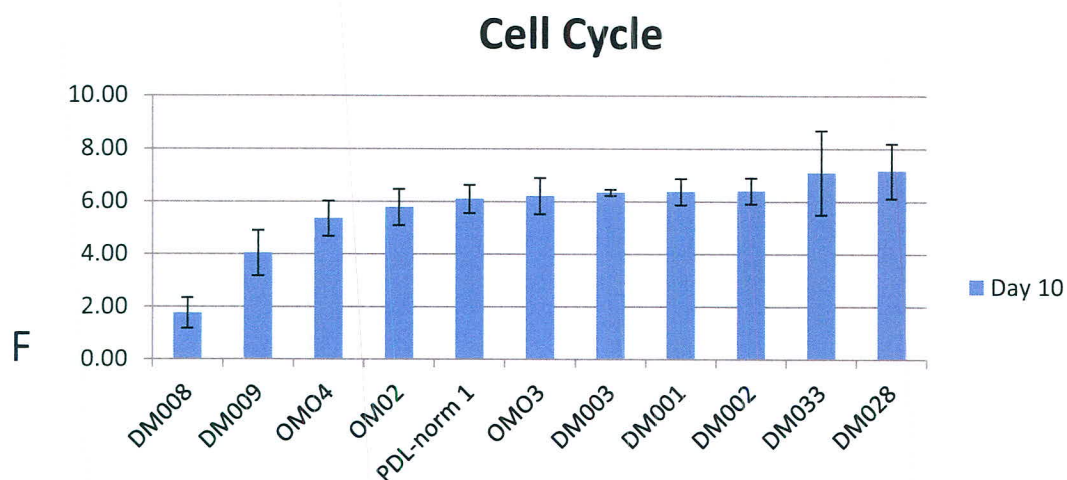
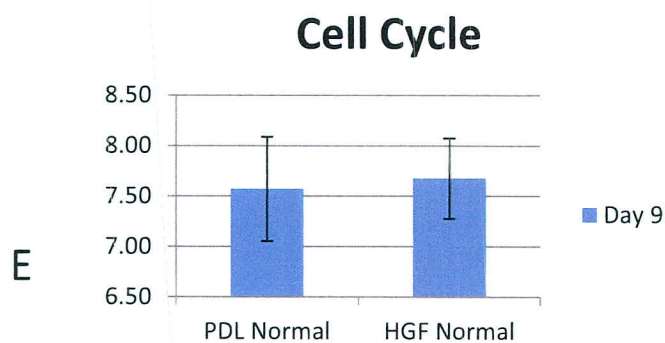
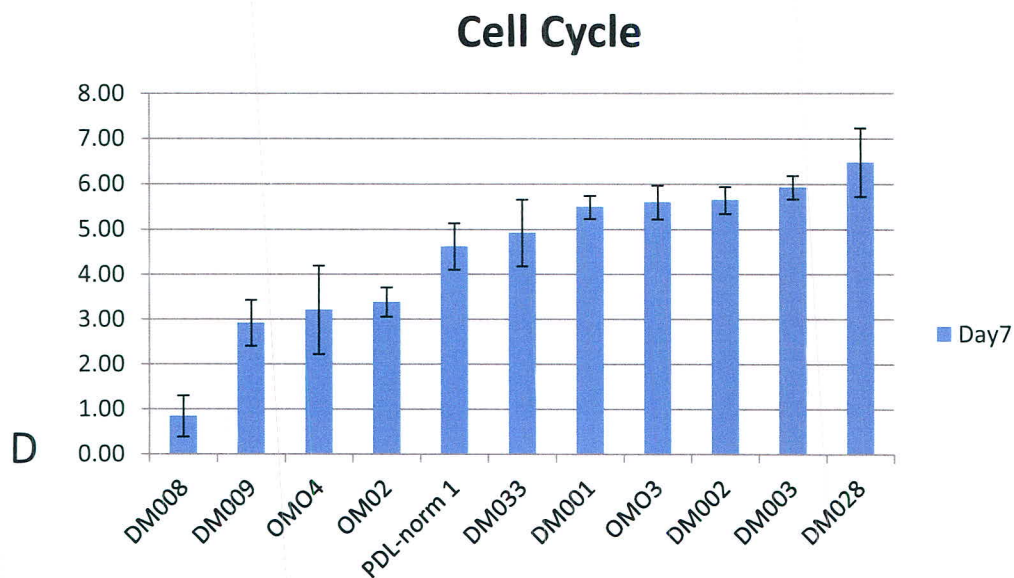


Figure 6 (D-F). Bar Charts showing Means of Cell Cycles from Non-diabetic and Controlled Diabetic Donors from Day 1 to Day 18 Cultured in Various Glucose Levels

Non-diabetic HGF & PDL and controlled diabetic HGF were cultured in various glucose levels (5.4, 8.1, 10.8, 12.2, 14.4, 18.9, 32.4, & 59.4 mM).

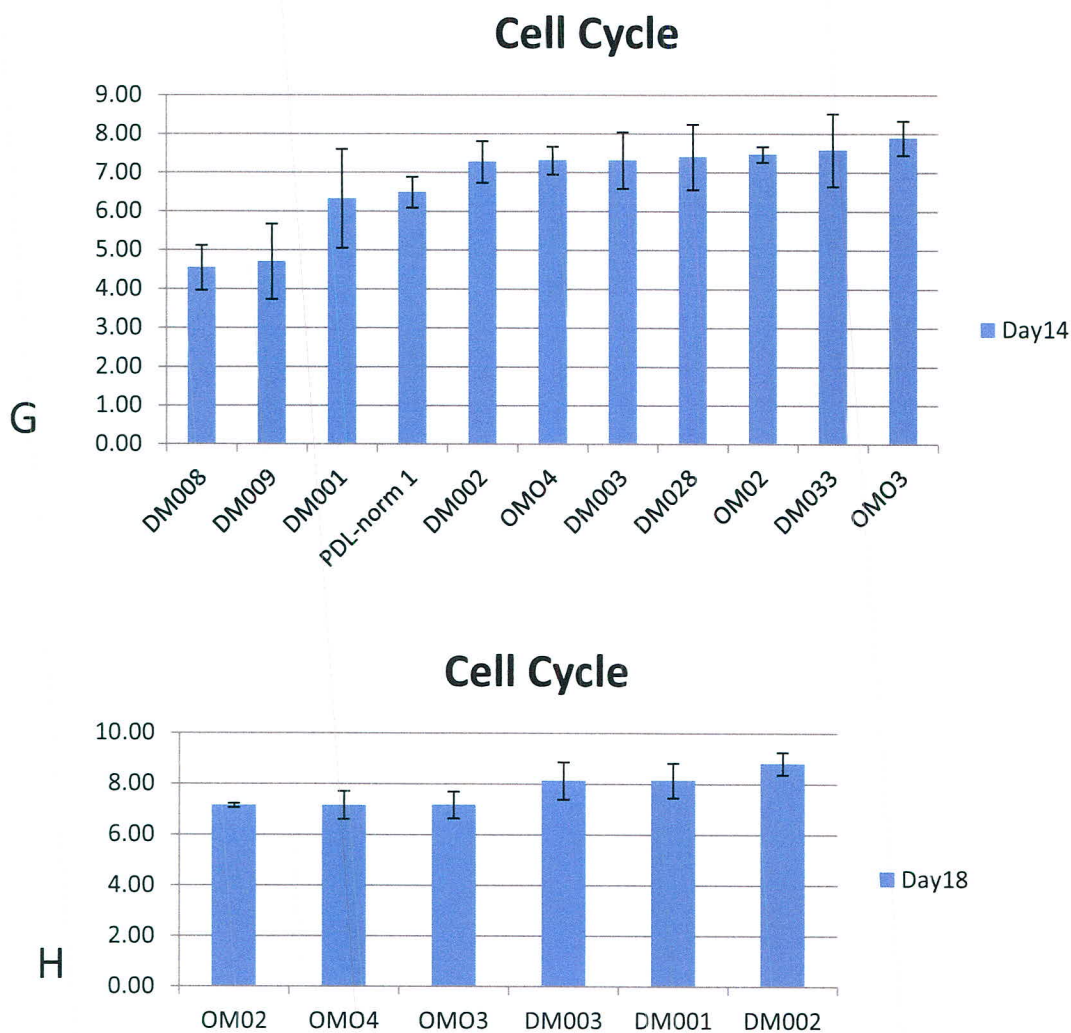


Figure 6 (G & H). Bar Charts showing Means of Cell Cycles from Non-diabetic and Controlled Diabetic Donors from Day 1 to Day 18 Cultured in Various Glucose Levels

Non-diabetic HGF & PDL and controlled diabetic HGF were cultured in various glucose levels (5.4, 8.1, 10.8, 12.2, 14.4, 18.9, 32.4, & 59.4 mM). At each time point, the numbers of cell cycles were estimated and plotted as bar charts with error bars representing standard deviations from the means of the numbers of cell cycles for each donor cultured in various glucose levels.

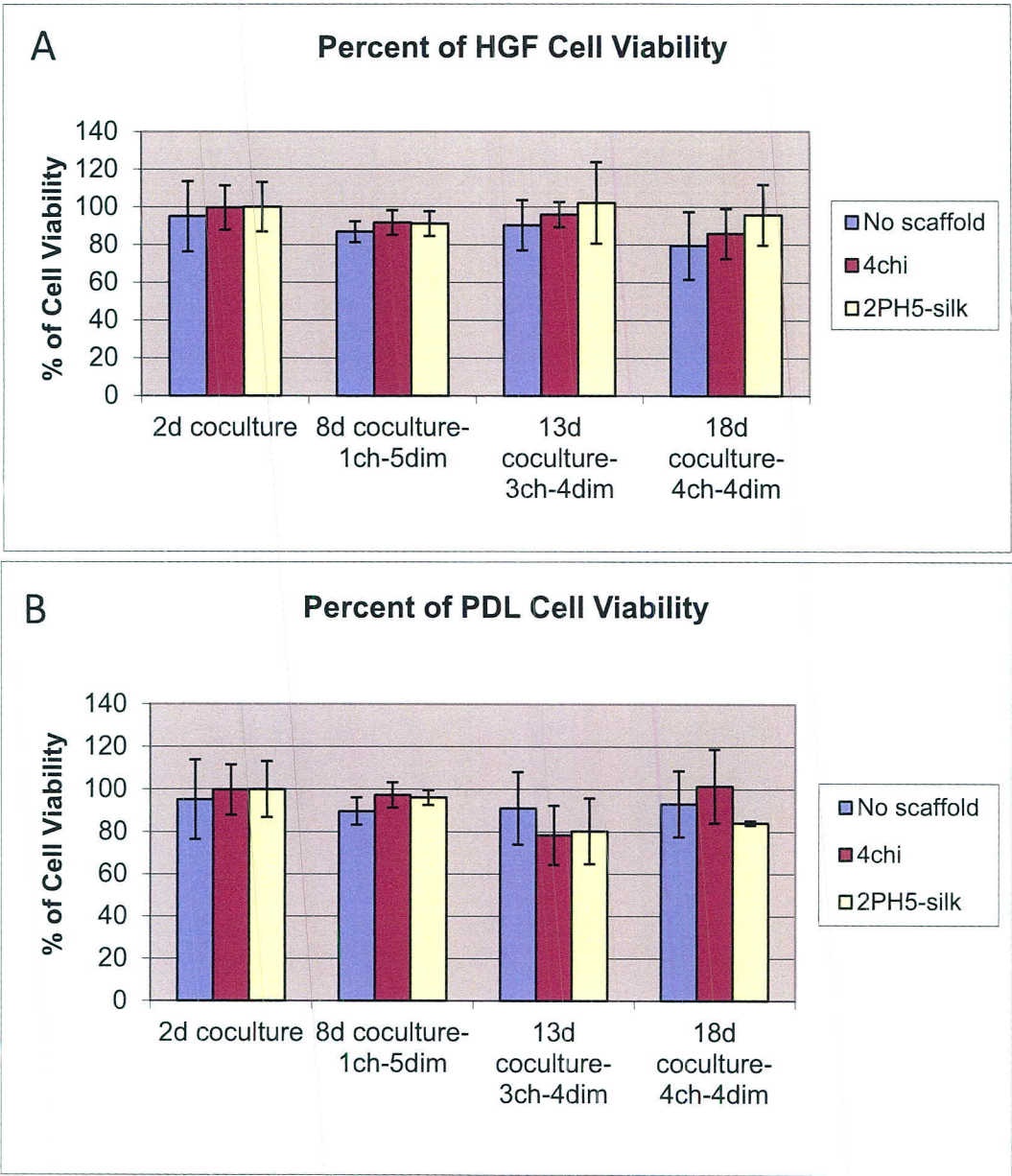


Figure 7. Percent of Cell Viability by MTT Assay

Biocompatibility test by MTT assay showing percent of cell viability when cocultured for 1 day with media previously used to coculture with cells of the same type for 2, 8, 13, and 18 days with media replacement every 2-5 days . (A) Human gingival fibroblasts. (B) Periodontal ligament cells. 4chi = 4%chitosan scaffold; 2PH5-silk = 2%chitosan-5%abalone shell powder-silk; 2d coculture = co-culture for 2 days; 8d coculture-1ch-5dim = co-culture for 8 days with fresh media change once; 13d coculture-3ch-4dim = co-culture for 13 days with fresh media changes for three times; 18d coculture-4ch-4dim = co-culture for 18 days with fresh media changes for four times. The conditioned media were immersed with cell-scaffold constructs for 2 days, 5 days, 4 days, and 4 days, respectively.

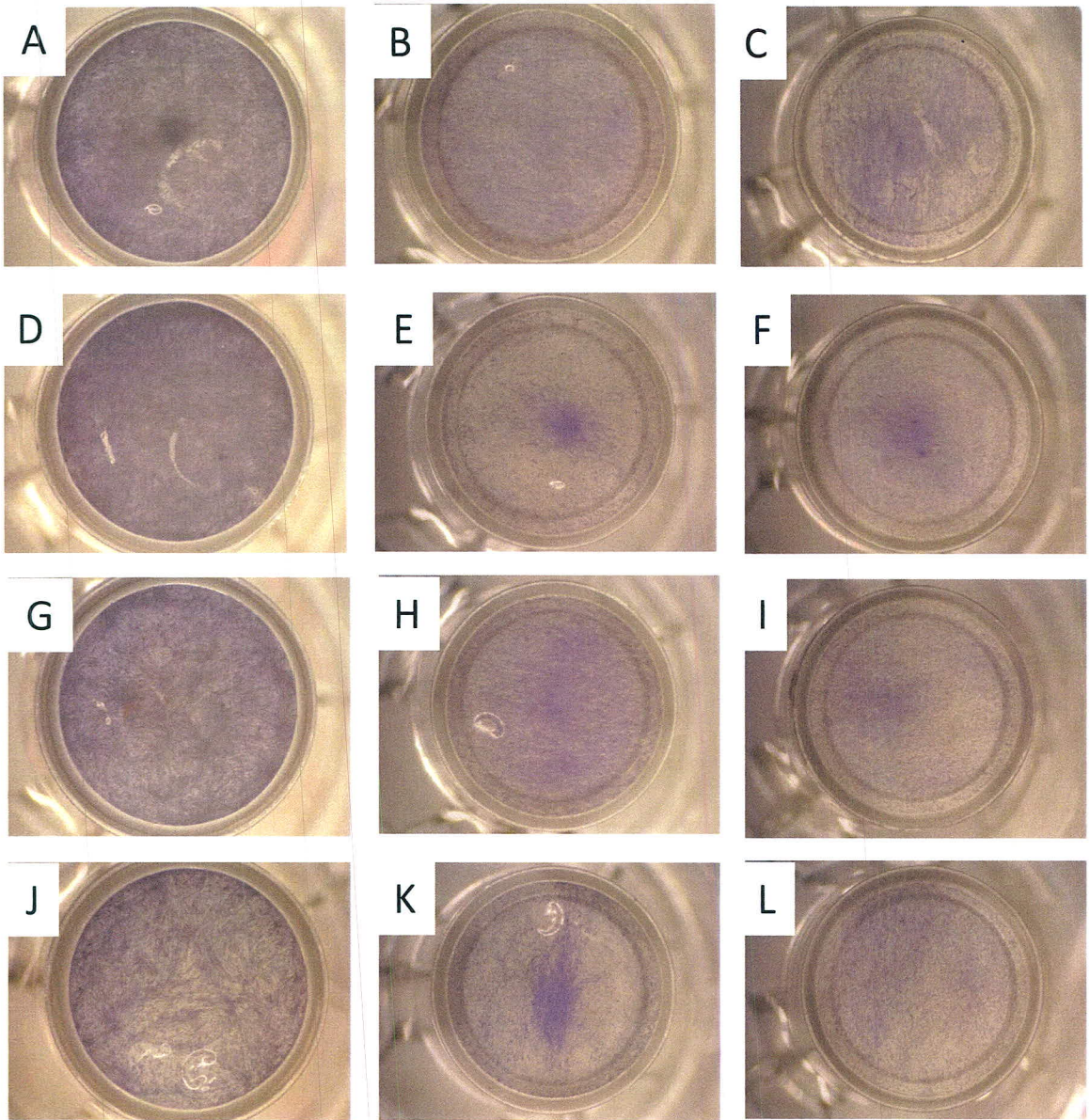


Figure 8. Stereomicrographs of Undersurface of Transwell Inserts

Normal HGF (A-F) and Controlled diabetic HGF (G-L) cultured in transwell inserts with polycarbonate membranes of 0.4 micrometer (A, D, G & J), 3 micrometer (B, E, H & K), and 8 micrometer (C, F, I & L) in the presence of DMEM-HG (A-C & G-I) and additional 1:200 dilution of 50% D-glucose (D-F & J-L) at day 5.

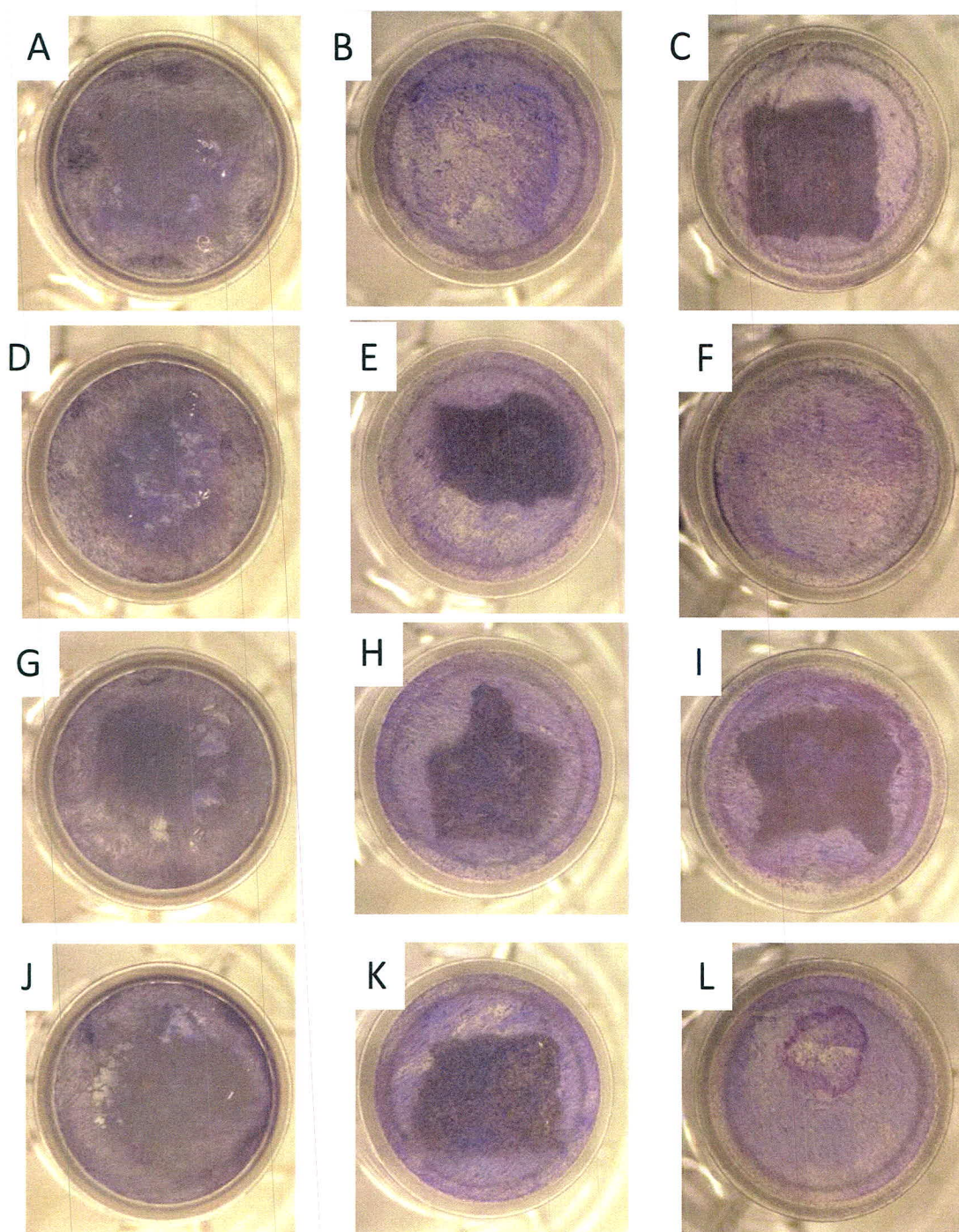


Figure 9. Stereomicrographs of Undersurface of Transwell Inserts

Normal HGF (A-F) and Controlled diabetic HGF (G-L) cultured in transwell inserts with polycarbonate membranes of 0.4 micrometer (A, D, G & J), 3 micrometer (B, E, H & K), and 8 micrometer (C, F, I & L) in the presence of DMEM-HG (A-C & G-I) and additional 1:200 dilution of 50% D-glucose (D-F & J-L) and with the 2%Chitosan-ablone shell powder-silk scaffolds at day 7. The scaffolds are still attached to the membranes (C, E, H, I & K) although the transwell inserts are inverted.

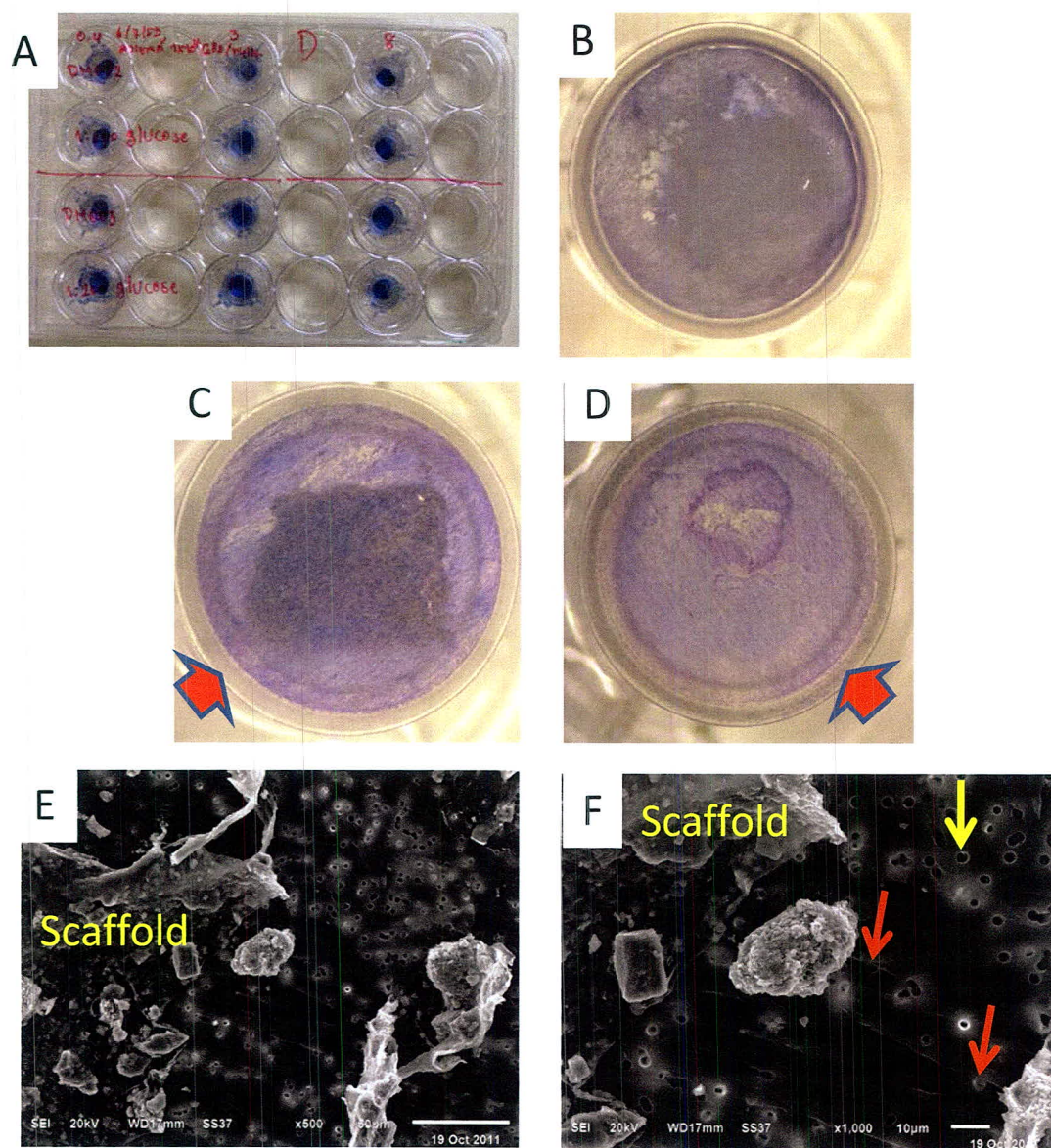


Figure 10. Micrographs of Polycarbonate Membrane and Cultured HGF on Transwell Inserts in 24 well Plate.

Controlled diabetic HGF cultured with DMEM-HG + 1:200 dilution of 50% D-glucose (Last row in A & B-D) in transwell inserts with polycarbonate membranes of 0.4, 3, & 8 micrometer pore sizes, 1st, 2nd, & 3rd column in (A), respectively. A-D are stereomicrographs. B-D are the undersurface of transwell inserts showing migrated cells on the undersurface of 3 & 8 micrometer pore sizes (arrows C & D, respectively) but no cell was found on the undersurface of 0.4 micrometer pore size (B). Cells were cultured with 2%Chitosan-abalone-shell powder-silk scaffold. The scaffold is still attached to the membrane (B) although the transwell inserts are inverted. E-F are scanning electron micrographs captured on the membrane close to the scaffold (Left). Pore of size 3 micrometer (Yellow arrow); parts of cells (Red arrows) cover some pores in (F).

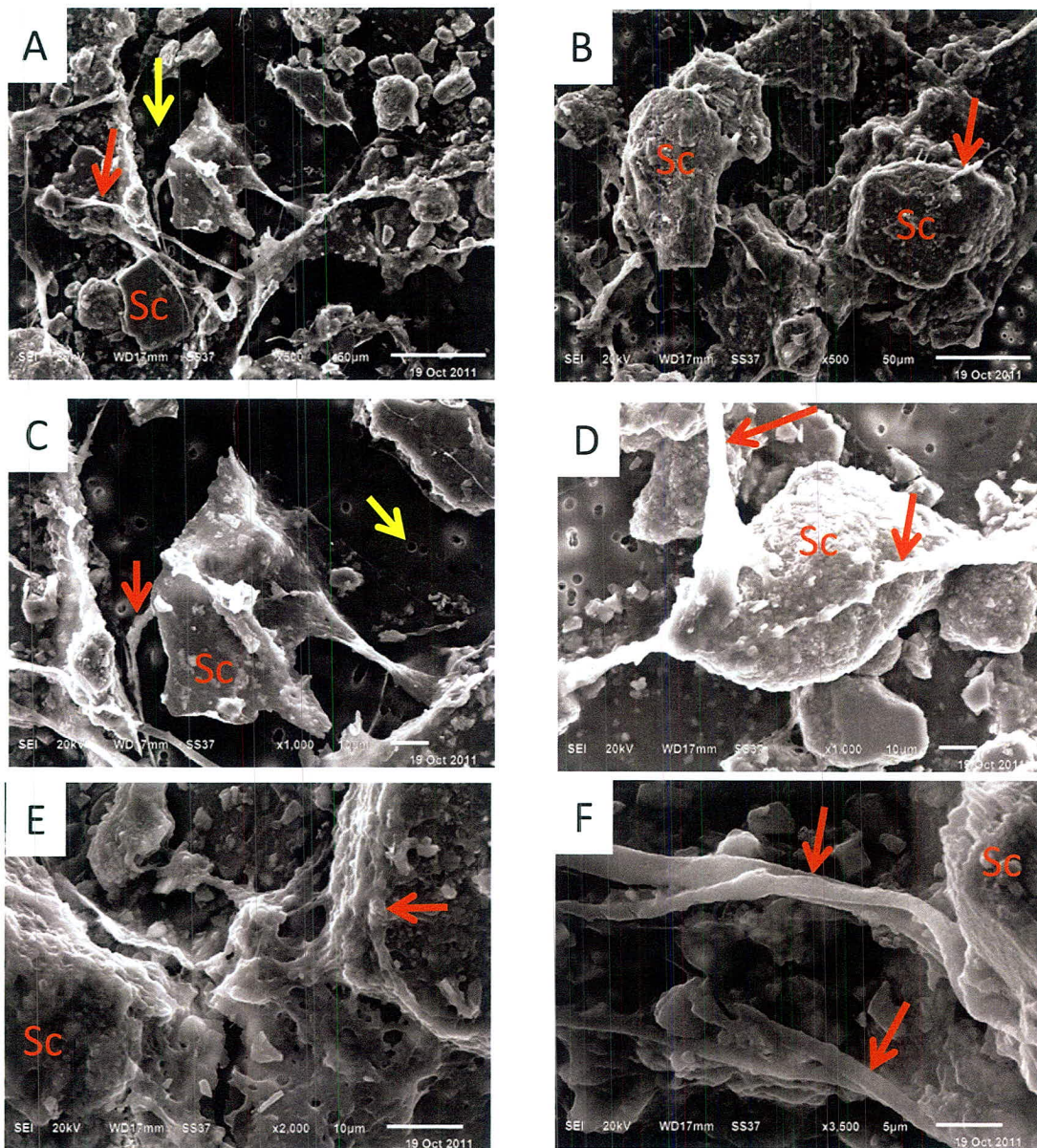


Figure 11. Scanning Electron Micrographs of Polycarbonate Membrane on the Inner Side of a Transwell Insert.

Controlled diabetic HGF (A-F, red arrows) cultured in a transwell insert with polycarbonate membrane of 3 micrometer pore size (Yellow arrows in A & C). Cells were cultured with 2%Chitosan-abalone-shell powder-silk scaffold. The scaffold was detached from the membrane and leaving some parts (Sc) of the scaffold on the membrane.