

ความเข้ากันได้ทางชีวภาพของแผ่นโคโตนานกับเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากเหงือกของคน

นางสาวสุทธิพลินทร์ สุวรรณกุล



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาปริทันตศาสตร์ ภาควิชาปริทันตวิทยา

คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2544

ISBN 974-03-0930-5

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

BIOCOMPATIBILITY OF CHITOSAN SHEET TO HUMAN GINGIVAL FIBROBLASTS

MS. Suttipalin Suwannakul

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Periodontology

Department of Periodontology

Faculty of Dentistry

Chulalongkorn University

Academic Year 2001

ISBN 974-03-0930-5

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ความเข้ากันได้ทางชีวภาพของแผ่นโคโตนานต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์จาก เหงือกของคน
โดย	นางสาวสุทธิพลินทร์ สุวรรณกุล
สาขาวิชา	ปริทัศน์ศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษา	อาจารย์ ทันทแพทย์หญิง อรวรรณ จรัสกลางกูร
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รองศาสตราจารย์ ทันทแพทย์หญิง ดร. สมพร สวัสดิ์สรรพ

คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็น
ส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีคณะทันตแพทยศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ ทันทแพทย์ สุรสิทธิ์ เกียรติพงษ์สาร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ทันทแพทย์หญิง สุธิตา ภูศิริ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(อาจารย์ ทันทแพทย์หญิง อรวรรณ จรัสกลางกูร)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(รองศาสตราจารย์ ทันทแพทย์หญิง ดร. สมพร สวัสดิ์สรรพ)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ทันทแพทย์ สิทธิพร เทพบรรเทิง)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ทันทแพทย์ ดร. มโน คุร์ตัน)

บทคัดย่อวิทยานิพนธ์

น.ส. สุทธิพลินทร์ สุวรรณกุล : ความเข้ากันได้ทางชีวภาพของแผ่นไคโตซานต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากเหงือกของคน. (BIOCOMPATIBILITY OF CHITOSAN SHEET TO HUMAN GINGIVAL FIBROBLASTS) อ. ที่ปรึกษา : อาจารย์ ทันตแพทย์หญิง อรวรรณ จรัสกุลกลางกูร, อ. ที่ปรึกษาร่วม : รองศาสตราจารย์ ทันตแพทย์หญิง สมพร สวัสดิ์สิทธิ์ , 70 หน้า. ISBN 974-03-0930-5.

วิธีการชักนำให้เกิดการงอกใหม่ของเนื้อเยื่อ หรือ จีทีอาร์ เป็นวิธีการรักษาแบบบูรณาการที่นำมาใช้ในการรักษาโรคปริทันต์อักเสบ แผ่นเยื่อขวางกันเป็นเครื่องมือสำคัญที่นำมาใช้เพื่อให้บรรลุเป้าหมายของการรักษาได้ มีแผ่นเยื่อที่ผลิตขึ้นทางการค้าหลายชนิด เช่น แผ่นเยื่อคอร์-เท็กซ์ แผ่นคอลลาเจน หรือ แผ่นกรดโพลีแลคติก ที่มีรายงานพบว่าให้ผลดีการรักษาเป็นที่น่าพอใจ นอกจากนี้ยังมีการนำแผ่นยางกันน้ำลายและแผ่นซิลิโคนมาใช้เป็นแผ่นเยื่อขวางกัน แต่แผ่นเยื่อเหล่านี้ยังมีข้อบกพร่องอยู่ ดังนั้นความพยายามในการหาแผ่นเยื่อขวางกันที่เหมาะสมจึงยังคงมีอยู่ สารไคโตซานมีคุณสมบัติทางการแพทย์ที่ดีหลายประการและมีราคาถูก และอาจมีความเป็นไปได้ในการนำมาทำเป็นแผ่นเยื่อขวางกัน การวิจัยนี้จึงมีจุดประสงค์เพื่อ ศึกษาความเข้ากันได้ทางชีวภาพของแผ่นไคโตซานกับเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากเนื้อเยื่อเหงือกของคน และคุณสมบัติการยอมให้สารละลายอาหารผ่านของแผ่นไคโตซาน โดยในการศึกษาใช้วิธีเพาะเลี้ยงเซลล์ร่วมกับแผ่นไคโตซานในห้องปฏิบัติการและการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์เฟสคอนทราสต์ชนิดหัวกลับและกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด ผลการศึกษาพบว่า มีการเจริญและการยึดเกาะของเซลล์ไฟโบรบลาสต์บนแผ่นไคโตซานที่มีดีอะเซทิลเลชันร้อยละ 75.9 และ 95.4 แต่เซลล์มีจำนวนมากกว่าและการยึดเกาะที่ดีกว่าบนแผ่นที่มีดีอะเซทิลเลชันร้อยละ 95.4 นอกจากนี้ยังพบว่ามีเซลล์เจริญได้บนแผ่นไคโตซานด้านที่ไม่ได้สัมผัสกับน้ำยาเพาะเลี้ยงเซลล์โดยตรง ที่ระยะเวลาของการเพาะเลี้ยงเซลล์ เป็นเวลา 7 วัน พบว่าเซลล์ที่พบบนแผ่นไคโตซานที่มีดีอะเซทิลเลชันร้อยละ 95.4 มีจำนวนน้อยลงและมีการยึดเกาะที่ไม่ดีเท่าเซลล์ที่พบบนแผ่นที่มีดีอะเซทิลเลชันร้อยละ 75.9 จากการศึกษาชี้ให้เห็นว่าแผ่นไคโตซานมีความเข้ากันได้ทางชีวภาพกับเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากเหงือกของคน และมีคุณสมบัติการยอมให้สารละลายอาหารผ่าน โดยคุณสมบัติทั้งสองข้อนี้อาจแตกต่างกันขึ้นกับร้อยละของดีอะเซทิลเลชัน

ภาควิชา ปริทันต์วิทยา
สาขาวิชา ปริทันต์ศาสตร์
ปีการศึกษา 2544

ลายมือชื่อนิสิต *สุทธิพลินทร์ สุวรรณกุล*
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา *อรวรรณ จรัสกุลกลางกูร*
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม *สมพร สวัสดิ์สิทธิ์*

ABSTRACT

4276125732 : MAJOR Periodontology

KEY WORD: Biocompatibility / Cell culture / Chitosan / Human gingival fibroblast /

MS. SUTTIPALIN SUWANNAKUL : BIOCOMPATIBILITY OF CHITOSAN SHEET TO HUMAN GINGIVAL FIBROBLASTS . THESIS ADVISOR : ORAWAN CHARATKULANGKUN, THESIS COADVISOR : ASSOC.PROF. SOMPORN SWASDISON, 70 pp. ISBN 974-03-0930-5.

Guided Tissue Regeneration (GTR) is one of the regenerative procedures in periodontitis treatment. The barrier membrane is an important device to achieve the goal of the treatment. Several commercial barrier membranes such as Gore-tex, collagen membrane and polylactic acid membrane have been reported with satisfactory clinical outcome. Rubber dam sheet and silicone sheet are also introduced as barrier membranes in GTR but these membranes still have disadvantages. Attempts to find a more appropriate barrier membrane is performed. Chitosan has recently been approved to be a good and inexpensive medical material and may be used as a barrier membrane. The objective of this study was aimed to investigate the biocompatibility of chitosan sheet to human gingival fibroblasts and the permeability of chitosan sheet by cell culture technique and scanning electron microscopy. The results from cell culture and microscopic study showed good attachment and growth of fibroblastic cells on chitosan sheet both with 75.9% and 95.4% deacetylation. However, the growth and attachment of cells on 95.4% deacetylated sheet appeared to be better than those with 75.9% deacetylation. On day 7 of the permeability test, fibroblastic cells on chitosan with 95.4% deacetylation have less attachment and growth when compared with those of 75.9 % deacetylation. This study suggested that chitosan sheet is biocompatible to human gingival fibroblasts and also nutrient permeable. Both properties of chitosan may vary depending on the percentage of deacetylation.

Department Periodontology
Field of study Periodontics
Academic year 2001

Student's signature

Suttipalin Suwannakul

Advisor's signature

Orawan Charatkulangkun

Co-advisor's signature

Somporn Swasdison



กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งของอาจารย์ทันตแพทย์หญิง อรรพรรณ จรัสกลางกร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาสละเวลาอันมีค่าในการดูแลเอาใจใส่ ให้ความรู้ คำแนะนำในการทำวิทยานิพนธ์ และการศึกษาวิจัยครั้งนี้ได้รับความกรุณาและความช่วยเหลืออย่างดียิ่ง จากรองศาสตราจารย์ ทันตแพทย์หญิง ดร.สมพร สวัสดิธรรม อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้กรุณาสละเวลาอันมีค่าในการดูแลเอาใจใส่ ให้ความรู้ คำแนะนำ ข้อคิดเห็น รวมทั้งให้ความช่วยเหลือในการแก้ไขปัญหาทั้งในส่วนของการทำงานวิจัยในห้องปฏิบัติการและการเขียนวิทยานิพนธ์โดยตลอดมา จนการทำวิทยานิพนธ์เป็นที่เรียบร้อย และรองศาสตราจารย์ ทันตแพทย์หญิง ดร.วันดี อภินทรมิต ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำในการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด และข้อคิดเห็นอันเป็นประโยชน์ในการทำวิทยานิพนธ์

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ อ.ทพ.ดร. ณรงค์ ลุมพิกานนท์ ภาควิชาศัลยศาสตร์ ที่ได้กรุณาให้ความอนุเคราะห์ชิ้นเนื้อเหงือกที่ใช้ในงานวิจัยครั้งนี้

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ดร. มาลินี ประสิทธิ์ศิลป์ ศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์ในการเตรียมแผ่นโคโตซานที่ใช้ในงานวิจัยครั้งนี้

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณคณาจารย์และเจ้าหน้าที่ทุกท่านของภาควิชาปริทันตวิทยา ภาควิชาทันตพยาธิวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ คุณรุจิพร ประทีปเสน ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ให้ความเอื้อเฟื้อในการจัดเตรียมตัวอย่างเนื้อเยื่อ เครื่องมือ ตลอดจนสถานที่ที่ใช้ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้สนับสนุนทุนในการทำวิจัยครั้งนี้

ท้ายนี้ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และสมาชิกในครอบครัวทุกท่าน ที่ได้ให้การสนับสนุนและกำลังใจแก่ผู้วิจัยเสมอมา ประโยชน์ ความรู้ และคุณค่าที่ได้จากการศึกษานี้ผู้วิจัยขอมอบแต่ผู้มีพระคุณทุกท่าน

สุทธิพลินทร์ สุวรรณกุล

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญภาพ.....	ณ
คำอธิบายคำย่อและสัญลักษณ์.....	ฎ
บทที่	
1 บทนำ.....	1
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
โรคปริทันต์อักเสบและการรักษา.....	4
การหายของแผลหลังการรักษาโรคปริทันต์อักเสบ.....	5
การชักนำให้เกิดการงอกใหม่ของเนื้อเยื่อหรือจีทีอาร์.....	8
แผ่นเยื่อขวางกัน.....	13
แผ่นเยื่อขวางกันชนิดที่ไม่ละลายได้เอง.....	13
แผ่นเยื่อขวางกันชนิดที่ละลายได้เอง.....	14
แผ่นยางกันน้ำลายและแผ่นซิลิโคน.....	16
ไคติน-ไคโตซาน.....	17
การสังเคราะห์สารไคโตซาน.....	18
คุณสมบัติทางกายภาพ-เคมีของสารไคโตซาน.....	18
คุณสมบัติทางชีวภาพของสารไคโตซาน.....	22
ไคโตซานทางการแพทย์และเภสัชกรรม.....	24
ไคโตซานทางทันตกรรม.....	26
ความปลอดภัยในการใช้ไคโตซาน.....	27
3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	29
วัสดุและอุปกรณ์.....	29
แผ่นไคโตซานและวิธีการเตรียมแผ่นไคโตซาน.....	30

3	วิธีดำเนินการวิจัย (ต่อ)	
	วิธีการดำเนินการวิจัย.....	33
	การศึกษาตอนที่ 1 การเตรียมเซลล์ไฟโบร بلاสต์.....	33
	การเพาะเลี้ยงเซลล์ไฟโบร بلاสต์บนแผ่นโคโตซาน.....	34
	การศึกษาตอนที่ 2 การทดสอบการซึมผ่านของสารละลายอาหารของแผ่นโคโตซานโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์.....	39
	การเตรียมแผ่นโคโตซานสำหรับการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด.....	40
4	ผลการวิเคราะห์ข้อมูล.....	43
	การศึกษาปฏิกิริยาของเซลล์ไฟโบร بلاสต์ที่มีต่อแผ่นโคโตซานด้วยกล้องจุลทรรศน์เฟสคอนทราสต์ชนิดส่องกราด.....	43
	การศึกษาปฏิกิริยาของเซลล์ไฟโบร بلاสต์ที่มีต่อแผ่นโคโตซานด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด.....	43
	การศึกษาคุณสมบัติการยอมให้ผ่านของสารละลายอาหารของแผ่นโคโตซานด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด.....	52
5	สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.....	57
	สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	61
	รายการอ้างอิง.....	62
	ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	71

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 แสดงแหล่งที่มาของสารโคติน.....	21
ตารางที่ 2 แสดงคุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของสารโคโตซาน.....	23

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1 ภาพวาดแสดงลักษณะการหายใจของแมลงของอวัยวะปริทันต์.....	6
ภาพที่ 2 ภาพวาดแสดงเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการหายใจของแมลงผ่าตัดและหลักการ ของการรักษาด้วยวิธีซีทีอาร์.....	10
ภาพที่ 3 ภาพวาดแสดงโครงสร้างทางเคมีของไคตินและไคโตซาน.....	19
ภาพที่ 4 ภาพถ่ายแสดงลักษณะของอุปกรณ์เพาะเลี้ยงเซลล์พิเศษที่ประดิษฐ์ขึ้นมาเพื่อการ ทดสอบคุณสมบัติการยอมให้สารละลายอาหารซึมผ่านไปเลี้ยงเซลล์.....	31
ภาพที่ 5 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์เฟสคอนทราสต์ชนิดหัวกลับของการเพาะเลี้ยงเซลล์ ไฟโบร بلاสต์จากชิ้นเนื้อเยื่อที่ได้จากผู้ป่วย.....	35
ภาพที่ 6 ภาพวาดแสดงวิธีการทดลองตอนที่ 1.....	37
ภาพที่ 7 ภาพวาดแสดงวิธีการทดลองตอนที่ 2.....	41
ภาพที่ 8 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์เฟสคอนทราสต์ชนิดหัวกลับ แสดงให้เห็นการยึดเกาะ ของเซลล์ไฟโบร بلاสต์ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับแผ่นไคโตซานที่มีดีอะเซทิลเลชัน ร้อยละ 75.9 (การทดลองตอนที่ 1).....	44
ภาพที่ 9 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์เฟสคอนทราสต์ชนิดหัวกลับ แสดงให้เห็นการยึดเกาะ ของเซลล์ไฟโบร بلاสต์ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับแผ่นไคโตซานที่มีดีอะเซทิลเลชัน ร้อยละ 95.4 (การทดลองตอนที่ 1).....	46
ภาพที่ 10 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด แสดงลักษณะการยึด เกาะของเซลล์ไฟโบร بلاสต์อายุ 10 วันที่พบบนแผ่นไคโตซานทั้ง 2 ชนิด (การทดลองตอนที่ 1).....	48
ภาพที่ 11 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด แสดงลักษณะการยึด เกาะของเซลล์ไฟโบร بلاสต์อายุ 16 วันที่พบบนแผ่นไคโตซานทั้ง 2 ชนิด (การทดลองตอนที่ 1).....	50
ภาพที่ 12 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด แสดงจำนวนและลักษณะ การยึดเกาะของเซลล์ไฟโบร بلاสต์อายุ 3 วันที่พบบนแผ่นไคโตซานทั้ง 2 ชนิด ที่เลี้ยงในอุปกรณ์เพาะเลี้ยงเซลล์ ในกลุ่มศึกษาทั้ง 2 กลุ่ม (การทดลองตอนที่ 2).....	53

สารบัญภาพ (ต่อ)

หน้า

ภาพที่ 13	ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด แสดงจำนวนและลักษณะการยึดเกาะของเซลล์ไฟโบร بلاสต์อายุ 7 วันที่พบบนแผ่นโคโคซานทั้ง 2 ชนิดที่เลี้ยงในอุปกรณ์เพาะเลี้ยงเซลล์ ในกลุ่มศึกษาทั้ง 2 กลุ่ม (การทดลองตอนที่ 2).....	55
-----------	--	----

คำอธิบายคำย่อและสัญลักษณ์

คำย่อภาษาไทย

ลบ.มม	=	ลูกบาศก์มิลลิเมตร
มม.	=	มิลลิเมตร
มล.	=	มิลลิลิตร
อี-พีทีเอฟอี	=	เอกซ์แพนเด็ดโพลีเตตราฟลูออโรเอทิลีน

คำย่อภาษาอังกฤษ

DMEM	=	Dulbecco's Modified Eagle Medium
e-PTFE	=	Expanded-polytetrafluoroethylene
g	=	Gram
GlcNAc	=	N-acetyl glucosamine
GTR	=	Guided Tissue Regeneration
HPLF	=	Human periodontal ligament fibroblast
PB	=	Phosphate buffer
PEC	=	Polyelectrolyte complex
PVA	=	Polyvinyl alcohol