

บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง

5.1 การวิเคราะห์ความสามารถในการลงเกาะของเซลล์

FAK เป็นโปรตีนที่มีโครงสร้างที่สามารถถูกกระตุ้นได้โดยผ่านการจับกันของส่วน kinase domain โดยการเติมหมู่ฟอสเฟต ส่งผลให้เกิดการจับกันของ integrin paxillin และ talin ที่เป็นโครงสร้างที่ช่วยในการเคลื่อนที่และการลงเกาะของเซลล์ ด้วยเหตุผลนี้ FAK จึงถูกนำมาใช้เป็นตัวชี้วัดการลงเกาะของเซลล์ อาทิเช่น งานวิจัยของ Liu, 2009 ที่ศึกษาการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งตับอ่อนผ่านการแสดงออกของ FAK และ IGF-IR พบว่าเมื่อไม่มี FAK จะทำให้เซลล์ไม่สามารถลงเกาะได้และมีอัตราการรอดชีวิตต่ำ นอกจากนั้นยังเพิ่มการตายของเซลล์แบบอะพอโทซิสด้วย จากผลการทดลองในส่วนนี้พบว่าปริมาณของ FAK ซึ่งเป็นโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับการลงเกาะของเซลล์นั้น มีค่ามากบนวัสดุสังเคราะห์ ทั้ง 4 ชนิด มากกว่าวัสดุควบคุม (PS) อย่างเห็นได้ชัด โดยมีอัตราการเพิ่มขึ้นอย่างมากสำหรับวัสดุที่อาบด้วยพลาสมา ทั้งแบบแผ่นฟิล์ม (PT-F) และ แบบโครงร่าง (PT-S) ทั้งนี้เนื่องจากการดัดแปลงพื้นผิววัสดุด้วยพลาสมาด้วยการเติม O_2 ลงไปบนพื้นผิวทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของลักษณะพื้นผิว (topography) ประจุ (charge) รวมถึงคุณสมบัติ hydrophilicity ของพื้นผิวของวัสดุ ทำให้เพิ่มศักยภาพในการลงเกาะของเซลล์ให้ดียิ่งขึ้น ซึ่งก็สอดคล้องกับงานวิจัยของ Dowling *et al.*, 2010 ที่เลี้ยงเซลล์มะเร็งกระดูก (osteosarcoma) บนวัสดุ PS ที่ดัดแปลงพื้นผิวด้วยพลาสมา เมื่อเทียบกับวัสดุที่ไม่ได้อาบพลาสมา และตั้งแต่วันที่ 12 ของการเลี้ยงจะพบว่าเซลล์เริ่มมีอัตราการลงเกาะที่ลดลงอาจจะเนื่องมาจากเซลล์เริ่มมีการเกาะกลุ่มกันเพื่อเปลี่ยนแปลงไปเป็นเนื้อเยื่อบางชนิดที่จำเพาะ ดังเช่นผลงานวิจัยของ Heo *et al.*, 2005 ที่ตรวจพบการเกิด spontaneous differentiation ของสเต็มเซลล์จากตัวอ่อนของหนู (mouse embryonic stem cell) ภายในเวลา 2 สัปดาห์หลังจากเลี้ยงเซลล์

5.2 การเปรียบเทียบฐานวิทยาในการลงเกาะของเซลล์

จากผลการทดลองจะพบว่าเซลล์ WJMSCs ที่ลงเกาะบน PS นั้น จะลงเกาะอย่างสมบูรณ์เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง ซึ่งก่อนหน้านี้เซลล์จะเริ่มมีการสร้าง lamellipodium (เท้าเทียม) ออกมาเรื่อยๆ ตัวเซลล์และจะค่อยๆ แบนตัวลงจนยึดเกาะกับวัสดุแข็งได้อย่างสมบูรณ์ ซึ่งในขั้นตอนการลงเกาะของเซลล์นั้นจะทำให้เกิดเป็นลักษณะของแผ่นเกาะขนาดเล็ก (small patch) และแผ่นเกาะขนาดใหญ่ (large patch) ตามลำดับ ทั้งสองลักษณะนี้สามารถสังเกตเห็นได้ชัดเจนบนวัสดุแข็งที่เป็นพื้นผิวเรียบเท่านั้น และลักษณะการเกิด large patch ก็เป็นสัญญาณบ่งบอกว่าเซลล์นั้นๆ ได้ลงเกาะอย่างสมบูรณ์แล้ว ซึ่งผลที่ได้นี้ก็สอดคล้องกับผลการทดลองของ (Penolazzi *et al.*, 2011) คือ เซลล์ WJMSCs ที่ลงเกาะบน PS ในชั่วโมงที่ 1 เซลล์ยังคงมีลักษณะเป็นก้อนกลม (spherical shape) ในชั่วโมงที่ 2 เซลล์จะเริ่มลงเกาะบนวัสดุและลงเกาะอย่างสมบูรณ์หลังจากชั่วโมงที่ 24 เป็นต้นไป นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยของ Balto, 2003 ที่สังเกตการลงเกาะของเซลล์ human periodontal ligament fibroblast (HPLF) บน PS ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope: SEM) ในชั่วโมงที่ 8 และ 24 พบว่า ในชั่วโมงที่ 8 เซลล์มีรูปร่างเป็นสายยาวและมีเท้าเทียม (lamellipodium) ปรากฏออกมารอบตัวเซลล์แต่เซลล์ยังคงลักษณะกลมไว้อยู่ และเมื่อถึงชั่วโมงที่ 24 เซลล์มีการลงเกาะอย่างสมบูรณ์โดยสังเกตจากการแผ่ขยาย และแบนตัวลงของเซลล์บนพื้นผิว ส่วนวัสดุที่มีผิวขรุขระจะไม่สามารถสังเกตลักษณะที่กล่าวมาข้างต้นได้ แต่มีข้อดีตรงที่เซลล์มักชอบลงเกาะบนวัสดุแบบนี้มากกว่าวัสดุแบบผิวเรียบ (Le Guehennec *et al.*, 2007)

5.3 การวิเคราะห์การเพิ่มจำนวนของเซลล์

จากผลการทดลองในส่วนนี้พบว่า ปริมาณของ cyclin A ที่มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการแบ่งตัวของเซลล์นั้นจะพบมากบน PCL/HA ทั้ง 4 แบบ โดยเฉพาะในวัสดุที่ไม่ได้อาบด้วยพลาสมา ซึ่งมีอัตราการเพิ่มขึ้นที่มากกว่าเซลล์ที่เลี้ยงบน PS มากถึง 7 เท่า วัสดุ PCL/HA ที่มีการดัดแปลงพื้นผิววัสดุในแบบที่ต่างกันเช่น การขึ้นรูป คุณสมบัติ hydrophilicity รวมถึงการอบด้วยพลาสมา สามารถกระตุ้นให้เซลล์ WJMSC แบ่งตัวได้ดีเมื่อเลี้ยงบนวัสดุชนิดนั้น ซึ่งก็ให้ผลที่คล้ายๆกันงานวิจัยอื่นๆ ที่มีการนำเอาเซลล์มาเลี้ยงบนวัสดุ PCL ที่ดัดแปลงหรือขึ้นรูปด้วยวิธีต่างๆกัน ต่างก็ให้ผลไปในทิศทางเดียวกัน โดยรวมแล้วเป็นที่น่าพอใจ ส่วนหนึ่งอาจเป็นผลมาจากการใช้เซลล์ต้นกำเนิดที่มีศักยภาพในการแบ่งตัวที่สูงด้วย นอกจากนี้เมื่อพิจารณาผลของการลงเกาะจะพบว่าการอบด้วยพลาสมาจะช่วยให้เซลล์ลงเกาะได้มากขึ้นแต่ไม่ได้เพิ่มอัตราการเพิ่มจำนวนของเซลล์เมื่อเลี้ยงในระยะยาว

5.4 การตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูกอ่อน

จากผลการทำปฏิกิริยา real time - PCR เพื่อตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดในเซลล์ WJMSCs พบว่ามีการแสดงออกของยีน *POU5F1* และยีน *SSEA4* บนวัสดุทุกชนิด เมื่อตรวจสอบ ณ วันที่ 11 แต่เมื่อผ่านการชักนำและตรวจสอบที่ 21 วัน กลับพบว่า ไม่มีการแสดงออกของยีนทั้งสอง อาจเนื่องมาจากเซลล์ต้นกำเนิดนี้ถูกชักนำให้เป็นเซลล์กระดูกอ่อนจึงไม่มีการแสดงออกของยีน ณ ช่วงเวลาดังกล่าว ซึ่งจากงานวิจัยของ Zhao and Detamore (2010) พบว่าระยะเวลาอย่างน้อยที่สุดที่ใช้ในการชักนำเซลล์ต้นกำเนิดชนิดนี้บนวัสดุ poly-L-lactic acid (PLLA) และวัสดุ poly(glycolic acid) (PGA) ให้เป็นเซลล์กระดูกอ่อนคือ 21 วัน นอกจากนี้ยังพบว่า ความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดจะพบมากบนวัสดุ PS เมื่อตรวจสอบทางสถิติ ($p \leq 0.05$) นั้นหมายถึง PS มีความสามารถในการคงสภาพความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดได้ดีกว่าวัสดุสังเคราะห์ทั้งสี่แบบ

ส่วนการตรวจสอบกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการเกิดอะพอโทซิส ที่เลี้ยงบนวัสดุแต่ละชนิด พบว่ามีการแสดงออกของยีน *caspase8* ในเซลล์ที่เลี้ยงบนวัสดุทุกชนิด และพบว่ามีแนวโน้มการแสดงออกคล้ายๆกัน คือเพิ่มขึ้นจากวันที่ 11 ถึงวันที่ 21 ซึ่งหมายถึงมีการตายของเซลล์แบบอะพอโทซิสผ่าน extrinsic pathway (Zhang *et al.*, 2003) ในเซลล์ที่เลี้ยงบนวัสดุทุกชนิดโดยพบการแสดงออกมากที่สุดบนวัสดุ PS อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ซึ่งอาจจะเกิดจากลักษณะของพื้นผิววัสดุ ส่วนวัสดุโครงสร้างที่มีลักษณะขรุขระทำให้พื้นที่ในการลงเกาะมากขึ้น ส่งผลให้เกิดการแบ่งตัวที่ดีกว่าวัสดุ PS ส่วนยีน *Apaf1* พบว่ามีแนวโน้มการแสดงออกคล้ายๆกับยีน *caspase8* แสดงให้เห็นว่าเซลล์ที่เลี้ยงบนวัสดุทั้งสองชนิดดังกล่าวอาจมีการตายของเซลล์แบบอะพอโทซิสผ่าน intrinsic pathway (Yakovlev *et al.*, 2001) ซึ่งพบว่าการแสดงออกมากที่สุดบนวัสดุ PS อย่างเห็นได้ชัด ส่วนวัสดุสังเคราะห์ทั้ง 4 แบบให้ผลที่คล้ายกัน ยกเว้น F ที่มีการแสดงออกใกล้เคียงกับ PS แต่เมื่อพิจารณา ยีน *Bcl2* ซึ่งเป็นยีนที่ควบคุมการแสดงออกของโปรตีนต่อต้านการเกิดอะพอโทซิส (anti-apoptotic protein) ผ่านทาง intrinsic pathway จะพบว่า *Bcl2* จะมีแนวโน้มลดลงจากวันที่ 11 จนถึงวันที่ 21 ซึ่งก็สอดคล้องกับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับอะพอโทซิสทั้งสองชนิด สำหรับการตายของเซลล์แบบเนโครซิส (necrosis) โดยดูจากระดับการแสดงออกของยีน *PARP-1* พบว่ามีการแสดงออกในเซลล์ที่เลี้ยงบนวัสดุ PS เท่านั้น และพบว่ามีระดับการแสดงออกของยีนลดลงเมื่อวันที่ 11 ถึง 21 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าวัสดุสังเคราะห์ทั้งสี่แบบไม่ส่งผลให้เซลล์เกิดการตายแบบเนโครซิส

สำหรับการชักนำให้เป็นเซลล์กระดูกอ่อนได้ตรวจสอบยีน 3 ชนิดคือ *SOX9*, *COL2A1* และ *Aggrecan* ซึ่งเป็นยีนที่พบว่าการแสดงออกในขั้นตอนพัฒนาไปเป็นเซลล์กระดูกอ่อน เนื่องจาก *SOX9* เป็นยีนที่สำคัญลำดับแรก ของกระบวนการพัฒนาไปเป็นเซลล์กระดูกอ่อน ยีนนี้ต้องอาศัยการทำงานร่วมกับยีนอื่นๆในกลุ่ม SOX family คือ *L-SOX5* และ *SOX6* เพื่อสร้าง Collagen II (Col2a1) Col11a1 aggrecan และ linked protein ชนิดอื่นๆที่พบใน ECM ของเซลล์กระดูกอ่อน จากผลการทดลองพบว่าวัสดุโครงร่าง 3 มิติ (S และ PT-S) มีการแสดงออกของยีนนี้มากกว่าวัสดุแบบแผ่นฟิล์ม (F และ PT-F) อาจเนื่องมาจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาของวัสดุโครงร่าง 3 มิตินั้นคล้ายคลึงกับสภาพภายในร่างกายของสิ่งมีชีวิต (mimic) นอกจากนั้นยีนอีก 2 ชนิด คือ *COL2A1* และ *Aggrecan* พบแนวโน้มการแสดงออกของยีนคล้ายกับ *SOX9* โดยพบการแสดงออกของยีนทั้ง 3 ชนิด มากกว่าบน PS ถึง 2 เท่า

การเกิด spontaneous differentiation พบการแสดงออกเกิดขึ้น *nestin* เพียงชนิดเดียว ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องเซลล์ประสาท (neuron) แต่ก็มีการวิจัยหลายฉบับที่รายงานว่า *nestin* ไม่ได้แสดงออกแค่ในเซลล์ประสาทเท่านั้น แต่ยังพบการแสดงออกในเซลล์ชนิดอื่นๆอีก เช่น เซลล์บริเวณเรติน่า กล้ามเนื้อ หัวใจ ตับ ตับอ่อน ไต และบริเวณอื่นๆ (Gilyarov, 2008) โดยพบน้อยสุดบนวัสดุที่ไม่ได้อาบน้ำพลาสติก ซึ่งคล้ายกับงานวิจัยของ Wiese *et al.*, 2004 ที่พบการแสดงออกของ *nestin* ใน embryonic stem cell ผลที่ได้สามารถสันนิษฐานว่าการอาบน้ำพลาสติกมีผลต่อการแสดงออกของ *nestin* หรืออาจจะทำให้เกิดเซลล์ชนิดอื่นที่ไม่ได้ชักนำ นอกจากนั้นยังไม่พบการแสดงออกของยีน *PPARY2* ที่เกี่ยวข้องกับเซลล์ไขมัน (adipocyte) ระหว่างการชักนำ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved