ผลการศึกษา

1. ลักษณะทางกายภาพของโครงร่างไคโตซานและไคโตซานผสม

ผลการศึกษาลักษณะทางกายภาพของโครงร่างไคโตซานและไคโตซานผสม (Table 1) พบว่าในสภาพเจล เมื่อเรียงลำดับตามความหนืดจากน้อยไปหามาก เจลไคโตซานมีความหนืดน้อยที่สุด เจลไคโตซานเสริมด้วยผงเปลือกหอยเป๋าฮื้อมีความหนืดปานกลาง และเจลไคโตซานเสริมด้วยผงเปลือกหอยเป๋าฮื้อและเส้นใยไหมมีความหนืดมากที่สุด

เมื่อนำเจลไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ปริมาตรของเจลเพิ่มขึ้น เจลแข็งที่อยู่ในแบบหล่อชนิดกระบอกฉีดยาและแบบถาด ส่วนผิวบนของเจลแช่แข็ง ที่ไม่ได้สัมผัสกับแบบหล่อมีลักษณะนูนและปูดขึ้น โดยแปรผกผันกลับกับพื้นที่ผิวหน้าคือถ้าพื้นที่แคบจะนูนมากพื้นที่กว้างจะโค้งนูนเล็กน้อย

เมื่อโครงร่างแช่แข็งชนิดถาด ถูกครอสลิงค์ จะมีรูปร่างเปลี่ยนแปลงไปมากน้อยต่างๆ กัน บริเวณที่ถูกครอสลิงค์เร็วกว่าและ/หรือมากกว่า จะหดตัวมากกว่าด้านที่ถูกครอสลิงค์น้อยกว่า ด้านที่หดมากกว่าจึงสั้นกว่าและมีลักษณะเว้าส่วนด้านที่หดตัวน้อยกว่าจึงยาวกว่าและมีลักษณะโค้งนูน

เมื่อโครงร่างอยู่ในสภาพแห้ง ไคโตซานเสริมด้วยเส้นใยไหม และไคโตซานล้วน มีการหดตัวลงมากเมื่อเทียบกับสภาพที่เป็นเจล ทำให้ขนาดและปริมาตรเปลี่ยนแปลงไปมากกว่าโครงร่างที่มีส่วนผสมของผงเปลือกหอย โครงร่างไคโตซานเสริมด้วยเส้นใยไหม และไคโตซานล้วนที่แห้งสนิทมีลักษณะแน่นเหนียวและแข็งมาก ความพรุนที่ผิวนอกมีลักษณะเป็นช่องเล็กๆ ละเอียดมากจนถึงทึบ

เมื่อนำโครงร่างที่ครอสลิงค์แล้วกลับไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อเก็บไว้ก่อนเมื่อยังไม่ต้องการใช้ เมื่อต้องการนำไปใช้ นำโครงร่างแช่แข็งไปไลโอฟิไลซ์ ส่วนของน้ำระเหิดไปภายใต้ระบบสูญญากาศและอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ภายในโครงร่างซึ่งเป็นไคโตซานที่ยังไม่ได้ถูกครอสลิงค์ จึงมีลักษณะกลวงในส่วนกลางของโครงร่าง หรือมีลักษณะเป็นร่างแหที่มีช่องว่างขนาดใหญ่จำนวน

มาก โครงร่างในสภาพแห้งของ ไคโตซานเสริมด้วยผงเปลือกหอยเป๋าฮื้อและเส้นใยไหม มีลักษณะแข็งแรงและยืดหยุ่น ความพรุนที่ผิวนอกมีลักษณะเป็นช่องขนาดเล็กมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า รูและ/หรือช่องเหล่านี้มีทางติดต่อเข้าสู่ส่วนลึกภายในโครงร่าง (Figure 1C & 1D) ไคโตซานเสริมด้วยผงเปลือกหอยเป๋าฮื้อ ซึ่งสามารถคงรูปร่างได้ดีเช่นเดียวกับไคโตซานเสริมด้วยผงเปลือกหอยเป๋าฮื้อและเส้นใยไหม แต่ค่อนข้างเปราะบางและร่วนกว่า การจับโครงร่างสภาพแห้งด้วยคีมคีบหากคีบแรงเกินไป โครงร่างอาจแตกหักเสียหายได้

เมื่อนำโครงร่างแห้ง มาเพาะเลี้ยงร่วมกับเซลล์ พบว่าโครงร่างดูดซับน้ำ/ของเหลวไว้ โครงร่างสภาพเปียก ไคโตซานเสริมด้วยผงเปลือกหอยเป๋าฮื้อและเส้นใยไหม และไคโตซานเสริมด้วยผงเปลือกหอยเป๋าฮื้อ คงรูปอยู่ในของเหลวได้ดี โครงสร้างของไคโตซานในสภาพเปียกมีลักษณะเป็นเจล รูพรุนและช่องว่างส่วนใหญ่จะหายไปโดยมีส่วนของเจลไคโตซานบวมปิดช่องว่างไว้ หากช่องมีขนาดใหญ่ระดับมิลลิเมตร จะยังคงเห็นช่องทางเหลืออยู่ การเคลื่อนย้ายโครงร่างโดยการคีบด้วยปากคีบ (Forceps) ขณะที่โครงร่างดูดซับของเหลวไว้ ไม่ทำให้โครงร่างเสียรูปร่าง สำหรับโครงร่างไคโตซานและไคโตซานเสริมด้วยเส้นใยไหม ซึ่งดูดซับของเหลวไว้ได้มาก เมื่อแช่อยู่ในของเหลวนาน 4 สัปดาห์หรือมากกว่า โครงร่างจะบวมน้ำมาก เมื่อทำการเคลื่อนย้ายโดยการคีบด้วยปากคีบมักฉีกขาดหากคีบหรือยกขึ้นทันทีโดยไม่ปล่อยให้ของเหลวส่วนเกินไหลออกไปก่อนทำการเคลื่อนย้าย และบางโครงร่างอาจมีชิ้นส่วนเล็กๆ ของไคโตซานหรือผงเปลือกหอยยุ่ยออกมาจากชิ้นส่วนใหญ่ ทำให้อาหารเพาะเลี้ยงเซลล์มีลักษณะขุ่น และมีตะกอนในหลุมเพาะเลี้ยงเซลล์

ผลการศึกษาสภาพความเป็นกรด-ด่างของเจล ด้วยกระดาษวัด pH โดยจุ่มแถบกระดาษวัด pH ลงในเจลที่ผสมเสร็จแล้ว พบว่า เจลไคโตซานล้วน มีความเป็นกรดและมี pH 5 เจลไคโตซานผสมใยไหมมี pH ประมาณ 5.5 เจลไคโตซานผสมผงเปลือกหอย มี pH ประมาณ 6 เจลไคโตซานผสมผงเปลือกหอยและใยไหมมี pH ประมาณ 7 เมื่อวัด pH ของน้ำที่ใช้แช่โครงร่างในขั้นตอนการล้างโครงร่างภายหลังการถูก ครอสลิงค์ด้วยสารละลายโซเดียมไตรโพลีฟอสเฟส pH ของโครงร่างชนิดต่างๆ จะสูงขึ้น

ประมาณ 0.5 ถึง 1 ภายหลังจากล้างด้วยน้ำกลั่นหลาย ๆ ครั้ง เมื่อวัด pH ของน้ำล้างครั้งสุดท้ายได้ค่า pH ประมาณ 7-7.5 เมื่อสังเกตการเปลี่ยนแปลงของค่า pH จากการเปลี่ยนแปลงของสีฟีนอลเรด(สีแดงบานเย็น) ที่ใส่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ เมื่อนำโครงร่างมาแช่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีฟีนอลเรด พบว่า โครงร่างไคโตซานล้วนจะเป็นกรดได้เร็วกว่า และอาหารเลี้ยงเซลล์ มีสีเหลืองเร็ว กว่าโครงร่างชนิดอื่น

2. สายพันธุ์เซลล์ (Cell line)

ผลจากการเพาะเลี้ยงเซลล์ จากเหงือก และเอ็นยึดปริทันต์ จากผู้บริจาค จำนวน 31 ราย (24 ราย จากคลินิกศัลยศาสตร์ช่องปากและแมกซิลโลเฟเชียล และ 7 รายจาก คลินิกตรวจพิเคราะห์และปริทันต์) เป็นผู้มีระดับน้ำตาลปรกติ 12 ราย และเป็นเบาหวานที่ควบคุมระดับน้ำตาล 19 ราย ได้สายพันธุ์เซลล์ทั้งหมด 14 สายพันธุ์เซลล์ เป็นเซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพันของเหงือกปรกติ (n = 3) เซลล์เอ็นยึดปริทันต์ปรกติ (n = 3) เซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพันของเหงือกที่เป็นเบาหวานที่ควบคุมระดับน้ำตาล (n = 7) เซลล์เอ็นยึดปริทันต์ที่เป็นเบาหวานที่ควบคุมระดับน้ำตาล (n = 1), Table 2.

ผลการเพาะเลี้ยงเซลล์ 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 โดยมีความแตกต่างระหว่าง 3.5 เท่า ถึง 10 เท่า ณ วันที่บันทึกค่า จากวันที่ 1 ถึง 19 หลังการลงเซลล์เริ่มต้น (3,000 เซลล์/มล./หลุม) 1 วัน (Figure 2) และพบว่ามีทั้ง เซลล์จากผู้สูงอายุและอายุน้อยที่เป็นเบาหวานที่อยู่ระหว่างการควบคุมระดับน้ำตาล และเซลล์จากผู้ที่มีระดับน้ำตาลปรกติ ที่สามารถเจริญเติบโตและแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนได้เร็ว ปานกลาง และช้า ได้เช่นกัน

3. ผลของระดับน้ำตาลต่อเซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพันของเหงือกของคนปรกติและผู้ป่วยเบาหวานที่อยู่ระหว่างการควบคุมระดับน้ำตาล ซึ่งเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลาต่างๆ

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.), (Table 3). พบว่า เมื่อเลี้ยงเซลล์เป็นระยะเวลา 1, 3, 7, 10, 14, และ18 วัน เซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพันของเหงือกของคนปรกติและผู้ป่วยเบาหวานที่อยู่ระหว่างการควบคุมระดับน้ำตาล สามารถเจริญและแบ่งตัวเพิ่มจำนวนได้ที่ความเข้มข้นของระดับน้ำตาลกลูโคสที่ศึกษา (ปรกติ ถึง สูงกว่าปรกติ 10.7 เท่า) โดยมีความแตกต่างของความหนาแน่นของเซลล์ในจานเพาะเลี้ยงขนาด 24 หลุม ที่สังเกตได้จากการย้อมสี (Figures 3 & 4) และศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงร่วมกับการนับเซลล์ที่ระยะเวลาต่างๆโดยใช้ฮีโมไซโตมีเตอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับ และนำค่าที่นับได้มาแสดงเป็นโกรตเคิร์ฟกึ่งล็อค (Figure 5) จากโกรตเคิร์ฟกึ่งล็อค สามารถจำแนกเซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพันของเหงือกตามความสามารถในการแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวน และค่าคำนวณจำนวนรอบวงจรของเซลล์ (Figure 6) ได้เป็น 3 กลุ่ม คือความสามารถสูง (High), ปานกลาง (Moderate) และ ต่ำ (Low) โดยกลุ่มที่มีความสามารถในการเพิ่มจำนวนสูง มีค่าคำนวณจำนวนรอบเซลล์ ณ วันที่ 14 และ 18 (Figure 6G & 6H) ของการเพาะเลี้ยงประมาณ 8-9 รอบ, กลุ่มที่มีความสามารถปานกลาง มีค่าคำนวณจำนวนรอบเซลล์ ประมาณ 6 รอบถึงต่ำกว่า 8 รอบ, กลุ่มที่มีความสามารถต่ำ มีค่าคำนวณจำนวนรอบเซลล์ ประมาณต่ำกว่า 6 รอบ และจากวันที่ 14 ถึงวันที่ 18 กลุ่มที่มีความสามารถสูง มีแนวโน้มเพิ่มจำนวนได้อีก (Exponential phase), กลุ่มที่มีความสามารถปานกลาง เข้าช่วงที่เซลล์หยุดแบ่งเซลล์เนื่องจากเซลล์อยู่ชิดกันมากจนเกิด contact inhibition ขึ้น (Plateau

phase) กลุ่มที่มีความสามารถต่ำแม้มีแนวโน้มเพิ่มจำนวนได้อีกและยังอยู่ในเอ็กซโพเนนเชียลเฟสแต่มีความสามารถในการเพิ่มจำนวนต่ำ

4. ผลการทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพของโครงร่างไคโตซานผสมผงเปลือกหอยเป๋าฮื้อและใยไหมกับเซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพันของเหงือกของคนปรกติ และเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ของคนปรกติ โดยวิธี MTT

โครงร่าง 2%ไคโตซานผสม 5% ผงเปลือกหอยเป๋าฮื้อและเส้นใยไหม ได้ผ่านการทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพกับเซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพันของเหงือกของคนปรกติ และเซลล์เอ็นยึดปริทันต์ของคนปรกติ โดยวิธี MTT (Figure 7) ได้ค่า ร้อยละของเซลล์ที่รอดชีวิต (% of Cell Viability) มีค่าประมาณ 80% ขึ้นไปถึง 100 % ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากกลุ่มควบคุมเชิงบวก เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 2 วัน, 8 วัน, 13 วัน, และ 18 วัน โดยเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ ทุก 2-5 วัน เป็นจำนวน 0, 1, 3, และ 4 ครั้ง และโครงร่างถูกแช่นาน 2 วัน, 5 วัน, 4 วัน, และ 4 วัน ก่อนนำอาหารที่เพาะเลี้ยงเซลล์จากหลุมที่มีและไม่มีโครงร่าง มาใช้ทดสอบ MTT ตามลำดับ.

5. ผลการทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพโครงร่าง 3 มิติที่ผลิตขึ้นกับเซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพันของเหงือก และเอ็นยึดปริทันต์ของคนปรกติและผู้ป่วยเบาหวานที่อยู่ระหว่างการควบคุมระดับน้ำตาล

เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพันของเหงือก และเอ็นยึดปริทันต์ของคนปรกติและผู้ป่วยเบาหวานที่อยู่ระหว่างการควบคุมระดับน้ำตาล โดยใช้ทรานซ์เวลล์อินเสิร์ต 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) จากภาพถ่ายจากกล้องสเตอรีโอ พบว่าเซลล์ทั้งสองชนิดไม่สามารถแทรกผ่านเมมเบรนที่มีรูขนาด 0.4 ไมโครเมตร ทุกช่วงเวลาที่ศึกษา ณ วันที่ 5 (Figure 8) เริ่มสังเกตพบเซลล์ทางด้านล่างของ

เมมเบรนที่มีรูขนาด 3 และ 8 ไมโครเมตร โดยพบว่ารูที่มีขนาดใหญ่มีเซลล์ผ่านมาทางด้านล่างมากกว่า และพบว่าเซลล์ที่อยู่ทางด้านล่างมีจำนวนมากขึ้น ณ วันที่ 7 และ 14 ตามลำดับ รูปแบบการเรียงตัวของเซลล์ ในทรานซ์เวลล์อินเสิร์ตที่มีเมมเบรนที่มีรูขนาด 0.4 ไมโครเมตร มีลักษณะหนาแน่นมาก และเมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์นานขึ้น พบการติดสีทึบของกลุ่มเซลล์และ/หรือสารที่เซลล์สร้างขึ้น มีลักษณะเป็นจุดเล็กๆ (Grain) เป็นเส้น (Line) เป็นแถบ (Band) เป็นกลุ่ม (Aggregate) หรือ รวมเป็นปื้น (Patch)

เมื่อนำโครงร่าง 3 มิติที่ผลิตขึ้นไปทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพกับเซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพันของเหงือก และเอ็นยึดปริทันต์ของคนปรกติและผู้ป่วยเบาหวานที่อยู่ระหว่างการควบคุมระดับน้ำตาล โดยเพาะเลี้ยงร่วมกับเซลล์ในทรานซ์เวลล์อินเสิร์ต เช่นเดียวกับข้างต้น พบว่าเซลล์ทั้งสองชนิดสามารถเจริญร่วมกับโครงร่างได้ และมีผลต่อรูปแบบการกระจายตัวและความหนาแน่นของเซลล์/เมทริกซ์ ที่อยู่ทางด้านในของทรานซ์เวลล์อินเสิร์ต เซลล์ไม่สามารถแทรกผ่านเมมเบรนที่มีรูขนาด 0.4 ไมโครเมตร ทุกช่วงเวลาที่ศึกษา ณ วันที่ 5 เริ่มสังเกตพบเซลล์ทางด้านล่างของเมมเบรนที่มีรูขนาด 3 และ 8 ไมโครเมตร โดยพบว่ารูที่มีขนาดใหญ่มีเซลล์ผ่านมาทางด้านล่างมากกว่า และพบว่าเซลล์ที่อยู่ทางด้านล่างมีจำนวนมากขึ้น ณ วันที่ 7 (Figure 9) และ 14 ตามลำดับเช่นเดียวกับเมื่อไม่มีโครงร่าง หากแต่รูปแบบการเรียงตัวของเซลล์ ในทรานซ์เวลล์อินเสิร์ตที่มีเมมเบรนที่มีรูขนาด 0.4 ไมโครเมตร มีลักษณะหนาแน่นน้อยกว่าเมื่อไม่มีโครงร่าง และเมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์นานขึ้น พบการติดสีทึบของกลุ่มเซลล์และ/หรือสารที่เซลล์สร้างขึ้น มีลักษณะเป็นจุดเล็กๆ (Grain) และ เป็นเส้น (Line) ส่วนลักษณะที่เป็นแถบ (Band) เป็นกลุ่ม (Aggregate) หรือ รวมเป็นปื้น (Patch) พบน้อยลงมากเมื่อเทียบกับเมื่อไม่มีโครงร่าง

เมื่อใช้ใบมีดตัดแผ่นเมมเบรนออกจากทรานซ์เวลล์อินเสิร์ต และนำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนแบบส่องกราด (Figures 10 & 11) พบเซลล์เกาะอยู่บนเมมเบรนและมีส่วนของเซลล์ ปิดบังรูของเมมเบรนไว้ มากน้อยขึ้นกับการกระจายของเซลล์ และจำนวนวันที่เพาะเลี้ยงเซลล์