บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

แผ่นไคโตซานที่มีดีอะเซทิลเลชันร้อยละ 75.9 และ 95.4 (ได้รับความอนุเคราะห์จาก ดร. มาลินี ประสิทธิ์ศิลป์ ศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ)

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; GIBCO BRL, USA)

Hank's Balance Salt Solution (GIBCO BRL, USA)

Antibiotics – antimycotics solution (GIBCO BRL, USA)

L – glutamine (GIBCO BRL, USA)

Fetal bovine serum (GIBCO BRL, USA)

Trysin EDTA (GIBCO BRL, USA)

สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 7.4

น้ำยากลูตารัลดีไฮด์ความเข้มข้นร้อยละ 2.0 ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 7.4

สารละลายออสเมียมเตตราออกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 2.0 ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 7.4

น้ำยาฆ่าเชื้อโรค

แอลกอฮอล์ความเข้มข้นร้อยละ 100

อุปกรณ์เบ็ดเตล็ด เช่น พาสเจอร์ปิเปต (Pasteur pipette) ถุงมือ เทปติดฉลาก กระดาษซับ และอื่นๆ

จานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 35 มม. (culture dish; Falcon, USA)

อุปกรณ์เพาะเลี้ยงเซลล์ (culture chamber) ที่ใช้ในการทดสอบคุณสมบัติการซึมผ่านของของเหลวในแผ่นไคโตซาน (ภาพที่ 4A, 4B)

ตู้ปลอดเชื้อสำหรับเตรียมเซลล์ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (laminar flow; MDH, USA)

ตู้อบเพาะเลี้ยงเซลล์ (CO_2 incubator; SHELL LAB, USA)

เครื่องเหวี่ยงแบบตั้งโต๊ะ (bench top centrifuge; Hermle Z 320, USA)

กล้องจุลทรรศน์เฟสคอนทราสต์ชนิดหัวกลับ (inverted phase contrast microscope; Olympus, Japan)

กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (scanning electron microscope; JEOL JSM - 5410 LV, Japan)

แผ่นไคโตซานและวิธีการเตรียม

แผ่นไคโตซานที่ใช้ในการวิจัยนี้มี 2 ชนิด คือ

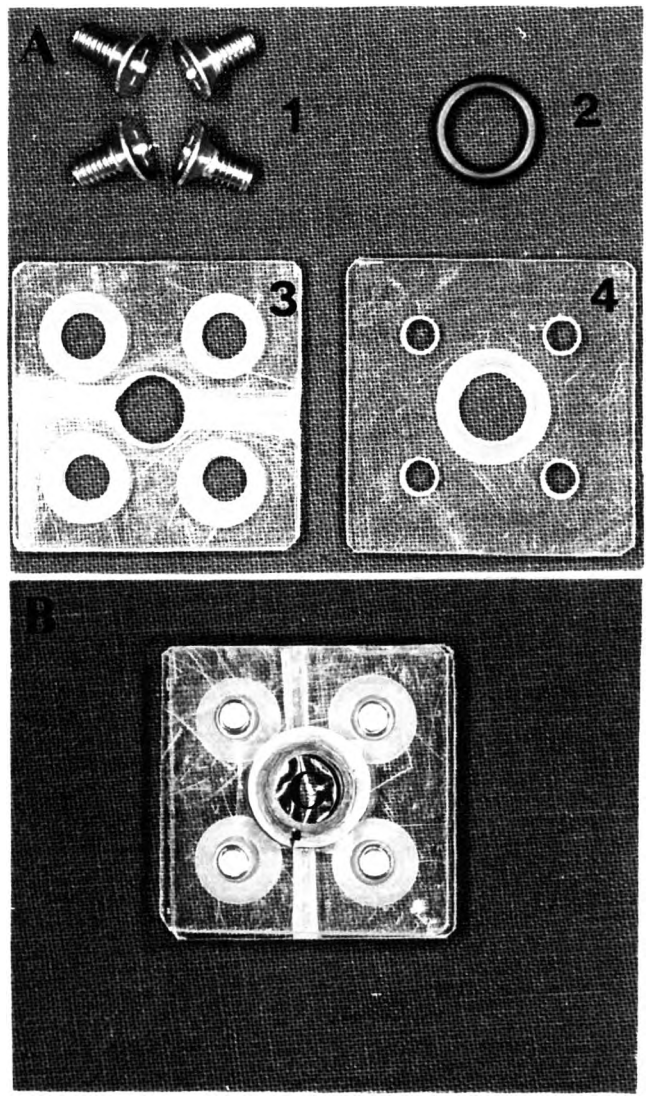
1. ชนิดที่มีดีอะเซทิลเลชันร้อยละ 75.9 มีลักษณะเป็นแผ่นเรียบความหนาเฉลี่ย 0.13 มม. แผ่นไคโตซานชนิดนี้มีความขุ่นมากกว่าแผ่นชนิดที่ 2
2. ชนิดที่มีดีอะเซทิลเลชันร้อยละ 95.4 มีลักษณะเป็นแผ่นเรียบใส ความหนาเฉลี่ย 0.12 มม.

นำแผ่นไคโตซานทั้ง 2 ชนิดที่ตัดให้ได้ขนาดและรูปร่างตามต้องการสำหรับแต่ละการทดลองไปแช่น้ำ เพื่อให้แผ่นมีความยืดหยุ่นและความเหนียวมากขึ้น แผ่นไคโตซานมีคุณสมบัติในการอุ้มน้ำได้ดี ดังนั้นเมื่อผ่านการแช่น้ำแล้ว แผ่นจะมีความหนามากขึ้นเป็น 2 เท่า คือ เป็น 0.26 และ 0.24 มม. ตามลำดับ และจะคงความหนานี้ไปตลอดแม้ว่าจะได้รับการแช่น้ำที่นานขึ้น เมื่อผ่านการแช่น้ำแล้ว นำไปทำให้ปลอดเชื้อโดยการแช่ในสารละลาย DMEM ที่มี antibiotics-antimycotics solution ร้อยละ 5 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วล้างออกอีก 3 ครั้งด้วยสารละลาย DMEM ที่ปราศจาก antibiotics-antimycotics solution จากนั้นจึงนำไปทำการทดลองต่อไป

ภาพที่ 4 ภาพถ่ายแสดงลักษณะของอุปกรณ์เพาะเลี้ยงเซลล์พิเศษ (culture chamber) ที่ประดิษฐ์ขึ้นมาเพื่อการทดสอบคุณสมบัติการยอมให้สารละลายอาหารซึมผ่านไปเลี้ยงเซลล์

A. แสดงส่วนประกอบต่างๆของอุปกรณ์เพาะเลี้ยงเซลล์พิเศษอันได้แก่ สกรู (1), ยางปะเก็น (2), และแผ่นพลาสติกเจาะรู (3 และ 4)

B. แสดงอุปกรณ์เพาะเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบเรียบร้อยแล้ว และมีแผ่นไคโตซาน (C) บรรจุอยู่


A
1
2
3
4
B

วิธีการดำเนินการวิจัย การศึกษาแบ่งออกเป็น 2 ตอน

การศึกษาตอนที่ 1 ศึกษาความเข้ากันได้ทางชีวภาพของแผ่นไคโตซานต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากเหงือกของคนโดยศึกษาจากลักษณะพฤติกรรมและการยึดเกาะของเซลล์ไฟโบรบลาสต์บนแผ่นไคโตซาน

การเตรียมเซลล์ไฟโบรบลาสต์

เซลล์ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ คือ เซลล์ที่เพาะเลี้ยงจากเนื้อเยื่อเหงือกของผู้ป่วยที่มารับการรักษาด้วยวิธีศัลยกรรมปริทันต์ที่ภาควิชาปริทันตวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยเนื้อเยื่อเหงือกที่นำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้เป็นเนื้อเยื่อปกติจากผู้ป่วยไม่จำกัดเพศและอายุ จำนวน 4 ราย วิธีการที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ได้บรรยายไว้ในรายละเอียดโดย Swasdiaon และคณะ (2000) ซึ่งมีขั้นตอนการเตรียมดังนี้

1. เมื่อได้เนื้อเยื่อเหงือกจากผู้ป่วยแล้ว ล้างเนื้อเยื่อให้สะอาดปราศจากเลือดและน้ำลายด้วยนอร์มัลเซลายน์ (normal saline) จากนั้นนำมาแช่ในสารละลาย DMEM ที่มี antibiotics – antimycotics solution ร้อยละ 5 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
2. ตัดเนื้อเยื่อเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาด 1x1x1 ลบ.มม. วางบนจานเพาะเลี้ยงเซลล์ที่มีขนาด 35 มม. จากนั้นเติมน้ำยาเลี้ยงเซลล์ให้ท่วมชิ้นเนื้อเล็ก ๆ เหล่านั้น น้ำยาเลี้ยงเซลล์ประกอบด้วย

DMEM	ร้อยละ 88
Antibiotics – antimycotics solution	ร้อยละ 1
L – glutamine	ร้อยละ 1
Fetal bovine serum	ร้อยละ 10

เก็บจานเพาะเลี้ยงเซลล์ที่มีชิ้นเนื้อเยื่อเหล่านี้ไว้ในตู้อบเพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระดับคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 และความชื้นสัมพัทธ์สูงสุด

3. เปลี่ยนน้ำยาเลี้ยงเซลล์ทุกวันพร้อมกับศึกษาลักษณะและพฤติกรรมของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์เฟสคอนทราสต์ชนิดหัวกลับ

4. ประมาณวันที่ 3 – 7 ของการเพาะเลี้ยงชิ้นเนื้อเยื่อ จะพบว่ามีเซลล์เริ่มคืบคลานออกจากชิ้นเนื้อเยื่อ (ภาพที่ 5A) เซลล์เหล่านี้ประกอบด้วยเซลล์หลายชนิดปะปนกันอยู่ เมื่อเซลล์คลานออกจากชิ้นเนื้อจนหนาแน่นแล้ว จะทำการ "ซับคัลเจอร์" (subculture) ซึ่งเป็นการย้ายเซลล์ที่หนาแน่นเหล่านั้นไปยังจานเพาะเลี้ยงใหม่ในจำนวนที่น้อยลง (ประมาณ 10,000 เซลล์ใน 1 มล. ของน้ำยาเลี้ยงเซลล์) การย้ายเช่นนี้นอกจากเป็นการลดความหนาแน่นของเซลล์เพื่อให้ได้รับอาหารอย่างเพียงพอแล้ว ยังเป็นการกำจัดเซลล์ชนิดอื่นที่ไม่ใช่เซลล์ไฟโบรบลาสต์ออกด้วย โดยอาศัยหลักการที่ว่าเซลล์ไฟโบรบลาสต์สามารถยึดเกาะติดกับพื้นผิวของจานเพาะเลี้ยงได้ดีและเร็วกว่าเซลล์ชนิดอื่น

   การทำซับคัลเจอร์ทำได้โดยการย่อยโปรทีนที่ช่วยในการยึดเกาะของเซลล์ ด้วยเอนไซม์ trypsin – EDTA ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 – 10 นาที เซลล์ที่ยึดเกาะอยู่จะหลุดและลอยตัวขึ้นจากพื้นของจานเพาะเลี้ยง หยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ด้วย trypsin inhibitor แล้วกรองเซลล์ที่ได้ ด้วยกระดาษเช็ดเลนส์ (lens paper) จากนั้นเหวี่ยงให้เซลล์ตกตะกอนด้วยเครื่องเหวี่ยงแบบตั้งโต๊ะที่ 2000 g เป็นเวลา 5 นาที ดูดน้ำยาเพาะเลี้ยงเซลล์เก่าที่มีเอนไซม์ผสมอยู่ออก และเปลี่ยนเป็นน้ำยาเพาะเลี้ยงเซลล์ใหม่ นับจำนวนเซลล์ที่ได้ จากนั้นใส่ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ใหม่ด้วยความเข้มข้นของเซลล์ประมาณ 10,000 เซลล์ใน 1 มล. ของน้ำยาเพาะเลี้ยงเซลล์ เก็บเซลล์เหล่านั้นในตู้อบและเปลี่ยนน้ำยาเพาะเลี้ยงเซลล์ทุกวัน เมื่อทำการซับคัลเจอร์หลายครั้งพบว่า สามารถทำให้ได้เซลล์ไฟโบรบลาสต์ล้วน เมื่อผ่านไปประมาณ รอบที่ 4 หรือ 5 ของการทำซับคัลเจอร์ (ภาพที่ 5B)
5. เซลล์ที่นำมาศึกษาเป็นเซลล์ที่ได้จากการซับคัลเจอร์ รุ่นที่ 5 ถึงรุ่นที่ 8

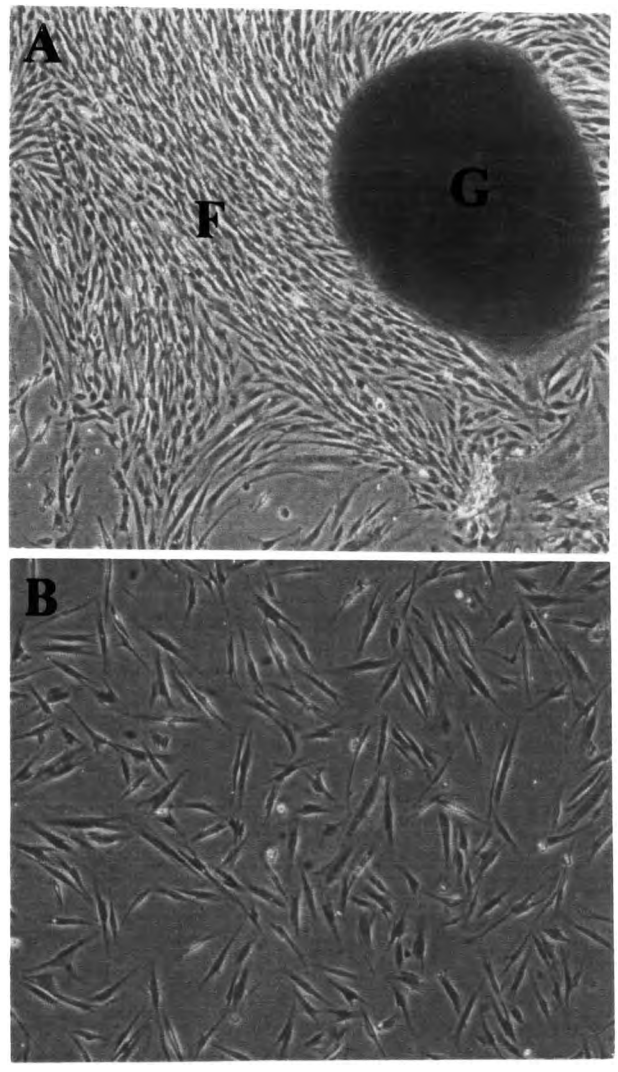
การเพาะเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์บนแผ่นไคโตซาน

1. นำแผ่นไคโตซานทั้ง 2 ชนิดมาตัดเป็นรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้าที่มีขนาดประมาณ 4x2 มม. ชนิดละ 6 แผ่น ก่อนนำมาใช้ทดสอบนำแผ่นไคโตซานชิ้นเล็กๆ เหล่านี้ไปผ่านการแช่น้ำและทำให้ปลอดเชื้อดังบรรยายไว้ในหัวข้อ "แผ่นไคโตซานและวิธีการเตรียม" แล้วนำไปติดที่พื้นของจานเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยขี้ผึ้งทางทันตกรรม โดยติดที่พื้นด้านในของจานเพาะเลี้ยง จานละ 3 แผ่น (ภาพที่ 6A)

ภาพที่ 5 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์เฟสคอนทราสต์ชนิดหัวกลับของการเพาะเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากชิ้นเนื้อเยื่อที่ได้จากผู้ป่วย

A. แสดงตัวอย่างชิ้นเนื้อ (G) ที่มีเซลล์ (F) คืบคลานออกมาจากชิ้นเนื้อ หลังทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ได้ 7 วัน

B. แสดงเซลล์ไฟโบรบลาสต์ล้วนที่ได้จากการทำ "ซับคัลเจอร์ "ครั้งที่ 4 สังเกตได้จากเซลล์ที่ได้เป็นเซลล์รูปกระสวยลักษณะเดียวกันทั้งหมด



I 20340989

ภาพที่ 6 ภาพวาดแสดงวิธีการทดลองตอนที่ 1

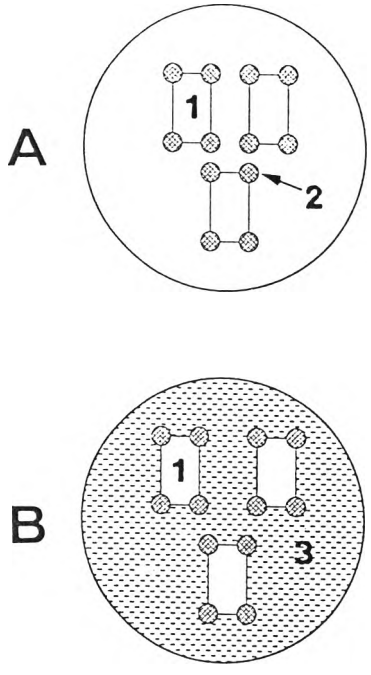
A: ติดแผ่นไคโตซานในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยขี้ผึ้งทางทันตกรรม

B: เลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์ร่วมกับแผ่นไคโตซานในจานเพาะเลี้ยงเซลล์

1= แผ่นไคโตซาน

2= ขี้ผึ้งทางทันตกรรม

3= เซลล์ไฟโบรบลาสต์


A
1
2
B
1
3

2. จากนั้นย้ายเซลล์ที่ได้จากการทำซับคัลเจอร์จนได้เป็นเซลล์ไฟโบรบลาสต์ล้วนใส่ลงไปในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ที่มีแผ่นไคโตซานติดอยู่ ด้วยความหนาแน่น 100,000 เซลล์ใน 1 มล. ของน้ำยาเพาะเลี้ยงเซลล์ (ภาพที่ 6 B)
3. เก็บจานเพาะเลี้ยงเซลล์ไว้ในตู้อบเพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระดับคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 และความชื้นสัมพัทธ์สูงสุด
4. ศึกษาลักษณะและพฤติกรรมของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรรศน์เฟสคอนทราสต์ชนิดหัวกลับเป็นระยะ และบันทึกผลการศึกษาด้วยภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์เฟสคอนทราสต์ชนิดหัวกลับ เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ร่วมกับแผ่นไคโตซานเป็นเวลา 3, 5, 7 และ 10 วันตามลำดับ
5. จากนั้นนำไปเตรียมตัวอย่างเพื่อการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (วิธีการเตรียมตัวอย่างเพื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนได้บรรยายไว้ในหัวข้อ"การเตรียมแผ่นไคโตซานสำหรับการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด")
6. ทำการทดลองซ้ำ 4 ครั้ง โดยใช้เซลล์จากผู้ป่วยไม่ซ้ำรายกัน

การศึกษาตอนที่ 2 ศึกษาเรื่องการยอมให้สารละลายอาหารซึมผ่านของแผ่นไคโตซานไปยังเซลล์ที่เพาะเลี้ยงอยู่คนละด้านกับสารละลาย

การทดสอบการซึมผ่านของสารละลายอาหารของแผ่นไคโตซานโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์ ทำได้โดย

1. นำแผ่นไคโตซานทั้ง 2 ชนิดมาตัดเป็นรูปสี่เหลี่ยมขนาด 8x8 มม. ชนิดละ 2 แผ่น โดยที่แต่ละชนิดใช้เป็นแผ่นทดลอง 1 แผ่น และเป็นแผ่นควบคุม 1 แผ่น จากนั้นนำมาแช่น้ำและทำให้ปลอดเชื้อดังบรรยายไว้ในหัวข้อ "แผ่นไคโตซานและวิธีการเตรียม"
2. นำแผ่นไคโตซานที่เตรียมไว้มาขึงบนอุปกรณ์เพาะเลี้ยงเซลล์ชนิดพิเศษ (culture chamber) ที่ประดิษฐ์ขึ้นมาเพื่อทดสอบการศึกษาการซึมผ่านของสารละลายอาหารของแผ่นไคโตซาน (ภาพที่ 7A)
3. ย้ายเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ได้จากการทำซับคัลเจอร์ลงไปในหลุมของอุปกรณ์เพาะเลี้ยงเซลล์ที่มีแผ่นไคโตซานขึงอยู่ด้วยความหนาแน่น 100,000 เซลล์ใน 1 มล. ของน้ำยาเพาะเลี้ยงเซลล์ (ภาพที่ 7B, 7D)

4. เก็บไว้ในตู้อบเพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระดับคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 และความชื้นสัมพัทธ์สูงสุดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง
5. เมื่อเพาะเลี้ยงครบ 24 ชั่วโมงแล้ว ในกลุ่มทดลองจะทำการกลับด้านของอุปกรณ์เพาะเลี้ยงเซลล์และใส่น้ำยาเพาะเลี้ยงเซลล์ในหลุมที่ไม่มีเซลล์ซึ่งอยู่อีกด้านหนึ่ง ส่วนด้านที่มีเซลล์ใส่น้ำยา Hank's Balance Salt Solution ให้สัมผัสกับเซลล์ (ภาพที่ 7E) สำหรับกลุ่มควบคุมยังคงอยู่ในลักษณะเดิม (ภาพที่ 7C)
6. จากนั้นทำการเปลี่ยนน้ำยาเลี้ยงเซลล์ทุกวัน และเมื่อครบระยะเวลา 3 วัน และ 7 วัน นำแผ่นไคโตซานที่มีเซลล์ในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองเกาะอยู่ไปเตรียมตัวอย่างเพื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด
7. ทำการศึกษาซ้ำ 4 ครั้งโดยใช้เซลล์จากผู้ป่วยไม่ซ้ำรายกัน

การเตรียมแผ่นไคโตซานสำหรับการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด

เมื่อครบกำหนดเวลาของการเพาะเลี้ยงเซลล์ในแต่ละการทดลองแล้ว นำแผ่นไคโตซานออกจากจานเพาะเลี้ยงเซลล์หรืออุปกรณ์เพาะเลี้ยงเซลล์ ล้างด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 7.4 (PB) จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นนำไปแช่ในสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ความเข้มข้นร้อยละ 2 ใน PB ไม่น้อยกว่า 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ล้างแผ่นไคโตซานด้วย PB อีก 3 ครั้ง นำไปแช่ต่อในสารละลายออสเมียมเตตราออกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 2 ใน PB เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PB อีก 3 ครั้ง ก่อนทำการกำจัดน้ำออก (dehydration) ด้วยการแช่ตัวอย่างในเอธานอลที่มีความเข้มข้นร้อยละ 35, 50, 75, 95, 100 และ 100 ตามลำดับ โดยใช้เวลาแช่นาน 15 นาทีในแต่ละความเข้มข้นของเอธานอล นำชิ้นตัวอย่างไปทำให้แห้งที่จุดวิกฤติ (critical point drying) จากนั้นนำแผ่นไคโตซานไปยึดติด (mount) บนแท่นทองเหลือง (stub) และเคลือบผิวตัวอย่าง (coat) ด้วยอนุภาคทอง ศึกษาการยึดเกาะของเซลล์ (ในการศึกษาตอนที่1) และการอยู่รอดของเซลล์ที่ได้รับสารละลายอาหารที่ซึมผ่านแผ่นไคโตซาน (ในการศึกษาตอนที่ 2) ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราดที่กำลังขยาย 200, 1000 และ 3500

ภาพที่ 7 ภาพวาดแสดงวิธีการทดลองตอนที่ 2

A. แสดงอุปกรณ์เพาะเลี้ยงเซลล์พิเศษที่มีแผ่นไคโตซานติดอยู่
(1= สกรู, 2 = ยางปะเก็น , 3 = แผ่นพลาสติก, และ 4 = แผ่นไคโตซาน)

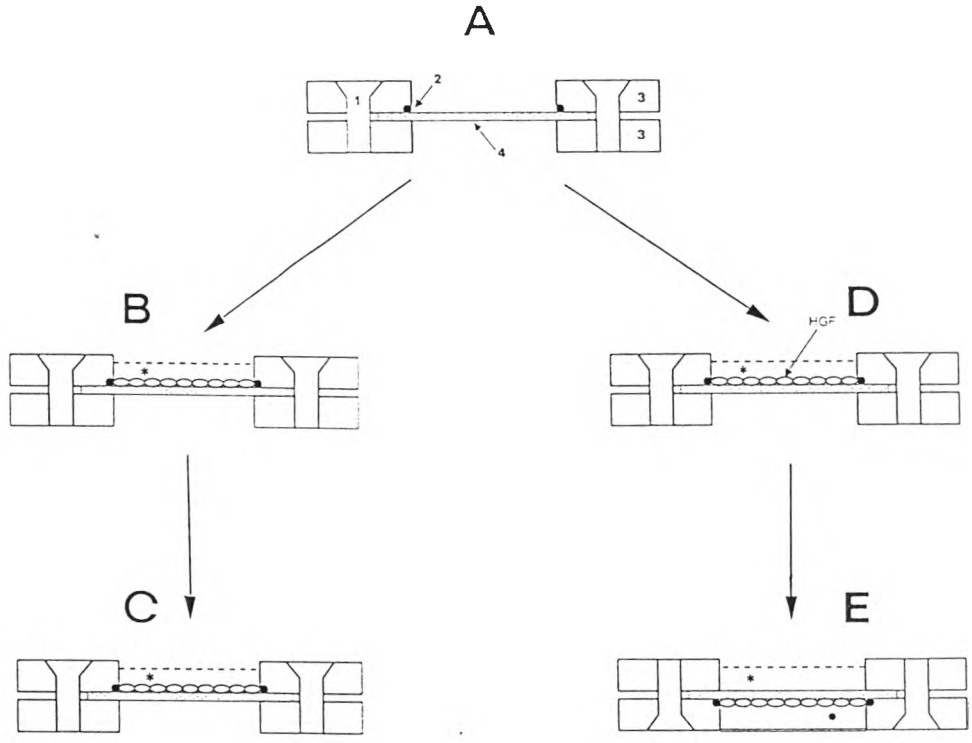
B. และ D แสดงการเพาะเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (HGF) บนแผ่นไคโตซานในอุปกรณ์เพาะเลี้ยงเซลล์ในกลุ่มควบคุม (B) และกลุ่มทดลอง (D)

C. แสดงการเพาะเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์บนแผ่นไคโตซานในอุปกรณ์เพาะเลี้ยงเซลล์ในกลุ่มควบคุม หลังจากผ่านการเลี้ยงไปได้ 24 ชั่วโมง ซึ่งยังคงเพาะเลี้ยงในลักษณะเดิมต่อไป

E. แสดงการทดลอง โดยการกลับด้านของอุปกรณ์เพาะเลี้ยงเซลล์หลังจากผ่านการเลี้ยงเซลล์ไปได้ 24 ชั่วโมง เซลล์ไฟโบรบลาสต์จะถูกกลับไปอยู่ด้านล่างและสัมผัสกับสารละลาย Hank's Balance Salt Solution แทน ส่วนด้านบนใส่น้ำยาเพาะเลี้ยงเซลล์เหมือนเดิม

(*) = น้ำยาเพาะเลี้ยงเซลล์

(*) = สารละลาย Hank's Balance Salt Solution


A
1
2
3
3
4
B
C
D
HGF
E