รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

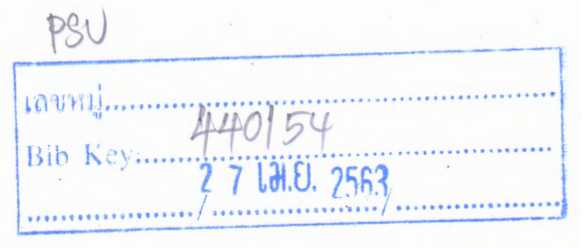
การใช้สเต็มเซลล์จากเนื้อเยื่อไขมันร่วมกับโครงร่างชนิดสลายตัวได้ที่มีส่วนผสมของโพลีคาร์โปรแลกโตนและไบเฟสิคแคลเซี่ยมฟอสเฟต สำหรับงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูก

Using of adipose-derived stem cells combined with biodegradable polycaprolactone-biphasic calcium phosphate scaffolds for bone tissue engineering

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ทพ. ณัฐวุฒิ เทือกสุบรรณ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากโครงการแผนบูรณาการพัฒนาศักยภาพ วิทยาศาสตร์ เทคโนโลยี วิจัย และนวัตกรรม

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2562 รหัสโครงการ DEN620291S



การใช้สเต็มเซลล์จากเนื้อเยื่อไขมันร่วมกับโครงร่างชนิดสลายตัวได้ที่มีส่วนผสมของโพลีคาร์โปรแลกโตนและไบเฟสิคแคลเซี่ยมฟอสเฟต สำหรับงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูก

Using of adipose-derived stem cells combined with biodegradable polycaprolactone-biphasic calcium phosphate scaffolds for bone tissue engineering

นักวิจัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ทพ. ณัฐวุฒิ เทือกสุบรรณ

ภาควิชาศัลยศาสตร์ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90112

ABSTRACT

Background: Combining adipose derived stem cells (ADSCs), isolated from buccal fat pads and scaffolds plays an important role for bone tissue engineering. However, the culture processes routinely require mediums supplemented with fetal bovine serum (FBS), which is unaccepted for clinical use in human. Therefore, using human serum (HS) instead of FBS is an alternative for that purpose.

Objective: To compare characteristics of the ADSCs, when cultured in the mediums supplemented with HS and FBS.

Methods: The buccal fat tissue and venous blood was collected from three patients. The autologous human serum (AHS) was prepared from the blood, and the ADSCs were isolated using CD271 Magnetic-Activated Cell Sorting)MACS(. The cells were separately cultured in the medium (DMEM), supplemented with 10% AHS (AHS Group) and 10% FBS (FBS Group). Characters of the cells including cell morphologies, Colony forming unit fibroblast (CFU-F), Flow cytometry analysis and cell proliferation were comparatively assessed.

Results: All the cells had spindle-shaped fibroblast-like morphology. The numbers of CFU-F of the AHS group, observed over 10 days were greater than those of the FBS group ($p<0.05$). The cells of both groups could express the immunophenotyping markers of mesenchymal stem cell (MSC) including CD 73, 90 and 105, whilst they expressed very low hematopoietic markers. The cells of the AHS group rapidly grew over 21 days of culture, whereas, those of the FBS group gradually grew. The growth of the AHS group was significantly greater than the FBS group in all cases ($p<0.05$).

Conclusion: The culture medium supplemented with AHS could be effectively used for the ADSCs. Therefore, it is possible to use the human serum supplemented mediums for culturing MSC in clinical practice.

บทคัดย่อ

บทนำ การใช้สเต็มเซลล์จากเนื้อเยื่อไขมันร่วมกับโครงร่างทดแทนกระดูก ถือเป็นวิธีการทางวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูกที่มีประสิทธิภาพในการกระตุ้นให้เกิดการสร้างกระดูกใหม่ในร่างกาย อย่างไรก็ตามวิธีการเลี้ยงเซลล์ในปัจจุบันยังคงใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนผสมของซีรั่มที่นำมาจากวัวซึ่งไม่สามารถนำไปใช้เลี้ยงเซลล์ของผู้ป่วยเพื่อการรักษาจริงได้ ดังนั้นการใช้ซีรั่มจากตัวผู้ป่วยเองจึงถือเป็นทางเลือกสำหรับกรณีดังกล่าว

วัตถุประสงค์ เพื่อเปรียบเทียบลักษณะและการแสดงออกของเซลล์ดังกล่าวที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนผสมของซีรั่มที่นำมาจากวัว และซีรั่มจากตัวผู้ป่วยเอง

วัสดุและวิธีการ นำเนื้อเยื่อไขมันจากแผ่นไขมันข้างแก้มที่เก็บจากแผลผ่าตัดขากรรไกรเพื่อแก้ไขความผิดปรกติของใบหน้า และเลือดดำที่ได้จากการเจาะเส้นเลือดดำบริเวณแขนจากผู้ป่วยกลุ่มศึกษาจำนวน 3 ราย เพื่อนำสเต็มเซลล์ออกมาจากเนื้อเยื่อด้วยเครื่อง Magnetic-Activated Cell Sorting ที่ใช้ CD271 เป็นตัวคัดแยก ส่วนเลือดดำนำมาผ่านกรรมวิธีเตรียมให้ได้เป็นซีรั่มเพื่อผสมกับอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM โดยแบ่งเป็น 2 กลุ่มทดลองคือ กลุ่มที่เลี้ยงเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสมซีรั่มของผู้ป่วยในอัตราส่วนร้อยละ 10 และกลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสมซีรั่มที่นำมาจากวัวในอัตราส่วนเดียวกัน จากนั้นทำการศึกษาลักษณะของเซลล์และการแสดงออกโดยการดูรูปร่างของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ ดูความสามารถในการเกิด Colony forming unit และการแสดงออกของ CD markers โดยการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Flow cytometry นอกจากนั้นยังศึกษาเปรียบเทียบการอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ทั้งสองกลุ่มด้วย

ผลการทดลอง รูปร่างของเซลล์ที่เลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงทั้ง 2 กลุ่มมีรูปร่างไม่ต่างกัน โดยมีลักษณะคล้าย spindle-shaped fibroblast เมื่อนับจำนวน Colony forming unit ของเซลล์ทั้ง 2 กลุ่ม ที่ระยะเวลา 10 วัน พบว่า เซลล์ในกลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสมซีรั่มของผู้ป่วยมีมากกว่ากลุ่มที่เลี้ยงด้วยด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสมซีรั่มที่นำมาจากวัวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เซลล์ในทั้ง 2 กลุ่มทดลองมีการแสดงออกของ immunophenotyping markers ที่เหมือนกับมีเซนไคมอลสเต็มเซลล์ ได้แก่ CD 73, 90 and 105 ในระดับสูง ในขณะที่มีการแสดงออกของ markers ของฮีมาโตปอยอีติกสเต็มเซลล์ในระดับต่ำมาก เมื่อศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์ที่ระยะเวลา 21 วัน พบว่า กลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสมซีรั่มของผู้ป่วยจะมีอัตราการเจริญเติบโตที่เร็วกว่ากลุ่มที่เลี้ยงด้วยด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสมซีรั่มที่นำมาจากวัวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

บทสรุป อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสมซีรั่มของผู้ป่วยสามารถใช้เลี้ยงใช้สเต็มเซลล์จากเนื้อเยื่อไขมันได้อย่างมีประสิทธิภาพ และมีความเป็นไปได้ที่จะนำไปใช้รักษาผู้ป่วยในทางคลินิก