การอยู่รอดของเซลล์ผิวหนัง ที่เก็บรักษาด้วยการแช่ในตู้แช่เย็น

พจน์ ธีรคุปต์ วท.บ., ท.บ., พ.บ., อ.ว.ศัลยศาสตร์ตกแต่ง*

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์: เพื่อศึกษาการมีชีวิตอยู่ของเซลล์ผิวหนังที่ถูกเก็บรักษาด้วยวิธีการแช่ในตู้แช่เย็นสำหรับถนอมรักษาเลือด ที่มีอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 และ14 วัน

รูปแบบการวิจัย: การวิจัยเชิงทดลอง

กลุ่มตัวอย่าง: แผ่นเนื้อเยื่อผิวหนังส่วนที่เหลือของผู้ป่วยทางศัลยกรรมตกแต่ง ที่เข้ารับการผ่าตัดปลูกถ่ายผิวหนังด้วยวิธี split-thickness skin graft ในระหว่างเดือนมิถุนายน พ.ศ. 2548 ถึงเดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2549 จำนวน 26 แผ่น

วิธีดำเนินการวิจัย: ทำการตัดแผ่นเนื้อเยื่อผิวหนังส่วนที่เหลือจากการผ่าตัด ขนาดกว้างและยาว ด้านละ 1 ซม. นำแผ่นเนื้อเยื่อผิวหนังชิ้นนี้มาตรวจการอยู่รอดของเซลล์ผิวหนัง (keratinocyte) โดยทำการตัดแบ่งออกเป็น 3 ส่วนในขนาดที่เท่ากัน ส่วนที่หนึ่งเป็นกลุ่มควบคุม นำไปตรวจวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการภายในระยะเวลาไม่เกิน 1 ชั่วโมงหลังจากที่ได้นำออกมาจากผู้ป่วย ส่วนที่สองและสามเป็นกลุ่มทดลอง นำผิวหนังส่วนนี้ไปเก็บในตู้แช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 °C โดยห่อแผ่นเนื้อเยื่อผิวหนังไว้ในผ้าก๊อสชุบด้วย normal saline และบรรจุใส่ในถุงพลาสติก จากนั้นนำมาตรวจวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการเพื่อนับจำนวนเซลล์ที่ยังคงมีชีวิต และนำมาคำนวณหาร้อยละของเซลล์ผิวหนังที่มีชีวิต (viability) หลังจากที่เก็บไว้ในตู้แช่เย็นเป็นเวลา 7 และ 14 วัน

ตัววัดที่สำคัญ: ร้อยละของจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต

ผลการวิจัย: แผ่นเนื้อเยื่อผิวหนังที่ถูกเก็บไว้เป็นระยะเวลา 7 วัน มีเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ร้อยละ 42.4 ± 8.8 และในกรณีที่เก็บไว้นานเป็นระยะเวลา 14 วัน จะเหลือเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่เพียงร้อยละ 5.1 ± 3.2

สรุป: แผ่นเนื้อเยื่อผิวหนังที่เก็บรักษาในตู้แช่เย็นสำหรับถนอมรักษาเลือดเป็นเวลา 7 และ 14 วัน จะมีเซลล์ที่ยังคงมีชีวิตอยู่น้อยมาก โดยที่ระยะเวลา 14 วัน มีเซลล์ผิวหนังที่ยังมีชีวิตเหลืออยู่เพียงร้อยละ 5.1

* ภาควิชาศัลยศาสตร์ วิทยาลัยแพทยศาสตร์กรุงเทพมหานครและวชิรพยาบาล

Abstract

Viability of Refrigerated Skin Graft

Poth Thrirakhupt BSc, DDS, MD

Department of Surgery, BMA Medical College and Vajira Hospital

Objective: To study the viability of skin graft after preserving in blood refrigerator for 7 and 14 days.

Study design: Experimental study.

Subjects: Twenty-six pieces of residual split thickness skin graft from the patients who underwent autogenous skin graft at Department of Surgery, BMA Medical College and Vajira Hospital during June 2005 to February 2006 were studied.

Method: Each skin graft was equally divided into 3 pieces. The first was sent for cell study within one hour after operation as control. The second and third were saved in sterile gauze with normal saline and preserved in a blood refrigerator (4 °C). These two groups were sent for cell study at 7 and 14 days later. The viability of cell was evaluated under light microscope using dye exclusion test.

Main outcome measures: The percentage of viable cells.

Results: The viability of refrigerated skin graft preserving in blood refrigerator for 7 days was $42.4 \pm 8.8\%$ and 14 day was $5.1 \pm 3.2\%$.

Conclusion: The viable cell of refrigerated skin graft was decreased by time. This preservation technique can not save the keratinocyte for 14 days as previous mention after 14 days, the viable cells were 5.1%.

Key words: viable skin graft, blood refrigerator

บทนำ

การปลูกถ่ายผิวหนัง (skin graft) ชนิดที่ใช้แผ่นผิวหนังแบบ split-thickness skin graft นั้นพบว่าส่วนใหญ่แล้ว ผิวหนังที่ตัดออกมาจากแหล่งบริจาค (donor site) มาแล้วอาจใช้ไม่หมดหรือไม่สามารถนำผิวหนังนั้นมาปลูกถ่ายผิวหนังได้ทันทีในขณะนั้น โดยเฉพาะในผู้ป่วยที่ได้รับบาดเจ็บจากไฟไหม้หรือน้ำร้อนลวกที่ผิวหนังถูกทำลายตลอดความหนาของผิวหนัง (third degree skin burn) ทำให้มีความจำเป็นที่จะต้องเก็บรักษาผิวหนังนั้นไว้สำหรับการปลูกถ่ายผิวหนังในภายหลัง วิธีการเก็บผิวหนังที่ถูกตัดออกมาให้คงสภาพการมีชีวิตได้นานๆ มีอยู่หลายวิธี ในปัจจุบันจะนิยมใช้วิธีเก็บในตู้เก็บที่มีอุณหภูมิต่ำถึง -70 °C[1] วิธีดังกล่าวสามารถเก็บผิวหนังได้เป็นเวลานาน ซึ่งเหมาะสำหรับใช้ในธนาคารผิวหนัง (skin bank) แต่ในทางปฏิบัติ การจัดตั้งธนาคารผิวหนัง ต้องอาศัยเครื่องมือและบุคลากรพิเศษเพื่อดูแลผิวหนังที่ได้มาจากแหล่งบริจาค จึงทำได้เฉพาะในบางสถาบันเท่านั้น ปัจจุบันยังไม่มีการให้บริการดังกล่าวในประเทศไทย โดยทั่วไปแล้ว วิธีการถนอมผิวหนังที่ยังไม่ได้นำไปปลูกถ่ายทันทีในห้องผ่าตัดมีหลายวิธี[2,3] แต่ในวิทยาลัยแพทยศาสตร์กรุงเทพมหานครและวชิรพยาบาล จะทำโดยการเก็บไว้ในตู้แช่เย็นที่ใช้สำหรับถนอมรักษาแช่เลือด (refrigerator) ที่ควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 4 °C ซึ่งการเก็บผิวหนังที่อุณหภูมิดังกล่าว มีการกล่าวอ้างกันมาเป็นเวลานานว่าสามารถเก็บผิวหนังให้มีชีวิตไว้ได้นานถึง 14 วัน[4] อย่างไรก็ตามยังไม่มีหลักฐานการศึกษาถึงการอยู่รอดของเซลล์ผิวหนังที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C นี้ว่า มีการอยู่รอดของเซลล์ผิวหนัง

เป็นอย่างไรประกอบกับผลการผ่าตัดปลูกถ่ายผิวหนังที่ใช้ผิวหนังที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิดังกล่าวในวิทยาลัยแพทยศาสตร์กรุงเทพมหานครและวชิรพยาบาล ที่นานเกิน 7 วัน ประสบความล้มเหลวอยู่บ่อยครั้งจึงมีความจำเป็นในการศึกษาเพิ่มเติมในประเด็นดังกล่าว

ประชากรกลุ่มตัวอย่างและวิธีดำเนินการวิจัย

กลุ่มตัวอย่าง

แผ่นเนื้อเยื่อผิวหนังที่เหลือจากการผ่าตัดปลูกถ่ายผิวหนัง จำนวน 26 แผ่น ของผู้ป่วยทางศัลยกรรมตกแต่ง ที่เข้าร่วมโครงการในระหว่างเดือนมิถุนายน พ.ศ. 2548 ถึงเดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2549

นิยามตัวแปร

1. เซลล์ที่ตาย หมายถึง เซลล์ที่มีลักษณะดังนี้

1.1 นิวเคลียส มีการหดตัว (karryopyknosis) หรือมีการแตก (karryoresis)

1.2 เซลล์มีการสลายตัว (cytolysis)

2. เซลล์ที่ยังมีชีวิต หมายถึง เซลล์ที่ไม่มีลักษณะดังกล่าวข้างต้น

วิธีการดำเนินการวิจัย

ภายหลังจากที่ผู้ป่วยที่ต้องเข้ารับการผ่าตัดรักษาโดยการปลูกถ่ายผิวหนัง ด้วยวิธี split-thickness skin graft ในหน่วยศัลยกรรมตกแต่ง อนุญาตให้นำแผ่นเนื้อเยื่อผิวหนังส่วนที่เหลือไปทำการศึกษาวิจัย และลงนามยินยอม ผู้วิจัยจะทำการตัดแผ่นเนื้อเยื่อผิวหนังให้มีขนาดกว้าง 1 ซม. ยาว 1 ซม. จากนั้นทำการตัดแบ่งแผ่นเนื้อเยื่อผิวหนังนี้ออกเป็น 3 ส่วนในขนาดที่เท่ากันนำไปห่อในผ้าก๊อสชุบ normal saline แล้วนำไปศึกษาต่อดังต่อไปนี้

1. ส่วนที่หนึ่งเป็นกลุ่มควบคุม นำไปตรวจวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการภายในระยะเวลาไม่เกิน 1 ชั่วโมงภายหลังจากที่ได้นำออกมาจากผู้ป่วย

2. ส่วนที่สองเป็นกลุ่มทดลองกลุ่มที่ 1 นำแผ่นเนื้อเยื่อผิวหนังส่วนนี้ไปเก็บในตู้แช่เย็นที่อุณหภูมิ 4°C แล้วนำมาตรวจวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ ภายหลังจากที่ได้เก็บไว้ในตู้แช่เย็นเป็นเวลา 7 วัน

3. ส่วนที่สามเป็นกลุ่มทดลองกลุ่มที่ 2 นำแผ่นเนื้อเยื่อผิวหนังส่วนนี้ไปเก็บในตู้แช่เย็นที่อุณหภูมิ 4°C แล้วนำมาตรวจวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ ภายหลังจากที่ได้เก็บไว้ในตู้แช่เย็นเป็นเวลา 14 วัน

การตรวจวิเคราะห์การอยู่รอดของเซลล์ผิวหนัง จะใช้วิธี dye exclusion test โดยใช้สี trypan blue เริ่มจากการนำแผ่นเนื้อเยื่อผิวหนัง มาแช่ในสารละลาย phosphate buffer ที่ผสม 0.025% trypsin EDTA ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นระยะเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นแบบหมุนเหวี่ยง (centrifuge) แยกหนังกำพร้า (epidermis) ออกจากหนังแท้ (dermis) แล้วนำเฉพาะส่วนที่เป็นเซลล์หนังกำพร้า ออกมาเติมสี trypan blue เกลี่ยบนแผ่นสไลด์แก้ว ทิ้งไว้ 5 นาที และตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ (light microscope) เพื่อนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตและตาย เพื่อคำนวณหาร้อยละของเซลล์ผิวหนังที่ยังมีชีวิตอยู่

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ข้อมูลร้อยละของจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของแผ่นเนื้อเยื่อผิวหนัง รายงานโดยใช้ค่าเฉลี่ย และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ส่วนการเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มใช้ วิธี one way ANOVA กำหนดนัยสำคัญทางสถิติที่น้อยกว่า 0.05

ตารางที่ 1 เซลล์ผิวหนังที่มีชีวิตในการเก็บรักษาไว้ในตู้แช่

ข้อมูล	กลุ่มควบคุม	กลุ่มที่เก็บไว้ในตู้แช่ เป็นเวลา 7 วัน	กลุ่มที่เก็บไว้ในตู้แช่ เป็นเวลา 14 วัน
ค่าเฉลี่ย*	64.2	42.4	5.1
ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	9.7	8.8	3.2
พิสัย	42-80	25-63	0-12

*p-value < 0.001

ผลการวิจัย

จากผลการวิจัยพบว่า ภายในระยะเวลาไม่เกิน 1 ชั่วโมง หลังจากที่ตัดแผ่นเนื้อเยื่อผิวหนังออกมาจากผู้ป่วย มีค่าเฉลี่ยร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิต ร้อยละ 64.2±9.7 สำหรับแผ่นเนื้อเยื่อผิวหนังที่ถูกเก็บรักษาไว้ในตู้แช่เย็นอุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 7 และ 14 วัน มีค่าเฉลี่ยร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตเท่ากับร้อยละ 42.4±8.8 และ 5.1±3.2 ซึ่งลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 1)

วิจารณ์

การอยู่รอดของเซลล์ผิวหนังที่เก็บรักษาด้วยการแช่ในตู้แช่เลือดเป็นเวลา 7 และ 14 วัน พบว่าจำนวนเซลล์ผิวหนังที่มีชีวิตลดลงอย่างมาก ภายหลังจากที่เก็บรักษาไว้ตามระยะเวลาดังกล่าว มีเซลล์ที่มีชีวิตเหลืออยู่เพียงร้อยละ 42.4 และ 5.1 ซึ่งบ่งบอกว่าการเก็บถนอมเนื้อเยื่อผิวหนังในตู้แช่เลือดที่อุณหภูมิ 4°C โดยห่อด้วยผ้าก๊อสชุบ normal saline เป็นวิธีการที่ไม่สามารถถนอมเซลล์ผิวหนังให้มีชีวิตอยู่รอดได้เป็นเวลานาน ปัจจุบันมีความพยายามที่จะถนอมเซลล์ผิวหนังให้มีชีวิตรอดอยู่ได้เป็นระยะเวลานานๆ แต่กรรมวิธีและเทคนิคค่อนข้างยุ่งยาก คือ การเก็บถนอมโดยใช้ไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -70°C โดยหลักการของวิธีนี้ จะค่อยๆ ลดอุณหภูมิลงจนถึงอุณหภูมิที่ต้อง ซึ่งปัจจุบันเป็นวิธีการที่ใช้อยู่ของ skin bank[1-3,5-8] ข้อเสียของวิธีนี้ได้แก่ค่าใช้จ่ายที่สูงมาก

ในส่วนของเทคนิคการตรวจหาเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่นั้นมีอยู่หลายวิธี ได้แก่ วิธี dye-exclusion การตรวจปริมาณการใช้กลูโคส การตรวจหาปริมาณการสร้าง lactate และการใช้ carbon-13 magnetic resonance spectroscopy การตรวจด้วยวิธีที่หนึ่งที่ใช้ในการวิจัยนี้ เป็นวิธีที่นิยมกันอย่างกว้างขวางในการตรวจเซลล์ที่มีชีวิตของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม[1] เนื่องจากทำได้ง่ายและสะดวก แต่จะบอกได้ในแง่เดียวว่าเซลล์ยังไม่แตก ยังมีเยื่อหุ้มเซลล์ห่อหุ้มอยู่ และนิวเคลียสไม่มีการหดตัว ส่วนการทำงานอื่นของเซลล์จะไม่สามารถจะบอก อย่างไรก็ตามในกระบวนการตรวจต้องมีการนำผิวหนังไปแช่ในสารละลาย phosphate buffer ที่มี trypsin EDTA ผสมอยู่ทำให้มีเซลล์จำนวนหนึ่งถูกทำลายไป ซึ่งคงเป็นเหตุผลที่ทำให้ค่าเฉลี่ยร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิต ในกลุ่มควบคุมเท่ากับร้อยละ 64.2 ดังนั้นถ้าได้มีการปรับปรุงขบวนการแช่เย็นใหม่ เช่น เก็บรักษาแผ่นเนื้อเยื่อผิวหนังในสารอาหารเลี้ยงเซลล์ การลดระยะเวลาในการจัดเก็บให้สั้นลง การควบคุมอุณหภูมิให้ห้องผ่าตัด เป็นต้น อาจช่วยทำให้จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังมีประเด็นที่ควรทำการศึกษาวิจัยเพิ่มเติมต่อไป ว่าที่ระยะเวลา 7 วัน ที่มีค่าเฉลี่ยร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิต เท่ากับร้อยละ 42.4 นั้น เพียงพอที่จะทำให้การปลูกถ่ายผิวหนังประสบความสำเร็จมากน้อยเพียงใด

สรุป

การเก็บถนอมเซลล์ผิวหนัง โดยการเก็บแผ่นเนื้อเยื่อผิวหนังห่อด้วยผ้าก๊อส ชุบ normal saline ในตู้แช่เลือดที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 7 วัน จะมีเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ร้อยละ 42.4 ถ้าเก็บไว้เป็นระยะเวลา 14 วัน จะมีเซลล์ที่ยังมีชีวิตเหลืออยู่เพียงร้อยละ 5.1 ซึ่งมีจำนวนที่น้อยมาก

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากทุนส่งเสริมการวิจัยทางการแพทย์ วิทยาลัยแพทยศาสตร์กรุงเทพมหานครและวชิรพยาบาล ผู้เขียนขอขอบคุณนายแพทย์สมนึก เจษฎาภัทรกุล และอาจารย์สุจิตรา ตัณฑวนิช ที่ช่วยให้คำปรึกษาและตรวจวิเคราะห์เซลล์ และศูนย์ส่งเสริมการวิจัยที่ช่วยให้คำปรึกษาจนงานวิจัยสำเร็จลุล่วงด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. Konstantinov A. Skin banking: a simple method of cryo-preservation of split-thickness skin and cultural human epidermal keratinocytes. Ann Plast Surg 1991; 26: 89-97.
2. Blondet R, Gilbert TMA, Pierre C, Ehrsam A. Skin preservation by programmed freezing Br J Plast Surg 1982; 35: 350-43.
3. Bondoc CC. Burke JF. Clinical experience with viable frozen human skin and a frozen skin bank. Ann Surg 1970; 174: 371-82.
4. Geogiade N, Peschel E, Geogiade R, Brown I. A clinical and experimental investigation of the preservation of skin. Plast Reconstr Surg 1956; 17: 267-72.

5. May SR, De Clement F. Skin banking methodology: an evaluation of package format, cooling and warming rates, and storage efficiency. Cryobiology 1980; 17: 33-44.
6. May SR, Roberts DP. Development of a passive device for freezing large amounts of transplantable skin at one time in a -70°C mechanical refrigerator. Cryobiology 1988; 25: 186-97.
7. Shier WT. The final steps to toxic cell death. J Toxicol Toxin Rev 1985; 4: 191-203.
8. Wu SY, Ren HS, Hua TC. A new cooling technique for cryopreservation. Cryobiology 1988; 25: 549-60.
9. Yip DK, Auersperg N. The dye-exclusion test for cell viability: persistence of differential staining following fixation. In Vitro 1972; 7: 323-45.