



การพัฒนาไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกที่มีการพอลิเมอไรเซชันจากการบ่มด้วยแสงสีฟ้า
THE DEVELOPMENT OF BLUE LIGHT INITIATED PHOTOPOLYMERIZED HYALURONIC
ACID BASED HYDROGEL

ภูรี เซาว์พานิชย์เจริญ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

2564

การพัฒนาไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกที่มีการพอลิเมอไรเซชันจากการบ่มด้วยแสงสีฟ้า



บุรี เซาว์พาณิชย์เจริญ

ปริญญานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาการช่องปากและแม็กซิลโลเฟเชียล
คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ปีการศึกษา 2564
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

THE DEVELOPMENT OF BLUE LIGHT INITIATED PHOTOPOLYMERIZED HYALURONIC
ACID BASED HYDROGEL



PUREE CHAOPANITCHAROEN

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of MASTER OF SCIENCE
(Oral and Maxillofacial Sciences)

Faculty of Dentistry, Srinakharinwirot University

2021

Copyright of Srinakharinwirot University

ปริญญานิพนธ์

เรื่อง

การพัฒนาไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกที่มีการพอลิเมอร์ไรเซชันจากการบ่มด้วยแสงสีฟ้า

ของ

ภูรี เชาวน์พาณิชย์เจริญ

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาการช่องปากและแม็กซิลโลเฟเชียล
ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ฉัตรชัย เอกปัญญาสกุล)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์

..... ที่ปรึกษาหลัก ประธาน
(รองศาสตราจารย์ ดร.สรศักดิ์ รังสิยานนท์) (รองศาสตราจารย์ ดร.เนืงา สารชวนะกิจ)

..... ที่ปรึกษาร่วม กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.นิรดา ธเนศวร) (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภัทราวุธ แต่บรรพ
กุล)

..... ที่ปรึกษาร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จิตติมา ลัคนากุล)

ชื่อเรื่อง	การพัฒนาไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกที่มีการพอลิเมอไรเซชันจากการบ่มด้วยแสงสีฟ้า
ผู้วิจัย	ภูรี เชาว์พาณิชย์เจริญ
ปริญญา	วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต
ปีการศึกษา	2564
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. สรศักดิ์ รังสิยานนท์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร. นิรดา ธเนศวร
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จิตติมา ลัคนากุล

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกซึ่งบ่มด้วยแสงสีฟ้าให้เกิดขบวนการพอลิเมอไรเซชันสำหรับพัฒนาต่อยอดในการเป็นระบบนำส่งสารทางชีวภาพสำหรับงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อ ทดลองโดยเริ่มจากการสังเคราะห์เมตาคริเลตไฮยาลูโรนิกแอสิดไฮโดรเจลโดยเติมสารกระตุ้นคือ ลิเทียมฟีนิลไดรเมทิลเบนโซอิลฟอสฟิเนต (LAP) ร่วมกับการบ่มด้วยแสงสีฟ้าที่มีความยาวคลื่น 450-500 นาโนเมตร การศึกษาพบว่าสัดส่วน LAP ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 15mg/L ในไฮโดรเจล 100mg/L ร่วมกับการบ่มไฮโดรเจลด้วยแสงสีฟ้าอยู่ในช่วงระยะเวลา 90 วินาทีให้ผลดีที่สุดในการก่อตัวเป็นเจลจากคุณสมบัติทางกายภาพและลักษณะพื้นฐานวิทยาที่เหมาะสม สรุปได้ว่าเมตาคริเลตไฮยาลูโรนิกแอสิดไฮโดรเจลที่ศึกษาครั้งนี้สามารถนำมาพัฒนาต่อการใช้งานในทางคลินิกต่อไป

คำสำคัญ : ไฮโดรเจล, วิศวกรรมเนื้อเยื่อ, กรดไฮยาลูโรนิก, แสงสีฟ้า

Title	THE DEVELOPMENT OF BLUE LIGHT INITIATED PHOTOPOLYMERIZED HYALURONIC ACID BASED HYDROGEL
Author	PUREE CHAOPANITCHAROEN
Degree	MASTER OF SCIENCE
Academic Year	2021
Thesis Advisor	Associate Professor Dr. Sorasun Rungsiyanonte
Co Advisor	Associate Professor Dr. Nirada Dhanesuan
Co Advisor	Assistant Professor Dr. Jittima Luckanagul

The purpose of this study is to develop blue light-curing hyaluronic acid-based hydrogel and used for biomaterial delivery in tissue engineering. The metacrylated hyaluronic acid (MeHA) hydrogel was synthesized. Lithium phenyl-2,4,6-trimethylbenzoyl phosphonate (LAP) was then added as a photoinitiator, following of the exposure of 450-500 nm of blue light to promote proper crosslinking. It was found that LAP at 15 mg/L per MeHA 100 mg/L with 90 seconds of blue light-curing showed the best gel formation with proper physical properties and morphology. This blue light-curing MeHA hydrogel could be further developed for clinical usage.

Keyword : hydrogel, tissue engineering, hyaluronic acid, blue light

กิตติกรรมประกาศ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความช่วยเหลือจาก รองศาสตราจารย์ ดร.ทพ.สร สันห์ รังสิยานนท์ อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก, รองศาสตราจารย์ ดร.ทพญ.นิรดา ธเนศวร และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภญ.จิตติมา ลัคนากุล อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่อนุเคราะห์ให้คำปรึกษา ช่วยเหลือ รวมถึงตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องและไม่สมบูรณ์ต่างๆ ทำให้ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สมบูรณ์ครบถ้วน ตลอดจนให้กำลังใจและคอยสนับสนุนในด้านต่างๆ ตลอดระยะเวลาในการทำปริญญานิพนธ์ ผู้วิจัยจึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ทพญ.นันทา สารชนะกิจ ประธานกรรมการสอบ ปริญญานิพนธ์ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ทพญ.ภัทราญ แต่บรรพกุล กรรมการสอบปริญญานิพนธ์ ที่กรุณาสละเวลามาร่วมการสอบปริญญานิพนธ์พร้อมทั้งให้คำแนะนำ และแนวทางแก้ไขรวมถึง ข้อคิดในการทำปริญญานิพนธ์ ตลอดจนคณาจารย์ภาควิชาศัลยศาสตร์และเวชศาสตร์ช่องปากทุก ท่านที่ประสาทความรู้ให้แก่ผู้วิจัยตลอดระยะเวลาที่ศึกษาอยู่จนประสบผลสำเร็จ

ขอขอบพระคุณคณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่เชื้อเพื่อสถานที่ในการ ศึกษาวิจัยและทำปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ รวมถึงนิสิตบัณฑิตศึกษาคณะเภสัชศาสตร์ทุกท่านที่คอยให้ ความสนับสนุนและให้คำแนะนำในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ภญ.ภรณ์นิเวศ รอสมิง ที่ คอยให้คำปรึกษาและช่วยเหลือ จนการศึกษาวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณทุนอุดหนุนการวิจัยจากโรงพยาบาลทันตกรรม คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่ให้การสนับสนุนทำให้การวิจัยดำเนินไปได้ด้วยดี

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณครอบครัว และ เพื่อนนิสิตหลักสูตรวิทยาการช่องปากและแม็กซ์ซิลโลเฟ เซียลทุกท่าน ที่คอยให้กำลังใจและให้คำปรึกษาอย่างดีเสมอมา

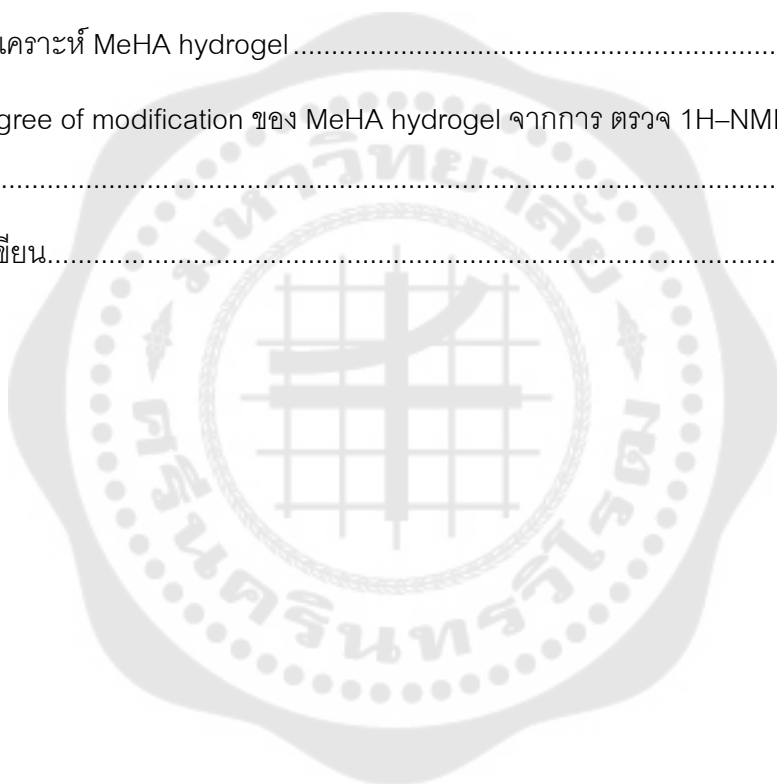
ภูรี เชาว์พาณิชย์เจริญ

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญรูปภาพ	ฎ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ภูมิหลัง	1
ความมุ่งหมายของงานวิจัย.....	4
ความสำคัญของงานวิจัย	4
ขอบเขตของงานวิจัย	4
กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในงานวิจัย.....	4
ตัวแปรที่ศึกษา	5
นิยามศัพท์เฉพาะ	5
กรอบแนวคิดงานวิจัย.....	5
สมมติฐานในการวิจัย.....	6
บทที่2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	7
วิศวกรรมเนื้อเยื่อ (tissue engineering)	7
โครงร่างชีวภาพหรือสแคฟโฟลด์ (Scaffold).....	9
สแคฟโฟลด์จากกรดไฮยาลูโรนิก (hyaluronic acid based scaffold)	12
การเชื่อมขวาง (crosslinking)	13

การพอลิเมอไรเซชันจากการบ่มด้วยแสง (light initiated photopolymerization)	17
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	21
การกำหนดกลุ่มตัวอย่าง	21
ขั้นตอนการทดลอง	21
1.การสังเคราะห์ไฮโดรเจลจากกรดไฮยาโลโรนิก	21
2.การผสม blue light initiator	24
3.การศึกษาระยะเวลาในการก่อตัวเป็นเจลของไฮโดรเจล	24
4.การศึกษาการพองตัวของไฮโดรเจล	24
5.การศึกษาการสลายตัวของไฮโดรเจล	26
6.การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายในโครงสร้างของไฮโดรเจล	26
.....	27
การเก็บรวบรวมข้อมูล	27
สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล	27
บทที่ 4 ผลการดำเนินงานวิจัย	28
การนำเสนอผลการดำเนินงานวิจัย	28
ผลการดำเนินงานวิจัย	28
ตอนที่ 1 การสังเคราะห์ไฮโดรเจลจากกรดไฮยาโลโรนิกและผสม blue light initiator	28
ตอนที่ 2 ระยะเวลาในการก่อตัวเป็นเจลของไฮโดรเจล	30
ตอนที่ 3 การพองตัวของไฮโดรเจล	31
ตอนที่ 4 การสลายตัวของไฮโดรเจล	33
ตอนที่ 5 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายในโครงสร้างของไฮโดรเจล	35
บทที่ 5 อภิปรายผล ข้อเสนอแนะ และ สรุปผลการวิจัย	44
สรุปผลการศึกษาวิจัย	48

ข้อเสนอแนะในการทำวิจัยครั้งต่อไป.....	48
บรรณานุกรม	50
ภาคผนวก.....	54
แผนการดำเนินงาน	54
ค่าใช้จ่ายในการวิจัย	55
รายการสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย	56
การสังเคราะห์ MeHA hydrogel	56
ค่า degree of modification ของ MeHA hydrogel จากการ ตรวจ 1H-NMR spectroscopy	57
ประวัติผู้เขียน.....	61



สารบัญตาราง

หน้า

ตาราง 1 แสดง degree of modification ของ MeHA hydrogel ทั้งหมดในการศึกษาครั้งนี้.....	29
ตาราง 2 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้จากสารละลายไฮยาลูโรนิกเดส 100U ตามช่วงระยะเวลาที่ใช้ในการบ่มด้วยแสงสีฟ้า	34
ตาราง 3 แผนการดำเนินงานวิจัย	54
ตาราง 4 ค่าใช้จ่ายในงานวิจัย.....	55



สารบัญรูปภาพ

	หน้า
ภาพประกอบ 1 กรอบแนวคิดงานวิจัย	5
ภาพประกอบ 2 แสดงองค์ประกอบของวิศวกรรมเนื้อเยื่อ	8
ภาพประกอบ 3 แสดงโครงสร้างของกรดไฮยาลูโรนิก	13
ภาพประกอบ 4 แสดงขั้นตอนการสังเคราะห์ MeHA hydrogel	23
ภาพประกอบ 5 แสดงตัวอย่างผลที่ได้จากการวัด degree of modification ด้วยเทคนิค H-NMR spectroscopy โดยคำนวณจากการวัดพื้นที่ใต้กราฟด้วยโปรแกรม MestReNova6	29
ภาพประกอบ 6 แสดงผลการทดสอบ inverted tube test ของ MeHA polymer ทั้ง 4 กลุ่มทดสอบ (ก) บ่มด้วยแสงสีฟ้า 30 วินาที (ข) บ่มด้วยแสงสีฟ้า 60 วินาที (ค) บ่มด้วยแสงสีฟ้า 90 วินาที (ง) บ่มด้วยแสงสีฟ้า 120 วินาที	31
ภาพประกอบ 7 แสดงสัดส่วนการพองตัวของ MeHA hydrogel ที่บ่มด้วยแสงสีฟ้าเป็นระยะเวลา 30, 60, 90 และ 120 วินาที ตามช่วงระยะเวลาที่ชั่งน้ำหนักหลังแช่ PBS ในหน่วยชั่วโมง	32
ภาพประกอบ 8 แสดงปริมาณน้ำ, อัตราส่วนการพองตัวเชิงมวล และ อัตราส่วนการพองตัวเชิงปริมาตรของไฮโดรเจล	33
ภาพประกอบ 9 แสดงขนาดที่แตกต่างกันของไฮโดรเจลที่ผ่านการแช่ PBS เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดย (ก) แสดงเจลที่บ่มด้วยแสงสีฟ้าเป็นเวลา 60 วินาทีและ (ข) แสดงเจลที่บ่มด้วยแสงสีฟ้าเป็นเวลา 30 วินาที	33
ภาพประกอบ 10 แสดงแนวโน้มการสลายตัวของไฮโดรเจลจากการดูดกลืนแสงที่วัดได้จากสารละลายไฮยาลูโรนิก 100U ตามช่วงระยะเวลาที่ใช้ในการบ่มด้วยแสงสีฟ้า	35
ภาพประกอบ 11 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายในโครงสร้างของไฮโดรเจล	42
ภาพประกอบ 12 แสดงตัวอย่างการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางรูพรุนของไฮโดรเจล ด้วยโปรแกรม ImageJ	43

บทที่ 1

บทนำ

ภูมิหลัง

ปัจจุบันโลกของเรากำลังเข้าสู่สังคมผู้สูงอายุ องค์การสหประชาชาติ (UN) ได้นิยามว่าประเทศใดมีประชากรอายุ 60 ปีขึ้นไปเป็นสัดส่วนเกิน 10% หรืออายุ 65 ปีขึ้นไปเกิน 7% ของประชากรทั้งประเทศ ถือว่าประเทศนั้นได้ก้าวเข้าสู่สังคมผู้สูงอายุ (aging society) และจะเป็นสังคมผู้สูงอายุโดยสมบูรณ์ (aged society) เมื่อสัดส่วนประชากรอายุ 60 ปีขึ้นไปเพิ่มเป็น 20% และอายุ 65 ปีขึ้นไปเพิ่มเป็น 14%(1) โดยประเทศไทยได้นิยามคำว่า “ผู้สูงอายุ” ไว้ในพระราชบัญญัติผู้สูงอายุพ.ศ. 2546 ว่าหมายถึง “ผู้ที่มีอายุ 60 ปีขึ้นไป” จากข้อมูลของกรมการปกครอง กระทรวงมหาดไทย พบว่าสถิติจำนวนผู้สูงอายุในประเทศไทย ณ วันที่ 31 ธันวาคม 2563 ประเทศไทยมีจำนวนผู้สูงอายุถึง 17.57% นั้นหมายถึงประเทศไทยกำลังเข้าสู่สังคมผู้สูงอายุโดยสมบูรณ์ในอีกไม่ช้า

จากรายงานผลสำรวจสุขภาพช่องปากระดับประเทศครั้งที่ 8 ปี 2560 จากกรมอนามัย กระทรวงสาธารณสุขพบว่าผู้สูงอายุตั้งแต่ 60-74 ปีและ 80-85 ปีเป็นผู้ที่ไม่มีฟันทั้งปากถึงร้อยละ 8.7 และ 31.0 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าปัญหาหลักที่เกิดขึ้นในช่องปากของผู้สูงอายุคือการสูญเสียฟัน ซึ่งการรักษาโดยการทดแทนฟันที่สูญเสียไปที่กำลังเป็นที่นิยมและมีการใช้มากขึ้นเรื่อยๆ คือการฝังรากเทียมที่ให้ผลสำเร็จสูงถึงร้อยละ 95(2) โดยความสำเร็จของการฝังรากเทียมนั้นเริ่มจากการมีเสถียรภาพที่ดีตั้งแต่วันที่ฝังจนไปถึงการเกิดกรยึดอยู่กับกระดูกขากรรไกร หรือ osteointegration ที่สมบูรณ์ ดังนั้นปัจจัยที่สำคัญที่สุดในการฝังรากเทียมให้ได้ผลสำเร็จคือปริมาณและคุณภาพของกระดูกขากรรไกรของผู้ป่วย ปัญหาความพิการของกระดูกผู้ป่วยสามารถเกิดได้จากหลายสาเหตุ เช่น การมีพยาธิสภาพบริเวณขากรรไกรจากระยะโรคต่างๆในช่องปาก, การถอนฟันไปเป็นเวลานานโดยไม่ได้ใส่ฟันทดแทน หรือ มีการงอกย้อยลงมาของพื้นโพรงอากาศข้างแก้ม เป็นต้น โดยมีการศึกษาของ Narayan และคณะในปี 2015(3) พบว่าความพิการของกระดูกขนาดใหญ่ไม่สามารถหายได้เองอย่างสมบูรณ์โดยไม่ใช้การรักษาอื่นๆเพิ่มเติมได้แก่ การปลูกถ่ายกระดูก ซึ่งการปลูกถ่ายกระดูกสามารถใช้วัสดุที่หลากหลายในการรักษา เช่น Autograft, Allograft, Xenograft และ Alloplastic material เป็นต้น การปลูกถ่ายกระดูกนั้นมีสิ่งที่จะต้องคำนึงถึงอยู่หลายประการได้แก่ osteoinductivity, osteoconductivity, osteogenicity ซึ่งวัสดุต่างๆมีข้อดี ข้อเสีย แตกต่างกันไปโดยส่วนใหญ่มักมีคุณสมบัติ osteoconductivity ส่วนข้อเสียก็มีตั้งแต่ การมีโอกาสติดเชื้อระหว่างการปลูกถ่าย, การต่อต้านกระดูกที่ปลูกถ่ายจากระบบภูมิคุ้มกัน

ของร่างกาย, วัสดุสังเคราะห์บางชนิดไม่สามารถสลายตัวได้หมดทำให้เป็นสิ่งแปลกปลอมหลงเหลือในร่างกายซึ่งอาจขัดขวางการสร้างกระดูกบริเวณนั้นและทำให้เกิดการอักเสบได้ และราคาสูง ด้วยข้อจำกัดต่างๆเหล่านี้จึงทำให้งานทางด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ (tissue engineering) ได้รับความสนใจและต้องการที่จะพัฒนาวัสดุที่สามารถตอบโจทย์ได้ในทุกมิติโดยเฉพาะงานที่เกี่ยวข้องกับงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อแข็ง (hard tissue engineering)

งานด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อประกอบไปด้วยส่วนสำคัญสามส่วนได้แก่ 1. เซลล์ (cell) 2. โกรทแฟคเตอร์ (growth factor) และ 3. โครงร่างชีวภาพ หรือ สแคฟโฟลด์ (scaffold) โดยมีงานวิจัยที่มุ่งเน้นศึกษาในแต่ละองค์ประกอบที่เกี่ยวข้องกับงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อแตกต่างกันไป งานวิจัยด้านที่เกี่ยวข้องกับเซลล์ เช่น การศึกษาที่ใช้ autologous mesenchymal stem cells ร่วมกับ freeze dried bone allograft (FDBA) ในการปลูกถ่ายกระดูกเพื่อยกระดับพื้นโพรงอากาศข้างแก้ม (maxillary sinus lifting)(4) หรือ การประยุกต์ใช้ dental pulp stem cells (DPSC) ในการรักษาภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือด (myocardial infarction) เป็นต้น(5) สำหรับงานวิจัยที่มุ่งศึกษาถึงปัจจัยด้านโกรทแฟคเตอร์ ที่ได้รับความสนใจและศึกษากันอย่างแพร่หลายในวงการวิศวกรรมเนื้อเยื่อแข็ง ได้แก่ งานวิจัยเกี่ยวกับ bone morphogenetic protein (BMP) ยกตัวอย่างเช่น การศึกษาผลของการใช้วัสดุปลูกถ่ายกระดูกชนิดแคลเซียมฟอสเฟตร่วมกับ BMP-2 ในการปลูกถ่ายกระดูก เป็นต้น(6)

สำหรับการวิจัยที่เกี่ยวข้องกับโครงร่างชีวภาพ หรือ สแคฟโฟลด์ มีการทดลองวิจัยเพื่อนำสารหลายรูปแบบมาศึกษาโดยประเด็นสำคัญที่จะส่งผลต่อความสำเร็จในด้านของโครงร่างชีวภาพในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อแข็ง ได้แก่ โครงร่างทางชีวภาพเหล่านั้นต้องมีคุณสมบัติ osteoinduction หรือการเหนี่ยวนำให้เซลล์และโกรทแฟคเตอร์ต่างๆที่จำเป็นเข้ามาบริเวณที่ปลูกถ่ายเนื้อเยื่อ การจะนำส่งโกรทแฟคเตอร์เข้ามาใช้งานได้อย่างมีประสิทธิภาพนั้นจำเป็นต้องมีระบบนำส่งสารที่มีคุณภาพเพื่อให้สามารถนำพาสารเหล่านี้เข้าไปในบริเวณที่จะทำการรักษา และสามารถออกฤทธิ์ทำงานได้อย่างสมบูรณ์ ระบบนำส่งสารหรือโครงร่างทางชีวภาพที่มีการศึกษาหรือผลิตออกมาใช้มีหลายชนิดขึ้นกับลักษณะและคุณสมบัติที่ใช้ในการแบ่ง โดยถ้าหากแบ่งจำแนกชนิดตามสารตั้งต้นที่ใช้สามารถแบ่งได้เป็น 1. สแคฟโฟลด์ชนิดสังเคราะห์ (alloplastic synthetic scaffolds), 2. สแคฟโฟลด์จากสารธรรมชาติ (natural tissue scaffolds) และ 3. สแคฟโฟลด์ชนิดไฮโดรเจล (hydrogel scaffolds)(7) แต่ถ้าแบ่งตามลักษณะทางสัณฐานวิทยา (geometry) จะสามารถแบ่งได้เป็น 1. สแคฟโฟลด์ชนิดรูพรุน (porous scaffolds) เช่น ฟองน้ำ (sponge) หรือโฟม (foam), 2. สแคฟโฟลด์ชนิดเส้นใย (fibrous scaffolds) เช่น ท่อคาร์บอนขนาดเล็ก (carbon nanotube)

หรือเส้นใยขนาดเล็ก (nanofiber), 3.สแคฟโฟลด์ที่มีองค์ประกอบเป็นทรงกลมขนาดเล็ก (microsphere scaffolds) และ 4.สแคฟโฟลด์ที่ไม่ใช้รูปแบบของแข็ง (solid free-form scaffolds) เป็นต้น(7),(8),(9) ส่วนใหญ่ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อแข็ง สแคฟโฟลด์ผลิตเพื่อนำมาใช้ในการนำส่ง BMP-2 ที่มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพสูง แต่ในปัจจุบันสแคฟโฟลด์ใช้ในทางคลินิกจริงพบว่าไม่สามารถคาดการณ์ปริมาณการปลดปล่อย BMP-2 ออกมาได้ มีลักษณะที่เรียกว่า initial burst คือปลดปล่อยสารออกมามากในช่วงแรกและเมื่อเวลาผ่านไปประมาณ 2 สัปดาห์ ปริมาณ BMP2 ลดลงเหลือเพียงเล็กน้อยเท่านั้น (10),(11)

ระบบขนส่งสารชนิดไฮโดรเจล (hydrogel) เป็นระบบนำส่งสารที่พบการศึกษาหลายฉบับ โดยไฮโดรเจลส่วนมากที่ศึกษานี้ จัดเป็นพอลิเมอร์ร่างแหที่มีความสามารถในการพองตัวและกักเก็บน้ำที่ดี ทำให้เกิดโครงสร้างแบบ 3 มิติได้จากการก่อตัวเป็นเจล มีความนิ่มและยืดหยุ่นได้ดี สามารถผลิตได้จากสารต้นแบบหลายชนิด โดยไฮโดรเจลที่ผลิตจากกรดไฮยาลูโรนิกก็เป็นหนึ่งในชนิดที่ได้รับความนิยม มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพสูง สามารถสลายตัวได้โดยเอนไซม์ภายในร่างกายมนุษย์ และสามารถพัฒนาปรับคุณสมบัติให้เหมาะสมกับการใช้งานต่างๆได้ แต่จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าการสังเคราะห์ไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกนี้ยังพบข้อจำกัดบางประการในขั้นตอนการเตรียมสารนี้ ตัวอย่างเช่น degree of modification ที่มีค่าไม่แน่นอน และระยะเวลาในการก่อตัวเป็นเจล (gelation time) ที่ยังไม่สามารถควบคุมให้ได้เวลาที่เท่ากันในแต่ละครั้งของการสังเคราะห์ได้ ยกตัวอย่างการศึกษาของ Trakiattikul N. และคณะในปี 2018 ที่ศึกษาไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกในรูปแบบชนิดที่นำมาดัดแปลงด้วยเมตาคริลิกแอนไฮไดรด์ (methacrylic anhydride) และครอสลิงค์ด้วยไดไทโอทรีโธล (dithiothreitol; DTT) พบว่ามี degree of modification อยู่ที่ร้อยละ 21.8-41.38 ระยะเวลาในการก่อตัวเป็นเจลอยู่ในช่วงระยะเวลาประมาณ 30 นาที หรือการศึกษาของ Areevijit K. และคณะในปี 2019 ที่ศึกษาความเข้ากันได้ของเมตาคริลเลตไฮยาลูโรนิกไฮโดรเจล (methacrylate hyaluronic acid hydrogel) ที่ครอสลิงค์ด้วย DTT กับเซลล์กระดูกเบ้าฟันมนุษย์ พบว่าไฮโดรเจลที่สังเคราะห์ได้มี degree of modification อยู่ที่ร้อยละ 42.03 และระยะเวลาในการก่อตัวเป็นเจลที่เร็วที่สุดในช่วงระยะเวลาประมาณ 15-30 นาที ซึ่งในแต่ละการวิจัยที่ผ่านมาได้ให้ข้อสรุปและเสนอแนะว่า ปัจจัยที่อาจส่งผลต่อระยะเวลาในการก่อตัวของเจลมีความสัมพันธ์กับอัตราส่วนของ thiol:ene ใน DTT หรือค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่เปลี่ยนไป ความไม่แน่นอนนี้จึงเป็นข้อจำกัดในการใช้ไฮโดรเจลระบบนี้ในการใช้งานจริง รวมถึงรูปแบบในการครอสลิงค์ (crosslink) ก็มีความจำเป็นและส่งผลกระทบต่อระยะเวลาในการก่อตัวเป็นเจลได้(12),(13),(14) โดยวิธีการครอสลิงค์เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันนั้นมีมากมายหลายวิธี เช่น การพอลิเมอไรเซชันจากอนุมูลอิสระ (free-radical

polymerization), การพอลิเมอไรเซชันจากการควบแน่น (condensation polymerization), การพอลิเมอไรเซชันจากปฏิกิริยาเคมี (chemical crosslinking polymerization) หรือ การพอลิเมอไรเซชันด้วยแสงจากการบ่มด้วยแสง (photopolymerization) เป็นต้น ปัจจุบันพบว่านักวิจัยมีความสนใจและต้องการที่จะพัฒนาการพอลิเมอไรเซชันจากการบ่มด้วยแสงเนื่องจากมีข้อดีหลายประการ เช่น ต้นทุนที่ไม่แพง, การไม่ทำให้คุณสมบัติของโพลิเมอร์เปลี่ยนไป, ไม่จำเป็นต้องใช้สารเคมีจำพวกตัวทำละลายหรือสารลดแรงตึงผิว เป็นต้น และที่สำคัญคือระยะเวลาในการพอลิเมอไรเซชันที่รวดเร็ว(15)

ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะพัฒนาไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกที่มีการพอลิเมอไรเซชันจากการบ่มด้วยแสงสีฟ้าให้มีคุณสมบัติทางกายภาพและลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่เหมาะสม ได้แก่ ระยะเวลาในการก่อตัวเป็นเจลที่รวดเร็ว, การพองตัวของไฮโดรเจลที่เหมาะสม, การสลายตัวได้หมด และ ลักษณะรูพรุนภายในโครงสร้างของไฮโดรเจลที่เหมาะสมกับงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อแข็ง และมุ่งหวังว่าผลการศึกษาที่ได้จะสามารถนำไปพัฒนาต่อยอดและประยุกต์ใช้ทางคลินิกได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น

ความมุ่งหมายของงานวิจัย

1. พัฒนาไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกที่สามารถก่อตัวเป็นเจลได้จากการบ่มด้วยแสงสีฟ้า
2. ศึกษาความแตกต่างของคุณสมบัติทางกายภาพและโครงสร้างภายในของไฮโดรเจลที่บ่มด้วยแสงสีฟ้าเพื่อหาระยะเวลาที่ใช้ในการก่อตัวเป็นเจลที่เหมาะสมสำหรับงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อแข็ง

ความสำคัญของงานวิจัย

เป็นการพัฒนาวัสดุทางชีวภาพ ได้แก่ ไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกที่มีการพอลิเมอไรเซชันจากการบ่มด้วยแสงสีฟ้าซึ่งมีระยะเวลาในการก่อตัวเป็นเจลที่รวดเร็วและมีคุณสมบัติทางกายภาพที่เหมาะสม ได้แก่, การพองตัวของไฮโดรเจล, การสลายตัว และ ลักษณะรูพรุนภายในโครงสร้างของไฮโดรเจลที่เหมาะสมกับงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อแข็ง

ขอบเขตของงานวิจัย

กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในงานวิจัย

กลุ่มตัวอย่าง ได้แก่ MeHA hydrogel ซึ่งใส่สารกระตุ้นให้เกิดการพอลิเมอไรเซชันผ่านการ คrosslinking จากการบ่มด้วยแสงสีฟ้า โดยไฮโดรเจลที่สังเคราะห์ได้มีค่า degree of

modification อยู่ในช่วง 40-100 และใช้สารกระตุ้นด้วยแสงสีฟ้า (blue light initiator) ได้แก่ ลิเทียมฟีนิลไดรเมทิลเบนโซอิลฟอสฟิเนต (lithium phenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphinate; LAP) ซึ่งจะใช้สารละลาย MeHA พอลิเมอร์ ความเข้มข้น 100 mg/L ผสมกับสารละลาย LAP ความเข้มข้น 15mg/L (อ้างอิงจากการศึกษาของ Wang G. และคณะในปี 2018) กระตุ้นให้เกิดการพอลิเมอไรเซชันจากการบ่มด้วยแสงสีฟ้าที่มีความยาวคลื่นเท่ากับ 450-500 nm ซึ่งการวิจัยครั้งนี้จะมีการบ่มด้วยแสงสีฟ้าในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน ได้แก่ 30, 60, 90 และ 120 วินาที โดยทดลองซ้ำอัตราส่วนละสามครั้ง (triplicate)

ตัวแปรที่ศึกษา

ตัวแปรต้น : ระยะเวลาในการบ่มด้วยแสงสีฟ้าที่แตกต่างกันของสารละลาย MeHA พอลิเมอร์ ความเข้มข้น 100mg/L ที่ผสมกับสารละลาย LAP ความเข้มข้น 15mg/L

ตัวแปรตาม : ระยะเวลาในการก่อตัวเป็นเจลของสารละลาย MeHA พอลิเมอร์ ที่ผสมกับ LAP

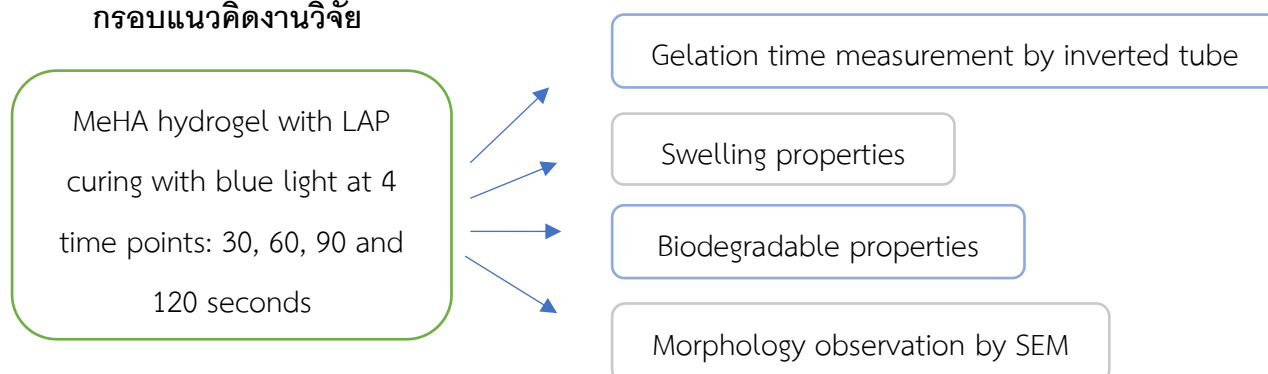
ตัวแปรควบคุม : degree of modification ของ MeHA พอลิเมอร์ อยู่ในช่วง 40-100

นิยามศัพท์เฉพาะ

1.Modified injectable hyaluronic acid hydrogel หมายถึง ระบบนำส่งสารหรือโครงร่างชีวภาพ (scaffold) ชนิดไฮโดรเจลที่ผลิตจากกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้รับการปรับปรุงสูตร โดยเติม Methacrylic anhydride เป็นเมทาไครเลตไฮยาลูโรนิกไฮโดรเจล (MeHA hydrogel) เป็นรูปแบบของระบบการนำส่งสารหรือโครงร่างชีวภาพที่มีประสิทธิภาพสูง เข้ากับเนื้อเยื่อได้ดี ใช้ในการนำส่งสารต่างๆ เช่น เซลล์ ยา โปรตีนชนิดต่างๆ เป็นต้น

2.Blue light initiator หมายถึง สารกระตุ้นให้เกิดการพอลิเมอไรเซชันของพอลิเมอร์ ผ่านการดูดกลืนแสงสีฟ้า

กรอบแนวคิดงานวิจัย



ภาพประกอบ 1 กรอบแนวคิดงานวิจัย

สมมติฐานในการวิจัย

สมมติฐานหลัก : ระยะเวลาในการก่อตัวเป็นเจลและสมบัติทางกายภาพของ MeHA hydrogel ที่ผสมกับ LAP ไม่มีความแตกต่างกันในแต่ละช่วงเวลาที่ใช้ในการบ่มด้วยแสงสีฟ้า

สมมติฐานรอง : ระยะเวลาในการก่อตัวเป็นเจลและสมบัติทางกายภาพของ MeHA hydrogel ที่ผสมกับ LAP มีความแตกต่างกันในแต่ละช่วงเวลาที่ใช้ในการบ่มด้วยแสงสีฟ้า



บทที่2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

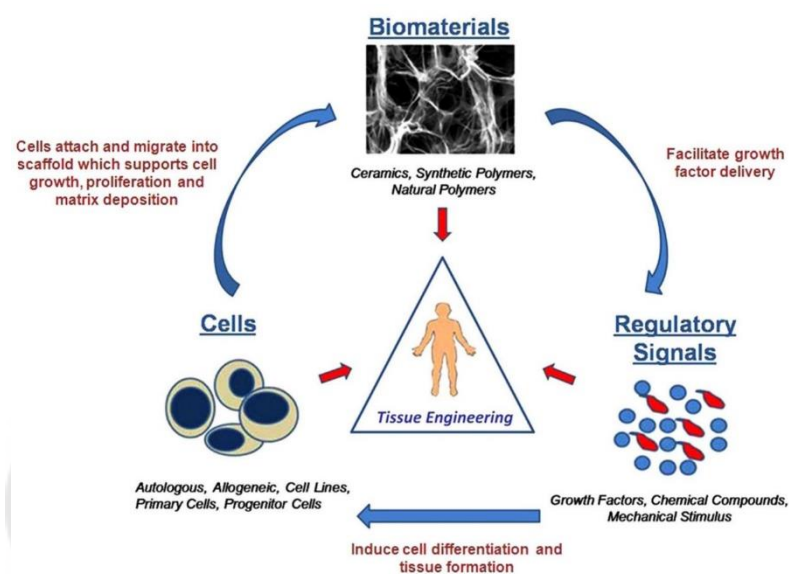
ในการวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยได้ศึกษาเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง และได้นำเสนอตามหัวข้อต่อไปนี้

- 1.วิศวกรรมเนื้อเยื่อ (tissue engineering)
- 2.โครงร่างชีวภาพหรือสแคฟโฟลด์ (scaffold)
- 3.สแคฟโฟลด์จากกรดไฮยาลูโรนิก (hyaluronic acid based scaffold)
- 4.การเชื่อมขวาง (crosslinking)
- 5.การพอลิเมอไรเซชันจากการป้อนด้วยแสง (light initiated photopolymerization)

วิศวกรรมเนื้อเยื่อ (tissue engineering)

วิศวกรรมเนื้อเยื่อมีวัตถุประสงค์เพื่อสร้างเนื้อเยื่อทดแทนที่สามารถคงอยู่ได้และฟื้นฟูหรือปรับปรุงการทำงานของเนื้อเยื่อหรืออวัยวะที่ถูกทำลาย โดยจะต้องประกอบไปด้วยส่วนสำคัญสามส่วนได้แก่ เซลล์ (cell), โกรทแฟคเตอร์ (growth factor) และ โครงร่างชีวภาพ หรือ สแคฟโฟลด์ (scaffold) โดยกระบวนการพื้นฐานของวิศวกรรมเนื้อเยื่อเริ่มด้วยการนำเซลล์ที่ต้องการจะปลูกถ่ายและโกรทแฟคเตอร์ใส่เข้าไปใน สแคฟโฟลด์ที่ทำหน้าที่เป็นระบบขนส่งสาร และเป็นโครงร่างสามมิติเพื่อให้เซลล์สามารถยึดเกาะและแบ่งตัวเจริญเติบโตได้ และเพื่อเหนี่ยวนำให้มีการสร้างเมทริกซ์เนื้อเยื่อ (tissue matrix) ใหม่ จากนั้นจึงนำเข้าไปปลูกถ่ายในผู้ป่วย โดย สแคฟโฟลด์ที่ใส่เข้าไปนั้นจำเป็นต้องสามารถย่อยสลายได้เองจากเอนไซม์ในร่างกายมนุษย์ หลังจากมีการสร้างเนื้อเยื่อใหม่ขึ้นเพื่อไม่ให้หลงเหลือเป็นวัตถุแปลกปลอมที่จะกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายและเพื่อให้เนื้อเยื่อใหม่สามารถสร้างและทำหน้าที่ได้อย่างสมบูรณ์(16),(17) ซึ่งผลสำเร็จในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อจะเกิดขึ้นได้นั้นไม่ใช่แค่เพียงเข้าใจองค์ประกอบแต่ละส่วนเพียงอย่างเดียวแต่สิ่งสำคัญคือต้องเข้าใจความสัมพันธ์ของแต่ละองค์ประกอบ (interaction) อีกด้วย ในปัจจุบันได้มีการพัฒนาองค์ประกอบต่างๆทั้งสามองค์ประกอบอย่างกว้างขวางเนื่องจากในแต่ละองค์ประกอบก็ยังมีข้อบกพร่องหรือข้อด้อยซึ่งทำให้นักวิจัยให้พยายามแก้ไขข้อบกพร่องเหล่านั้น เช่น สแคฟโฟลด์ที่ดีสิ่งที่สำคัญคือ มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพ (biocompatibility), มีความสามารถในการสลายตัว (biodegradability), มีรูพรุน (porous structure), มีความสามารถในการรับแรงเชิงกล (mechanical support) ที่ดี เป็นต้น ซึ่งสแคฟโฟลด์จากธรรมชาติย่อมมีความเข้ากันได้ทางชีวภาพ และ ความสามารถในการสลายตัวที่ดีกว่าสแคฟโฟลด์สังเคราะห์ ในทาง

ตรงกันข้ามสแคฟโฟลด์สังเคราะห์ก็มักมีคุณสมบัติทางกายภาพ (physical properties) ที่ดีกว่าสแคฟโฟลด์จากธรรมชาติซึ่งคือเหตุผลให้ปัจจุบันมีความต้องการที่จะพัฒนาวัสดุผสม (composite materials) ที่สามารถตอบโจทย์คุณสมบัติด้านต่างๆได้อย่างเหมาะสมเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อต่างๆ(18),(19)



ภาพประกอบ 2 แสดงองค์ประกอบของวิศวกรรมเนื้อเยื่อ

ที่มา : Murphy CM, O'Brien FJ, Little DG, Schindeler A. Cell-scaffold interactions in the bone tissue engineering triad. Eur Cell Mater. 2013;26:120-32.

ก่อนหน้านี้ยังมีความเชื่อที่ว่าเนื้อเยื่อที่ถูกทำลายไปสามารถทดแทนได้ด้วยการปลูกถ่ายเนื้อเยื่อจากสิ่งมีชีวิตในสายพันธุ์เดียวกัน (allogeneic transplantation) หรือ การปลูกถ่ายด้วยเนื้อเยื่อหรืออวัยวะเทียม (artificial implantation) เท่านั้น ซึ่งกระบวนการเหล่านี้ไม่สามารถทดแทนการทำหน้าที่ของเนื้อเยื่อหรืออวัยวะที่สูญเสียไปได้ทั้งหมดเนื่องจากยังมีข้อจำกัดในหลายๆด้าน(16) นอกจากนี้แล้วหากพูดถึงเนื้อเยื่อปลูกถ่ายหรือวัสดุปลูกถ่าย (grafting materials) ต่างๆที่นำมาใช้ในการปลูกถ่ายเนื้อเยื่อก็ยังมีข้อดีและข้อด้อยแตกต่างกันไป(20)

Autograft หรือ เนื้อเยื่อปลูกถ่ายจากตัวผู้ป่วยเองจัดเป็นมาตรฐานที่ดีที่สุดในการปลูกถ่ายเนื้อเยื่อ เช่น autogenous bone graft โดยมีการหายของแผลที่ดีและสมบูรณ์ แต่ในทาง

ตรงกันข้ามก็ยังมีข้อเสียคือ ผู้ป่วยต้องได้รับการผ่าตัดหลายตำแหน่ง, มีโอกาสติดเชื้อ และปริมาณเนื้อเยื่อปลูกถ่ายที่นำมาได้อาจไม่เพียงพอต่อตำแหน่งที่จะทำการปลูกถ่าย(20),(21),(22)

Allograft หรือ วัสดุปลูกถ่ายจากสิ่งมีชีวิตในสายพันธุ์เดียวกัน ยกตัวอย่างในการปลูกถ่ายเซลล์กระดูก allograft มีข้อดีในหลายด้าน เช่น สามารถทำให้รูปร่างเหมาะสมกับตำแหน่งที่เราจะปลูกถ่ายและมีปริมาณที่มากเพียงพอตามที่ต้องการจะใช้ ส่วนข้อเสียก็ได้แก่ ราคาที่ค่อนข้างสูงและการหายของแผลอาจไม่สมบูรณ์เหมือนเนื้อเยื่อตั้งต้นที่ต้องการปลูกถ่าย (20),(21),(22)

Xenograft หรือ วัสดุปลูกถ่ายจากสิ่งมีชีวิตต่างสายพันธุ์ ที่นิยมนำมาใช้ในการปลูกถ่ายเซลล์กระดูกจะมาจากกระดูกวัวหรือหมู มีข้อดีคือ มีคุณสมบัติชักนำให้เกิดการสร้างกระดูก (osteoconduction) ที่ดี สามารถคงรูปร่างอยู่ได้นาน สลายตัวค่อนข้างช้า ส่วนข้อเสียเนื่องจากเป็นวัสดุปลูกถ่ายจากสิ่งมีชีวิตต่างสายพันธุ์ดังนั้นจึงมีโอกาสเป็นพาหะก่อโรคได้และวัสดุปลูกถ่ายต้องผ่านกรรมวิธีการฆ่าเชื้อด้วยการเผานอุณหภูมิสูงจึงทำให้มีคุณสมบัติทางเคมีและกายภาพแตกต่างจากเนื้อเยื่อกระดูกมนุษย์(21),(22)

Alloplastic materials หรือ วัสดุปลูกถ่ายสังเคราะห์ ถูกคิดค้นขึ้นเพื่อลดข้อด้อยของวัสดุปลูกถ่ายอื่นๆที่กล่าวมาข้างต้น เช่น ลดการส่งผ่านเชื้อโรค, ลดการทูลพลภาพของเนื้อเยื่อบริเวณที่ถูกนำไปปลูกถ่าย และ มีการคงรูปร่างเป็นโครงร่างสามมิติเพื่อให้เซลล์กระดูกสามารถเข้ามาเจริญเติบโตได้ เป็นต้น ส่วนข้อเสียคือ ราคาที่ค่อนข้างสูงและหากพูดถึงในงานปลูกถ่ายเซลล์กระดูกก็ยังมีขาดคุณสมบัติเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างกระดูก (osteoiduction) ด้วยตัวของวัสดุเอง เป็นต้น(21)

ดังนั้นการพัฒนาวิศกรรมเนื้อเยื่อก็เพื่อที่จะเพิ่มทางเลือกในการรักษาโดยลดข้อจำกัดของวัสดุปลูกถ่ายต่างๆเหล่านี้ ให้สามารถตอบโจทย์การปลูกถ่ายเนื้อเยื่อในทุกด้าน ทั้งกายภาพและเคมี รวมถึงในงานปลูกถ่ายกระดูกที่คาดหวังให้วัสดุปลูกถ่ายมีคุณสมบัติทั้ง osteogenicity, osteoconductivity และ osteoinductivity(22) เพื่อให้การปลูกถ่ายเนื้อเยื่อประสบความสำเร็จสูงสุดและเกิดผลข้างเคียงหรือภาวะแทรกซ้อนจากการปลูกถ่ายน้อยที่สุด(16)

โครงร่างชีวภาพหรือสแคฟโฟลด์ (Scaffold)

สแคฟโฟลด์มีหน้าที่หลักคือเป็นระบบขนส่งสารและเป็นโครงร่างชั่วคราวให้กับบริเวณที่จะทำการปลูกถ่ายเนื้อเยื่อ (defect site) จนกว่าเนื้อเยื่อที่ถูกทำลายบริเวณนั้นจะมีการซ่อมแซมหรือสร้างใหม่จนสามารถกลับมาทำหน้าที่ได้เหมือนเดิม ดังนั้นสแคฟโฟลด์จึงจำเป็นต้องมีคุณสมบัติต่างๆดังนี้(16)

ลำดับแรก สแคฟโฟลด์ต้องทำหน้าที่ส่งเสริมให้เซลล์สามารถดำรงชีวิตและแบ่งตัวเจริญเติบโตได้ ซึ่งสิ่งสำคัญคือลักษณะและขนาดของรูพรุน โดยรูพรุนจะต้องมีการเชื่อมต่อกันทั่วทุกพื้นผิวของ สแคฟโฟลด์และขนาดของรูพรุนจะต้องเหมาะสมเพื่อให้เซลล์สามารถได้รับสารอาหารและแลกเปลี่ยนสารต่างๆได้ และเพื่อให้มีพื้นที่ผิวที่มากซึ่งช่วยให้เซลล์มีการยึดเกาะที่ดี(16),(19) โดยพบว่าหากรูพรุนมีขนาดเล็กเกินไปจะทำให้เซลล์มีการเคลื่อนที่เข้ามาได้อย่างจำกัดเป็นผลให้มีการสร้างเซลล์ลูลาร์แคปซูล (cellular capsule) รอบๆขอบของสแคฟโฟลด์ อีกทั้งยังทำให้การแพร่เข้าออกของสารอาหาร, โกรทแฟคเตอร์ และการกำจัดของเสียไม่ดีเท่าที่ควร ส่งผลให้เกิดการตายของเซลล์บริเวณนั้นได้ ในทางกลับกันหากรูพรุนมีขนาดใหญ่เกินไปก็ทำให้มีพื้นที่ผิวที่ลดลงส่งผลให้เซลล์เกาะได้น้อยลงและลดความแข็งแรงของสแคฟโฟลด์เช่นกัน(20) โดยขนาดรูพรุนที่เหมาะสมขึ้นกับชนิดของ สแคฟโฟลด์และชนิดของเซลล์ที่ต้องการปลูกถ่าย ตัวอย่างเช่น ขนาดรูพรุนที่เหมาะสมกับการปลูกถ่ายเซลล์กระดูกควรมีขนาดประมาณ 100-500 ไมครอน(16),(17),(23)

ลำดับถัดมาคือความเข้ากันได้กับเซลล์และสามารถย่อยสลายได้เองตามธรรมชาติ สแคฟโฟลด์ในอุดมคติควรสร้างจากวัสดุทางชีวภาพที่เหมาะสมและถูกย่อยสลายได้ด้วยเอนไซม์จากเนื้อเยื่อรอบๆโดยไม่มีความจำเป็นต้องผ่าตัดเอาออกและมีการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันที่น้อยเพื่อลดการอักเสบที่จะส่งผลให้การปลูกถ่ายเนื้อเยื่อล้มเหลวได้ โดยอัตราการสลายตัวของสแคฟโฟลด์ต้องสัมพันธ์กับการสร้างเนื้อเยื่อใหม่ หมายความว่าเมื่อเนื้อเยื่อใหม่มีการสร้างขึ้นจนสามารถคงรูปอยู่ได้เองแล้ว สแคฟโฟลด์ก็ควรที่จะค่อยๆสลายไปเหลือเพียงเนื้อเยื่อที่สร้างขึ้นมาใหม่เท่านั้นเพื่อไม่ให้เป็นสิ่งแปลกปลอมที่หลงเหลืออยู่ภายในร่างกาย(16)

ลำดับสุดท้ายสแคฟโฟลด์ควรมีคุณสมบัติชอบน้ำเพื่อให้เซลล์, โปรตีนและสารต่างๆสามารถเข้ามาเกาะกับสแคฟโฟลด์ได้(23) อีกทั้งควรมีการยึดเกาะกับเนื้อเยื่อข้างเคียงที่ดี (high bioactivity) เพื่อให้เกิดพันธะเคมีขึ้น สำหรับการปลูกถ่ายเซลล์กระดูกสแคฟโฟลด์ควรมีคุณสมบัติชักนำการสร้างกระดูก (osteoconductivity) กล่าวคือการเป็นโครงร่างชักนำเซลล์กระดูกเข้ามาและเจริญเติบโตอยู่ภายใน และ osteoinductivity คือการเหนี่ยวนำให้เซลล์ต้นกำเนิดพลูริโพเทนต์ (pluripotent stem cell) ให้กลายเป็นเซลล์ที่จำเป็นในการสร้างกระดูกและเกิดการสร้างกระดูกใหม่ขึ้น ดังนั้นการคิดค้นและพัฒนาคุณสมบัติทางชีวภาพของสแคฟโฟลด์ให้มีคุณสมบัติต่างๆที่กล่าวมาข้างต้นครบถ้วนจึงเป็นความท้าทายของวงการวิศวกรรมเนื้อเยื่อในปัจจุบัน(16),(20)

ในปัจจุบันได้มีการคิดค้นและพัฒนาวัสดุต่างๆอย่างมากมายเพื่อนำมาใช้เป็นสารตั้งต้นในการสร้างสแคฟโฟลด์ โดยหากกล่าวถึงการปลูกถ่ายเซลล์กระดูกนั้นวัสดุที่นิยมนำมาสร้างเป็น

สแคฟโฟลด์จะแบ่งได้เป็น สารจากธรรมชาติ (natural materials), พอลิเมอร์สังเคราะห์ (synthetic polymers) และ สารอนินทรีย์ (inorganic materials)(20),(24) ซึ่งล้วนแต่มีข้อดีข้อด้อยแตกต่างกันไป โดยนอกจากในเรื่องของการทำหน้าที่เป็นโครงร่างที่ดีแล้วนั้นยังมุ่งหวังให้สามารถนำส่งสารต่างๆได้ เช่น โกรทแฟคเตอร์ (growth factor) หรือ ยาปฏิชีวนะ (antibiotic) เป็นต้น ซึ่งจะช่วยในเรื่องของการสร้างกระดูก, การหายของแผล และการรักษาพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อบริเวณนั้น(20)

สารจากธรรมชาติ ยกตัวอย่างเช่น พอลิแซ็กคาไรด์ (polysaccharides) จะประกอบไปด้วยสารจำพวกแป้ง (starch), อัลจีเนต (alginate), ไคตินหรือไคโตซาน (chitin/chitosan) และอนุพันธ์จากกรดไฮยาลูโรนิก (hyaluronic acid derivates) ส่วนสารจากธรรมชาติอีกประเภทคือ โปรตีน (protein) จะประกอบไปด้วยถั่วเหลือง (soy), ไฟบรินเจล (fibrin gel) และ ไหม (silk) เป็นต้น ซึ่งล้วนแต่จะช่วยในเรื่องของการเกาะตัวและการทำงานของเซลล์ (cell adhesion and function) แต่อย่างไรก็ตามจะมีข้อเสียในเรื่องของการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายโดยอาจเนื่องมาจากการมีสิ่งเจือปนที่ทำให้เกิดโรค (pathogenic impurities) และคุณสมบัติในการสลายตัว (biodegradability) ซึ่งควบคุมได้ยาก(20),(24)

พอลิเมอร์สังเคราะห์ ยกตัวอย่างเช่น กรดพอลิแลคติก (polylactic acid), กรดพอลิไกลิโคลิก (polyglycolic acid) และ โคพอลิเมอร์ (copolymer) ต่างๆของทั้งสองชนิด นิยมใช้ในงานปลูกถ่ายเซลล์ต่างๆและการสร้างเป็นสแคฟโฟลด์เนื่องจากคุณสมบัติทางกายภาพที่ดีและสามารถควบคุมการย่อยสลายได้ง่าย(20),(24)

สารอนินทรีย์ ยกตัวอย่างเช่น โลหะ, ไบโอบีโอแอคทีฟกลาส (bioactive glass), ไตรแคลเซียมฟอสเฟต (tricalcium phosphate) และ ไฮดรอกซีอะพาไทต์ (hydroxyapatite) เป็นต้น ได้รับความนิยมในงานวิศวกรรมกระดูกเนื่องจากความคล้ายคลึงกันกับแร่ธาตุในกระดูก อีกทั้งยังมีการนำสารหลายชนิดมาผสมกันเพื่อให้ได้สแคฟโฟลด์ที่มีคุณสมบัติที่ดีขึ้น เช่น HA-TCP biphasic ceramic เป็นต้น(20),(24)

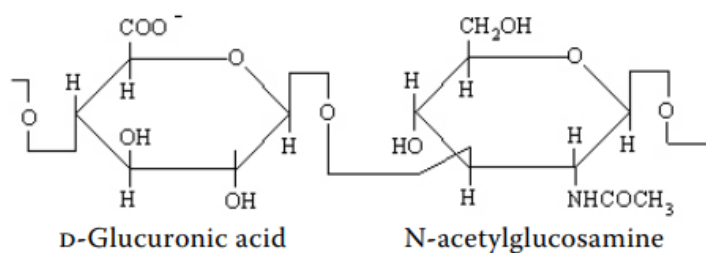
นอกจากนั้นแล้ว สแคฟโฟลด์ยังมีหลากหลายรูปแบบขึ้นกับลักษณะและคุณสมบัติที่ใช้ในการแบ่ง เช่น หากแบ่งตามลักษณะทางสัณฐานวิทยา (geometry) จะสามารถแบ่งได้เป็น 1.สแคฟโฟลด์ชนิดรูพรุน (porous scaffolds) เช่น ฟองน้ำ (sponge) หรือโฟม (foam), 2.สแคฟโฟลด์ชนิดเส้นใย (fibrous scaffolds) เช่น ท่อคาร์บอนขนาดเล็ก (carbon nanotube) หรือเส้นใยขนาดเล็ก (nanofiber)(8),(9),(7), 3.สแคฟโฟลด์ที่มีองค์ประกอบเป็นทรงกลมขนาดเล็ก (microsphere scaffolds) และ 4.สแคฟโฟลด์ที่ไม่ใช่รูปแบบของแข็ง (solid free-form scaffolds) เป็นต้น แต่ถ้าหากแบ่งจำแนกชนิดตามสารตั้งต้นที่ใช้สามารถแบ่งได้เป็น

1.สcaffoldชนิดสังเคราะห์ (alloplastic synthetic scaffolds), 2. scaffoldจากสารธรรมชาติ (natural tissue scaffolds) และ 3. scaffoldชนิดไฮโดรเจล (hydrogel scaffolds)(7) ซึ่งที่ได้รับความนิยมจะเป็นโครงร่างชีวภาพจำพวก “ไฮโดรเจล (hydrogel)” โดยไฮโดรเจลนั้นคือโครงข่ายสามมิติที่มีรูพรุนและความยืดหยุ่นสูงสามารถสร้างได้จากทั้งสารจากธรรมชาติและพอลิเมอร์สังเคราะห์ มีคุณสมบัติชอบน้ำ (hydrophilicity) สามารถดูดและคั่งน้ำหรือสารน้ำชีวภาพ (biological fluid) ไว้ได้ดีในปริมาณมาก, ใช้เป็นวัสดุนำส่งยาได้(20),(25),(26) เซลล์และสารอาหารต่างๆสามารถเข้ามาในไฮโดรเจลผ่านรูพรุนและมีการแพร่ของเสียออกเช่นกัน อีกทั้งยังสามารถเลียนแบบเนื้อเยื่อของร่างกายที่มีการตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงของสิ่งแวดล้อมโดยรอบ เช่น ค่า pH หรือ อุณหภูมิ เป็นต้น จึงนิยมนำมาใช้ในงานวิศวกรรมกระดูกอย่างกว้างขวาง โดยจากสารและวัสดุต่างๆที่นิยมนำมาสร้างเป็น scaffold ตามที่ได้กล่าวมาข้างต้นนั้น หากพิจารณาในด้านของ biocompatibility, biodegradability, porosity และ hydrophilicity ซึ่งล้วนเป็นคุณสมบัติของ scaffold ที่ดีควรมีแล้วนั้น พบว่ากรดไฮยาลูโรนิก (hyaluronic acid) เป็นสารตั้งต้นที่มีคุณสมบัติต่างๆดังกล่าวครบถ้วน(20)

scaffoldจากกรดไฮยาลูโรนิก (hyaluronic acid based scaffold)

กรดไฮยาลูโรนิก (hyaluronic acid, HA) หรือ ไฮยาลูโรแนน (hyaluronan) เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดเส้นขนาน (linear polysaccharide) ที่ประกอบไปด้วย N-acetyl-D-glucosamine and D-glucuronic acid เป็นสายยาวซ้ำๆกันหรือเรียกอีกอย่างว่าไกลโคซามิโนไกลแคน (glycosaminoglycan)(20) สามารถพบได้ทั่วทั้งร่างกาย โดยกรดไฮยาลูโรนิกเป็นองค์ประกอบหลักของเมทริกซ์นอกเซลล์ (extracellular matrix) ซึ่งมีบทบาททั้งในด้านการเป็นโครงร่าง, การส่งสัญญาณระหว่างเซลล์ และการหายของแผล เป็นต้น อนุพันธ์ของกรดไฮยาลูโรนิกถูกใช้ในการพัฒนาผลิตภัณฑ์ทางการแพทย์มามากกว่าสามทศวรรษในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อและการแพทย์ฟื้นฟู(25),(27) นิยมใช้เป็นส่วนประกอบหลักของ scaffold ชนิดไฮโดรเจลที่ใช้เป็นระบบขนส่งสารต่างๆและโปรตีนโดยมีความเข้ากันได้กับเซลล์, สามารถย่อยสลายได้ และ คงรูปเป็นเจลที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบหลัก(28) เนื่องจากกรดไฮยาลูโรนิกสามารถถูกย่อยสลายได้ด้วยเอนไซม์ของเนื้อเยื่อดังนั้นจึงไม่ส่งผลให้เกิดการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายทำให้มีประสิทธิภาพในการใช้งานที่ดี(28) ในด้านการแพทย์มีการประยุกต์ใช้ไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกที่หลากหลายโดยนิยมนำมาใช้ในงานวิศวกรรมกระดูก เช่น การฉีดไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกในการปลูกถ่ายเซลล์กระดูกและกระดูกอ่อน(28),(29),(30), ในผู้ป่วยมะเร็งโดยพบว่าผู้ป่วยมะเร็งจะเกิดการมีแสดงออกของ HA receptor ที่มากผิดปกติซึ่ง

แพทย์จะใช้ประโยชน์ด้านนี้ในการรักษามะเร็งแบบเฉพาะเจาะจง (targeted cancer therapy) และในผู้ป่วยโรคข้ออักเสบ (osteoarthritis) ซึ่งกรดไฮยาลูโรนิกจะช่วยทำหน้าที่เปรียบเสมือนสารหล่อลื่น, เพิ่มความชื้นหนืดให้กับน้ำไขข้อ และ กันกระแทกโดยการแยกชั้นพื้นผิวข้อต่อ (articular surface) ออกให้รับแรงน้อยลง นอกจากนี้แล้วก็ยังมีการนำมาประยุกต์ใช้เป็นพาหะ (carrier) ในการขนส่งยาแบบเฉพาะที่ (topical, transdermal delivery)(31),(32) เป็นส่วนเติมเต็มชั้นผิวหนัง (dermal filler) และวัสดุปิดแผล (wound dressing) อีกด้วย(25)



ภาพประกอบ 3 แสดงโครงสร้างของกรดไฮยาลูโรนิก

ที่มา: J. Necas LB, P. Brauner, J. Kolar. Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. Veterinarni Medicina. 53, 2008 (8): 397–411

ในทางตรงกันข้ามการมีความสามารถในการละลายน้ำและคุณสมบัติ biodegradability ที่ดีของกรดไฮยาลูโรนิกกลับกลายเป็นข้อด้อยด้วยเช่นกัน โดยพบว่าส่วนประกอบร้อยละ 30 จะถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส (hyaluronidase) และออกซิเดทีฟสปีชีส์ (oxidative species) อย่างรวดเร็ว ส่วนอีกร้อยละ 70 จะไปสลายตัว (catabolized) ที่ตับและเยื่อเมือกของหลอดน้ำเหลือง(25) ทำให้ไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกไม่สามารถคงรูปอยู่ได้อย่างมีเสถียรภาพซึ่งจำเป็นต้องมีการทำให้เกิดปฏิกิริยาคrosslink (crosslink)(20) เพื่อปรับปรุงคุณสมบัติทางกายภาพให้ดียิ่งขึ้น โดยในทศวรรษที่ผ่านมาได้มีการพัฒนาวิธีการต่างๆ มากมายในการสังเคราะห์ไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกที่มีการcrosslink ให้มีคุณสมบัติทางกายภาพที่ดีมากขึ้น(25),(27)

การcrosslink (crosslinking)

Crosslinking คือกระบวนการทางเคมีที่ทำให้พอลิเมอร์มีเสถียรภาพมากขึ้นโดยส่งผลให้เกิดการขยายตัวในทุกมิติของสายพอลิเมอร์เป็นโครงข่ายพอลิเมอร์หรือเรียกได้ว่าcrosslink คือพันธะที่เชื่อมสายพอลิเมอร์หลายสายเข้าไว้ด้วยกันโดยอาจเป็นได้ทั้ง พันธะไอออนิก (ionic bond)

หรือ พันธะโควาเลนต์ (covalent bond) ครออสลิงค์จะเปลี่ยนให้พอลิเมอร์เหลวให้กลายเป็นพอลิเมอร์ที่แข็งตัวมากขึ้นหรือเป็นเจลโดยการจำกัดความสามารถในการเคลื่อนตัวของพอลิเมอร์นั้นๆ กล่าวคือเมื่อพอลิเมอร์มีการเชื่อมกันระหว่างสายพอลิเมอร์อื่นๆจะทำให้ความสามารถในการเคลื่อนตัวของสายพอลิเมอร์เดี่ยวๆสูญเสียไปและครออสลิงค์ยังเพิ่มมวลโมเลกุลของพอลิเมอร์ที่เกิดการครออสลิงค์ขึ้นอีกด้วย(33)

การครออสลิงค์ระหว่างสายพอลิเมอร์มีผลกับคุณสมบัติทางกายภาพของพอลิเมอร์นั้นๆ โดยขึ้นกับระดับของการครออสลิงค์ซึ่งส่งผลกับคุณสมบัติต่างๆดังนี้(33)

Elasticity คือการถูกยืดออกและสามารถคืนตัวกลับมาอยู่ในรูปร่างเดิมได้ โดยจะขึ้นกับระดับของการครออสลิงค์ ยิ่งมีระดับของการครออสลิงค์สูง พอลิเมอร์ก็จะมีค่าความแข็งแรงมากขึ้นแต่ยืดออกและไหลได้น้อยลงเป็นผลให้พอลิเมอร์มีความเปราะ เช่น การวัลคาไนเซชัน (vulcanization) ของยาง(33)

Decrease in the viscosity คือมีความต้านทานการไหล พอลิเมอร์ที่ไหลได้จะต้องไหลผ่าน พอลิเมอร์สายอื่นซึ่งการครออสลิงค์จะยับยั้งความสามารถนี้เพื่อลดพฤติกรรมการคืบ (creep behavior)(33)

Insolubility of the polymer คือครออสลิงค์จะเชื่อมสายพอลิเมอร์ไว้ด้วยพันธะที่แข็งแรงจึงทำให้พอลิเมอร์ไม่สามารถละลายตัวได้ในตัวทำละลาย แต่สามารถดูดซึมตัวทำละลายไว้ได้ โดยเมื่อพอลิเมอร์ที่ครออสลิงค์แล้ว (crosslinked polymer) ดูดซับตัวทำละลายไว้มากๆจะเรียกว่า เจล(33)

Lower melting point สำหรับคริสตัลไลน์พอลิเมอร์ที่มีระดับการครออสลิงค์ที่ต่ำจะลดพฤติกรรมการเกิดคริสตัล (crystalline behavior) ทำให้มีความนิ่มมากขึ้นและอีลาสติกพอลิเมอร์(elastic polymer) มีจุดหลอมเหลวที่ต่ำลง(33)

Transformation of thermoplasts to thermosets การมีระดับการครออสลิงค์ที่สูงจะเปลี่ยนพอลิเมอร์ชนิดเทอร์โมพลาสติกเป็นชนิดเทอร์โมเซต คือเมื่อเกิดการครออสลิงค์ขึ้นจะไม่สามารถเปลี่ยนแปลงรูปร่างของพอลิเมอร์ได้อีก(33)

ดังนั้นพอลิเมอร์ที่ครออสลิงค์แล้วจึงมีความสำคัญเนื่องจากการมีคุณสมบัติทางกายภาพที่แข็งแรงมากขึ้น, ต้านทานความร้อน, การสึกกร่อน และ การถูกย่อยสลายด้วยตัวทำละลาย แต่ในทางกลับกันพอลิเมอร์ที่ครออสลิงค์ก็จะสูญเสียความยืดหยุ่นไปเช่นเดียวกัน โดยปัจจัยที่สำคัญในการครออสลิงค์ได้แก่ชนิดของครออสลิงเกอร์ (crosslinker) ที่ใช้และความเข้มข้นของครออสลิงเกอร์ (concentration of crosslinker; crosslink density)(33),(15)

ไฮโดรเจลคือ crosslinked hydrophilic polymer ที่สามารถดูดซับน้ำหรือสารน้ำชีวภาพ (biological fluid) ได้ปริมาณมาก จึงได้รับความนิยมในวงการแพทย์ และ เกสกรรมประยุกต์ต่างๆ และด้วยความเข้ากันได้ดีกับเนื้อเยื่อจึงเหมาะแก่การใช้เป็นระบบขนส่งสารต่างๆและโปรตีน รวมถึงใช้ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อ อีกทั้งความชอบน้ำ, ความนุ่ม และ ความเหนียวของไฮโดรเจล ทำให้ลดการระคายเคืองต่อเนื้อเยื่อรอบๆอีกด้วย(33) โดยการครอสลิงค์ไฮโดรเจลนั้นสามารถทำได้หลายรูปแบบ เช่น การใช้ครอสลิงเกอร์ชนิดสารเคมี (chemical crosslinkers), สารประกอบพอลิฟังก์ชันแนล (polyfunctional compounds), การฉายรังสีหรือใช้อิออนอนุมูลอิสระ (radiations or free radical generating compounds) เป็นต้น(25) ในปัจจุบันปฏิกิริยาเคมีที่ได้รับความนิยมในการครอสลิงค์ไฮโดรเจลได้แก่ click chemistry เนื่องจากมีความจำเพาะสูงและมีเงื่อนไขในการเกิดปฏิกิริยาน้อย ตัวอย่างปฏิกิริยา click chemistry ได้แก่ Diels Alder Reaction, Azide-Alkyn Huisgen Cycloaddition, Thiol-ene Photocoupling, Aldehyde-Hydrazide Coupling, Enzymatic Crosslinking, Disulfide Crosslinking, Crosslinking by Radical Polymerization และ Crosslinking by Condensation Reactions โดยเฉพาะ Thiol-ene Photocoupling เป็นปฏิกิริยาที่ไม่มีตัวทำละลายและสามารถควบคุมความเปลี่ยนแปลงในแต่ละช่วงเวลา (spatio-temporal) ของไฮโดรเจลได้ ดังนั้นจึงนิยมใช้ครอสลิงค์ไฮโดรเจลที่ใช้ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อและการส่งผ่านยา(25)

ในระยะเวลาที่ผ่านมาไม่นานนี้ พบว่าเทคโนโลยีในเรื่องของการครอสลิงค์เป็นหนึ่งในประเด็นสำคัญที่นักวิจัยให้ความสนใจในการที่จะพัฒนาสแคฟโฟลด์ที่มีประสิทธิภาพวัตถุประสงค์หลักของการครอสลิงค์ก็เพื่อที่จะปรับปรุงคุณสมบัติทางกายภาพและชีวกลศาสตร์ (biomechanical) ของสแคฟโฟลด์ให้มีการสร้างเป็นโครงข่ายที่แข็งแรงดังที่ได้กล่าวมาข้างต้น โดยการที่จะเกิดปฏิกิริยาครอสลิงค์ขึ้นได้นั้นแต่ละปฏิกิริยาย่อมต้องมีสารที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาขึ้น (crosslinker) ซึ่งไม่ใช่เพียงแค่สามารถปรับปรุงคุณสมบัติทางกายภาพและชีวกลศาสตร์ของสแคฟโฟลด์ได้เท่านั้น แต่ยังจำเป็นต้องไม่เป็นพิษกับเซลล์ด้วยเช่นกัน โดยมีการศึกษาพบว่า การครอสลิงค์สามารถช่วยลดความเป็นสิ่งแปลกปลอม (antigenicity) ของสแคฟโฟลด์ได้อีกด้วย (34)

ครอสลิงเกอร์ที่นำมาใช้ในการครอสลิงค์สแคฟโฟลด์ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อมีอยู่มากมาย มีทั้งที่เป็นสารจากธรรมชาติและสารสังเคราะห์ ยกตัวอย่างในกลุ่ม enzymatic crosslinking agents เช่น ทรานส์กลูตามิเนส (transglutaminase), ไมโครเบียลทีเกส (mTGase), ฮอร์ราดิชเพอร์ออกไซด์เดส (horseradish peroxidase; HRP) และ ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์

(hydrogen peroxide) เป็นต้น นิยมนำไป crosslink scaffold ชนิด biopolymeric scaffold และ ไฮโดรเจลเนื่องจากได้การ crosslink ที่มีประสิทธิภาพ, มีเงื่อนไขในการเกิดปฏิกิริยาน้อย และมีความเข้ากันได้กับเซลล์ ถัดมาในกลุ่ม crosslinker ชนิดโมเลกุลขนาดเล็ก (small molecule crosslinkers) เช่น glutaraldehyde ก็ได้รับความนิยมในการนำมา crosslink scaffold ต่างๆ และไฮโดรเจลเช่นกัน แต่เนื่องด้วยหมู่ฟังก์ชัน (functional group) ของ glutaraldehyde มีความเป็นพิษกับเซลล์ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีกรรมวิธีในการลดความเป็นพิษของสารโดยการนำ scaffold ที่ crosslink ด้วย glutaraldehyde ไปล้างในสารละลายที่มีหมู่อะมีนอิสระ (free amine group) หรือกรดอะมิโน (amino acid) เช่น ไกลซีน (glycine) เพื่อกำจัดหมู่อัลดีไฮด์อิสระ (free aldehyde group) ออกไป นอกจากนี้แล้วยังมี crosslinker อื่นๆ หลายชนิดที่นำมาใช้ crosslink scaffold เช่น carbodiimide agents, สารประกอบอีพอกซี (epoxy compounds), กรดซิตริก (citric acid), ไกลออกซอล (glyoxal) และไดไทโอไทรโอทอล (dithiothreitol; DTT) เป็นต้น(34)

มีการศึกษาของ Maturavongsadit และคณะในปี 2016 ซึ่งศึกษาผลของโครงสร้างที่แตกต่างกันของ crosslinker ในการเปลี่ยนแปลง (differentiation) ของเซลล์กระดูกอ่อนในไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกซึ่งใช้ crosslinker 3 ชนิดได้แก่ dithiothreitol (DTT), 4-arm polyethylene glycol (PEG) และ multi-arm polyamidoamine (PAMAM) ผ่านปฏิกิริยา click reaction พบว่าโครงสร้างของ crosslinker มีผลกับคุณสมบัติทางกายภาพของไฮโดรเจลทั้งในแง่ของรูปร่าง, ความเหนียว, ความสามารถในการแพร่ของสารเข้าออก และ อัตราการสลายตัว อีกทั้งยังพบว่าไฮโดรเจลที่ crosslink ด้วย DTT เพียงอย่างเดียวมีระยะเวลาในการก่อตัวเป็นเจลเร็วที่สุดเมื่อเทียบกับการ crosslink ด้วยสารอื่น ๆ โดยใช้ระยะเวลาในการก่อตัวเป็นเจล ประมาณ 60 นาที(12)

ต่อมาในปี 2018 Trakiattikul N. และคณะได้ศึกษาไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกในรูปแบบจืดที่นำมาดัดแปลงด้วยเมตาคริลิกแอนไฮไดรด์ (methacrylic anhydride) และ crosslink ด้วยไดไทโอไทรโอทอล (dithiothreitol; DTT) โดยมีแมนนิทอล (mannitol) เป็นสารเพิ่มปริมาณยา และใช้บีเอสเอ (bovine serum albumin; BSA) เป็นตัวแทนโปรตีน พบว่าไฮโดรเจลที่ได้มีคุณสมบัติทางกายภาพที่ดี สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการขนส่งยาได้ แต่ยังมีระยะเวลาในการก่อตัวเป็นเจลอยู่ในช่วงระยะเวลาไม่เกิน 30 นาทีซึ่งยังคงค่อนข้างนาน(13) เช่นเดียวกับการศึกษาของ Areevijit K. และคณะในปี 2019 ที่ศึกษาความเข้ากันได้ของเมตาคริลเลตไฮยาลูโรนิกไฮโดรเจล (methacrylate hyaluronic acid hydrogel) ที่ crosslink ด้วย DTT กับเซลล์กระดูกเบ้าฟัน

มนุษย์ พบว่าเมตาคริเลตไฮยาโลโรนิกไฮโดรเจลที่มีการครอสลิงค์ด้วย DTT มีความเข้ากันได้กับเซลล์กระดูกงูพื้นมนุษย์และมีคุณสมบัติทางกายภาพทั่วไปที่ดีแต่ยังมีข้อด้อยสำคัญเช่นเดียวกัน คือ ระยะเวลาในการก่อตัวเป็นเจลที่ยังค่อนข้างนานอยู่ในช่วงระยะเวลาประมาณ 15-30 นาที ซึ่งยังไม่เหมาะสมในการนำไปประยุกต์ใช้ในการทดสอบทางคลินิกได้(14)

ดังนั้นแล้วในปัจจุบันจึงมีการพัฒนาการเกิดปฏิกิริยาพอลิเมอร์ไรเซชันด้วยการครอสลิงค์ของไฮโดรเจลจากการบ่มด้วยแสงเพื่อให้ไฮโดรเจลก่อตัวเป็นเจลด้วยข้อได้เปรียบในหลายด้าน เช่น สามารถทำได้ง่ายและใช้ระยะเวลาในการก่อตัวเป็นเจลที่รวดเร็ว, มีความปลอดภัยและต้นทุนที่ต่ำเมื่อเทียบกับปฏิกิริยาที่ใช้สารเคมีในการครอสลิงค์, ไฮโดรเจลที่ได้มีคุณสมบัติทางกายภาพที่เหมาะสมในการนำไปประยุกต์ใช้ทางคลินิกได้ เป็นต้น(32)

การพอลิเมอร์ไรเซชันจากการบ่มด้วยแสง (light initiated photopolymerization)

การพอลิเมอร์ไรเซชันจากการครอสลิงค์นั้นสามารถทำได้หลายรูปแบบ เช่น การพอลิเมอร์ไรเซชันจากอนุมูลอิสระ (free-radical polymerization), การพอลิเมอร์ไรเซชันจากการควบแน่น (condensation polymerization), การพอลิเมอร์ไรเซชันจากปฏิกิริยาเคมี (chemical crosslinking polymerization) หรือ การพอลิเมอร์ไรเซชันด้วยแสงจากรังสีอัลตราไวโอเลต (ultraviolet radiated photopolymerization) เป็นต้น เมื่อเปรียบเทียบกับ free-radical polymerization และ condensation polymerization แล้วพบว่า photopolymerization มีข้อได้เปรียบในหลายๆด้านได้แก่ ต้นทุนที่ไม่แพง, การไม่ทำให้คุณสมบัติของพอลิเมอร์เปลี่ยนไป, ไม่จำเป็นต้องใช้สารเคมี เช่น ตัวทำละลาย, โปรเทคทีฟคอลลอยด์ (protective colloid) หรือ สารลดแรงตึงผิว เป็นต้น ซึ่งผลลัพธ์ที่ได้พบว่าพอลิเมอร์ยังมีคุณสมบัติ biocompatibility เช่นเดิม อีกทั้งเวลาที่ใช้ในการทำ photopolymerization ยังน้อยกว่าการ polymerization แบบอื่นๆมาก(15) มีการศึกษาพบว่า photopolymerization เป็นเทคนิคที่สามารถ encapsulation เซลล์ที่มีชีวิตในรูปสามมิติที่มีความชุ่มชื้นและจำลองสภาวะแวดล้อมให้เหมือนในสิ่งมีชีวิตได้(35) อย่างไรก็ตามการพอลิเมอร์ไรเซชันจากการบ่มด้วยแสงจำเป็นต้องมีตัวกระตุ้นเพื่อเริ่มปฏิกิริยา (photoinitiator; photosensitizer) และ ต้องใช้ระยะเวลาในการบ่มด้วยแสงซึ่งทำให้มีการเพิ่มขึ้นของอนุมูลอิสระอาจส่งผลเสียกับเซลล์และเนื้อเยื่อบริเวณนั้นได้(32) แต่ก็ได้มีการศึกษาพบว่า การพอลิเมอร์ไรเซชันจากการบ่มด้วยแสงบางระบบสามารถก้าวข้ามข้อจำกัดตรงนี้ไปได้ด้วยการใช้แสงที่มีความเข้มข้นต่ำ, ใช้ระยะเวลาในการบ่มที่สั้น และมีอนุมูลอิสระที่เหมาะสมไม่ส่งผลเสียกับเซลล์และเนื้อเยื่อโดยรอบ(36) ซึ่งในปัจจุบันได้มีการพัฒนาและใช้ผลิตภัณฑ์ที่มีการพอลิเมอร์ไรเซชันจากการบ่ม

ด้วยแสงอย่างกว้างขวางโดยเฉพาะในทางทันตกรรม เช่น การใช้สารเคลือบหลุมร่องฟัน หรือ วัสดุอุดโพรงฟัน เป็นต้น(36)

ปฏิกิริยาการพอลิเมอไรเซชันจากการบ่มด้วยแสงนั้นสามารถเกิดขึ้นโดยเริ่มจาก photoinitiator ได้รับการกระตุ้นด้วยแสงจนเกิดการแตกตัวเป็นอนุมูลอิสระ (free radical) โดยอิเล็กตรอนคู่โดดเดี่ยวของอนุมูลอิสระจะเข้าจับกับอิเล็กตรอนของพันธะคู่ของมอนอเมอร์ซึ่งจะทำให้เหลืออิเล็กตรอนโดดเดี่ยวที่ปลายอีกข้างของมอนอเมอร์ จากนั้นอิเล็กตรอนโดดเดี่ยวนั้นจะทำให้ปฏิกิริยากับมอนอเมอร์ที่เหลือต่อไปเรื่อยๆ และปฏิกิริยาจะสิ้นสุดลงเมื่ออนุมูลอิสระ 2 โมเลกุลมาเจอกันและมีการใช้อิเล็กตรอนร่วมกัน (combination) หรือ มีการถ่ายทอดไฮโดรเจนอะตอมจากโมเลกุลหนึ่งไปยังอีกโมเลกุลหนึ่ง (disproportionation) โดยการสิ้นสุดของปฏิกิริยาทั้ง 2 แบบยังไม่สามารถอธิบายได้แน่ชัด เนื่องจากการสิ้นสุดของกระบวนการ (termination) นั้นขึ้นกับมวลโมเลกุล, ลักษณะโครงสร้างบริเวณปลายของสายพอลิเมอร์และคุณสมบัติของพอลิเมอร์ ซึ่งเป็นผลจากการออกแบบและสังเคราะห์พอลิเมอร์(37)

ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อนั้นก็ได้มีการนำปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันจากการบ่มด้วยแสงมาประยุกต์เช่นกัน โดยมีการศึกษาของ Fenn S. และคณะในปี 2016 ได้ศึกษาเปรียบเทียบปฏิกิริยาการพอลิเมอไรเซชันของเมตาคริลเลตไฮยาลูโรนิกไฮโดรเจล (methacrylated hyaluronan hydrogel) ที่มีการควบคุม degree of modification จากการบ่มด้วยแสงสีเขียว (visible green light) และแสงอัลตราไวโอเล็ต พบว่าไฮโดรเจลมีระยะเวลาในการก่อตัวเป็นเจลที่แตกต่างกันโดยไฮโดรเจลที่บ่มด้วยแสงสีเขียวใช้ระยะเวลาในการก่อตัวเป็นเจลที่มากกว่าการบ่มด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ตถึงสองเท่า(38)

ขณะเดียวกันในปี 2017 Donnelly P. และคณะได้ศึกษา tyramine-substituted hyaluronate hydrogel (TA-HA) โดยใช้ไรโบฟลาวิน (riboflavin) เป็น ultraviolet photoinitiator เพื่อให้เกิดการ क्रอสลิงค์ขึ้นรวมถึงมีการใช้ riboflavin และ TA-HA ในหลายอัตราส่วนและแปรผันเวลาที่ใช้ในการบ่มด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต (exposure time) เพื่อประเมินคุณสมบัติทางกายภาพ พบว่าไฮโดรเจลสามารถก่อตัวเป็นเจลได้ในระยะเวลาที่สั้นที่สุดคือภายใน 2 นาที 30 วินาทีและมีความเค้นเฉือน (shear stress) ที่มากขึ้นเมื่อเพิ่มระยะเวลาในการบ่มด้วยแสง (exposure time) สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการทำข้อต่อเทียมได้เป็นอย่างดี(39)

ต่อมาในปี 2019 Beninatto R. และคณะได้ทำการศึกษาโดยใช้แสงอัลตราไวโอเล็ตในการบ่มไฮโดรเจลแบบฉีดให้เกิดปฏิกิริยาครอสลิงค์ขึ้นพบว่านอกจากระยะเวลาในการก่อตัวเป็นเจลที่รวดเร็วแล้วยังมีข้อดีอื่นๆที่เหมาะสมกับงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อ เช่น การใช้ไฮโดรเจลแบบฉีด

สามารถเข้าไปเติมเต็มบริเวณที่ต้องการปลูกถ่าย (defect site) และเข้าไปกับบริเวณนั้น จากนั้นจึงฉายแสงเพื่อให้ไฮโดรเจลก่อตัวเป็นเจลคงรูปอยู่ภายใน defect site และในระหว่างการก่อตัวเป็นเจลจะมีการยึดติดไปกับเนื้อเยื่อข้างเคียงอีกด้วย เป็นต้น(40)

แต่เนื่องจากการประยุกต์ใช้แสงอัลตราไวโอเล็ตในการครอสลิงค์พอลิเมอร์ในทางการแพทย์นั้นยังมีข้อจำกัดในหลายด้าน เช่น ในการเตรียมไฮโดรเจลที่บ่มด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต จะมีการคายพลังงานและอุณหภูมิที่สูงซึ่งจะเป็นผลเสียกับการนำไฮโดรเจลไปใช้เป็นวัสดุนำส่งยา หรือเซลล์ เป็นต้น(38),(41) นอกจากนี้แล้วยังมีผลเสียกับชั้นโอโซน (ozone) อีกด้วย ดังนั้นจึงมีการพัฒนาที่จะใช้แสงสีฟ้า (visible blue light) เป็นตัวบ่มให้เกิดการพอลิเมอร์ไรเซชันผ่าน blue light initiator ต่างๆ เนื่องจากมีความปลอดภัยมากกว่าการบ่มด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต(41)

มีการศึกษาของ Sun G. และคณะในปี 2019 ได้ใช้แคมโฟควิโนน (camphorquinone; CQ) ซึ่งได้รับความนิยมและใช้เป็น visible light initiator ในวงการแพทย์อย่างกว้างขวาง(41), (42) ร่วมกับไดฟีนิลไอโอโดเนียม เฮกซะฟลูออโรฟอสเฟต (diphenyl iodonium hexafluorophosphate; DPI) ในการบ่ม dimethylacrylamide/sodium hydrogel ด้วยแสงสีฟ้า เนื่องจาก CQ และ DPI มีคุณสมบัติในการดูดซับแสง (strong absorption) ที่สูงและมีความไว (photosensitivity) ในย่านแสงสีฟ้าเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม dye/amine พบว่าไฮโดรเจลที่ได้มีระยะเวลาในการก่อตัวเป็นเจลที่รวดเร็วรวมถึงมีเสถียรภาพในการคงตัวที่ดี(41) แต่ก็ได้มีการศึกษารายงานว่าแคมโฟควิโนนมีคุณสมบัติการละลายน้ำที่ไม่ดีรวมถึงมีปฏิกิริยากับแสง (photoreactivity) ที่ต่ำ(42)

จึงได้มีการศึกษาที่ใช้ light initiator ตัวอื่นๆแทนแคมโฟควิโนน โดยมีการศึกษาของ Fairbanks B. และคณะในปี 2009 ได้ใช้ lithium phenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphine; LAP) เป็น light initiator ในการพอลิเมอร์ไรซ์ไดอะคริเลตพอลิเอทิลีนไกลคอล (diacrylated polyethyleneglycol; PEGDA) ไฮโดรเจล เพื่อทดสอบอัตราการพอลิเมอร์ไรเซชันและความเข้ากันได้กับเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (fibroblast) พบว่า LAP มีคุณสมบัติการละลายน้ำที่ดีและในการพอลิเมอร์ไรเซชัน PEGDA ไฮโดรเจลจากการบ่มด้วยแสงที่มีความยาวคลื่น 365nm พบว่ามีอัตราการพอลิเมอร์ไรเซชันของไฮโดรเจลที่รวดเร็วและมีอัตราการมีชีวิตอยู่ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (fibroblasts encapsulated cell survival rate) อยู่ที่ร้อยละ 95(35) เช่นเดียวกับ Wang G. และคณะในปี 2018 ที่ศึกษาไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกในรูปแบบฉีดที่ผ่านการพอลิเมอร์ไรเซชันจากการบ่มด้วยแสงโดยใช้ LAP เป็น light initiator ร่วมกับปฏิกิริยา thermal-induced Diels-Alder reaction ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน พบว่าไฮโดรเจลสามารถพอลิเมอร์ไรเซชันก่อ

ตัวเป็นเจลได้ภายในระยะเวลาเพียง 30 วินาทีจากการบ่มด้วยแสงที่มีความยาวคลื่น 365 nm ซึ่งมีข้อดีคือเซลล์กระดูกอ่อนยังมี encapsulated cell activity อยู่และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ทางคลินิกได้ จากนั้นปฏิกิริยาการพอลิเมอไรเซชันจะดำเนินต่ออย่างช้าๆผ่าน thermal-induced Diels-Alder reaction เพื่อเพิ่มคุณสมบัติเชิงกลให้กับไฮโดรเจล(43)

ดังนั้นทางผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะพัฒนาไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกที่นำมาดัดแปลงด้วยเมตาคริลิกแอ่นไฮไดรด์ (MeHA hydrogel) ที่เกิดปฏิกิริยาการพอลิเมอไรเซชันจากการครอสลิงค์ผ่านการบ่มด้วยแสงสีฟ้า โดยมี lithium phenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphinate (LAP) เป็น blue light initiator เพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางกายภาพ โดยความรู้ที่ได้จะสามารถนำไปพัฒนาต่อยอดในการศึกษาที่ซับซ้อนมากขึ้นและนำไปประยุกต์ใช้ทางการแพทย์ได้ในอนาคต(41)



บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

การศึกษาวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยวางแผนเพื่อวิจัย โดยมีลำดับขั้นตอนดังต่อไปนี้

- 1.การกำหนดกลุ่มตัวอย่าง
- 2.ขั้นตอนการทดลอง
- 3.การเก็บรวบรวมข้อมูล
- 4.สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล
- 5.แผนการดำเนินงาน
- 6.ค่าใช้จ่ายในการวิจัย

การกำหนดกลุ่มตัวอย่าง

blue light initiated photopolymerized MeHA hydrogel ที่กำหนดอัตราส่วนของ blue light initiator ที่เท่ากันแต่มีการกำหนดให้ระยะเวลาในการบ่มด้วยแสงที่แตกต่างกัน โดยจะนำตัวอย่างของไฮโดรเจลแต่ละกลุ่มไปทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพและลักษณะทางสัณฐานวิทยาต่างๆตามที่ได้กำหนดไว้ ได้แก่ ระยะเวลาในการก่อตัวเป็นเจล, การพองตัวของไฮโดรเจล, การสลายตัวของไฮโดรเจลและ ลักษณะรูพรุนภายในโครงสร้างของไฮโดรเจล

ขั้นตอนการทดลอง

1.การสังเคราะห์ไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิก

เตรียมสาร Modified injectable hyaluronic acid hydrogel ที่ดัดแปลงสูตรแล้วตามขั้นตอนของ Trakiattikul N. ในปี 2018 โดยนำกรดไฮยาลูโรนิกน้ำหนักโมเลกุล 47 กิโลดาลตัน ไปละลายใน Potassium phosphate buffer สัดส่วน 1% โดยน้ำหนัก ในสภาวะที่มีค่า pH = 8 และหยด methacrylic anhydride สัดส่วนเชิงมวล 1:10 ต่อ HA monomer ลงในสารละลายที่มีอุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส และควบคุมให้เกิดปฏิกิริยาขึ้นในช่วงอุณหภูมิ 0-4 องศาเซลเซียสเสมอ จากนั้นจะมีการปรับค่า pH ของสารทั้ง 2 สถานะให้มีค่าเท่ากับ 8 โดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 5 โมลาร์ และปล่อยให้ปฏิกิริยาดำเนินต่อไป 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ซึ่งต้องทำการเขັดและปรับค่า pH ตลอด จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปปั่นด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ความเร็ว 10,000 รอบ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนที่

ตกตะกอนออกแล้วนำไปแช่ไนโตรเจนเหลวทันทีก่อนนำไปทำแช่แข็งแบบเยือกแข็ง (freeze-dried technique or lyophilization) (ภาพประกอบ4) ก่อนนำไปตรวจดู Degree of modification ของกรดไฮยาลูรอนิกด้วยเทคนิคโปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโคปี ($^1\text{H-NMR}$ spectroscopy)



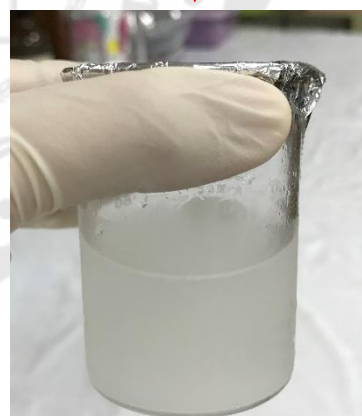
ก แสดงตัวอย่างการสังเคราะห์ MeHA hydrogel



ข แสดงอุปกรณ์ที่ใช้ในการสังเคราะห์ MeHA hydrogel



ง แสดงตัวอย่างการ stir สารละลาย MeHA hydrogel ในตู้เย็นจนครบ 24 ชั่วโมง



ค แสดงตัวอย่างสารละลาย MeHA hydrogel



จ แสดงตัวอย่างการ dialysis
สารละลาย MeHA hydrogel



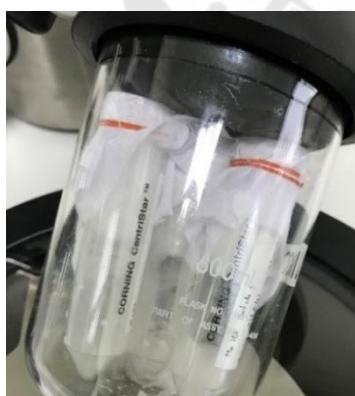
ฉ แสดงตัวอย่างสารละลาย
MeHA hydrogel หลัง



ช แสดงการ lyophilization MeHA hydrogel



ซ แสดงการ centrifuge
สารละลาย MeHA hydrogel
หลัง dialysis



ณ แสดงตัวอย่าง MeHA
hydrogel ในโหล
lyophilization



ญ แสดงตัวอย่าง MeHA
hydrogel หลัง
lyophilization

ภาพประกอบ 4 แสดงขั้นตอนการสังเคราะห์ MeHA hydrogel

2.การผสม blue light initiator

blue light initiator ได้แก่ ลิเทียมฟีนิลไดรเมทิลเบนโซอิลฟอสฟิเนต (lithium phenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphinate (LAP)) โดยอ้างอิงจากการศึกษาของ Wang G. และคณะ ในปี 2018 ที่ใช้ HA-furan ความเข้มข้น 150mg/L ที่มี degree of modification อยู่ที่ย้อยละ 68 ผสมกับสารละลาย LAP ความเข้มข้นเท่ากับ 15mg/L (43) โดยเมื่อนำมาคิดคำนวณเปรียบเทียบกับน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์และ degree of modification ของสารตั้งต้นในการวิจัยครั้งนี้แล้ว จะได้ความเข้มข้นของสารละลาย MeHA ที่ต้องใช้เท่ากับ 100mg/L ผสมกับสารละลาย LAP ความเข้มข้น 15mg/L เพื่อเตรียมทดสอบต่อไป โดยเครื่องฉายแสงสีฟ้าที่ใช้บ่มในการทดสอบนั้นมี light intensity $1,800 \text{ mW/cm}^2$ และความยาวคลื่น 480nm

3.การศึกษาระยะเวลาในการก่อตัวเป็นเจลของไฮโดรเจล

ระยะเวลาในการก่อตัวเป็นเจล คือ ระยะเวลาที่ใช้ในการเปลี่ยนแปลงจาก sol-phase ไปเป็น gel-phase โดยจะนำสารละลายไฮโดรเจลที่ผสมกับ blue light initiator ที่เตรียมใหม่ ๆ ลงในเอฟเฟนดอร์ฟที่เตรียมไว้ปริมาตร 500 ไมโครลิตร จากนั้นจึงทำการบ่มด้วยแสงสีฟ้าที่มีความยาวคลื่น 450-500nm ในแต่ละช่วงระยะเวลาที่ใช้ในการบ่มได้แก่ 30, 60, 90 และ 120 วินาที โดยการกำหนดระยะเวลาที่ใช้ในการบ่มนี้อ้างอิงมาจากการวิจัยก่อนหน้าซึ่งเน้นศึกษาถึงระยะเวลาในการใช้แสงสีฟ้าในการกระตุ้นกระบวนการพอลิเมอไรเซชัน โดยมีสารตั้งต้นเทียบเคียงกับการวิจัยครั้งนี้ ซึ่งงานวิจัยดังกล่าวให้ข้อสรุปว่าระยะเวลาที่ดีที่สุดสำหรับบ่มไฮโดรเจลด้วยแสงสีฟ้าอยู่ในช่วงระยะเวลา 30-60 วินาที (41),(43) ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้กำหนดช่วงระยะเวลาที่ใช้สำหรับงานวิจัยครั้งนี้ออกเป็น 4 ช่วงเวลาดังกล่าว โดยชุดวิจัยในแต่ละช่วงเวลาจะทำการทดสอบซ้ำช่วงระยะเวลาละ 3 ครั้ง (triplicate) โดยจะบ่มด้วยแสงสีฟ้าสามตำแหน่งโดยรอบเอฟเฟนดอร์ฟโดยที่ปลายของแหล่งกำเนิดแสงแนบไปกับเอฟเฟนดอร์ฟ หลังจากครบเวลาแล้วจะปล่อยเจลทิ้งไว้เป็นระยะเวลา 2 นาทีก่อนที่จะคว่ำเอฟเฟนดอร์ฟกลับหัวลง โดยเจลที่ได้สามารถต้านแรงโน้มถ่วงจากน้ำหนักของตัวเจลเองได้นานมากกว่า 30 วินาที จะถือว่าสารผสมนี้ก่อตัวเป็นเจลแล้ว

4.การศึกษาการพองตัวของไฮโดรเจล

เพื่อศึกษาความสามารถในการปลดปล่อยโปรตีนของไฮโดรเจล โดยใช้ไฮโดรเจลที่ก่อตัวเป็นเจลแล้วทั้ง 4 ช่วงเวลาได้แก่ 30, 60, 90 และ 120 วินาที ทิ้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไฮโดรเจลตัวอย่างละ 200 ไมโครลิตร ไปแช่ให้พองใน PBS ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ที่

อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทำซ้ำตามช่วงระยะเวลาที่ใช้ในการบ่มช่วงเวลาละ 3 ตัวอย่าง แล้วชั่งน้ำหนักเจลที่ช่วงเวลาต่างๆ ดังนี้ น้ำหนักก่อนแช่ PBS, น้ำหนักหลังจากแช่ PBS ไปแล้ว 5 นาที, 10 นาที, 20 นาที, 30 นาที, 1 ชั่วโมง, 2 ชั่วโมง, 4 ชั่วโมง, 6 ชั่วโมง, 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง จากนั้นนำน้ำหนักหลังแช่ PBS ตามช่วงเวลาต่างๆ ที่ชั่ง ลบด้วยน้ำหนักก่อนแช่ แล้วหารด้วยน้ำหนักก่อนแช่อีกทีจะได้เป็นสัดส่วนการพองตัวของไฮโดรเจลและนำมาหาค่าเฉลี่ยตามช่วงระยะเวลาที่ใช้ในการบ่มด้วยแสงสีฟ้า ส่วนไฮโดรเจลที่อิมมิด์ใน PBS 48 ชั่วโมง จะนำมากำจัดน้ำส่วนเกินออกด้วยวิธีการแช่แห้งแบบเยือกแข็ง แล้วนำไฮโดรแห้งมาชั่งน้ำหนักน้ำหนักอีกครั้ง น้ำหนักของไฮโดรเจลขณะพองตัวเต็มที่ 2 วัน แทนด้วย M_s น้ำหนักแห้งของไฮโดรเจลหลังจากอบแห้งแทนด้วย M_d แล้วนำมาคำนวณตามสมการ

$$\frac{(M_s - M_d) \times 100}{M_s}$$

จะได้เป็นค่าร้อยละของปริมาณน้ำในไฮโดรเจลหลังจากการพองตัว 2 วัน (water content) จากนั้นไปหาค่าอัตราส่วนการพองตัวของเจลโดยมวล (Mass swelling ratio : Q_m) โดยใช้สมการ

$$Q_m = M_s / M_d$$

และหาค่าอัตราส่วนการพองตัวของไฮโดรเจลโดยปริมาตร (volumetric based swelling ratio : Q_v) โดยใช้สมการ

$$Q_v = 1 + \frac{\rho_p}{\rho_s} (Q_m - 1)$$

เมื่อ ρ_p คือความหนาแน่นของกรดไฮยาลูโรนิก และ ρ_s คือความหนาแน่นของ PBS (Wieland; et al. 2007:233-241)

ซึ่งการศึกษาลักษณะการพองตัวของไฮโดรเจลนี้จะทำให้ทราบว่าไฮโดรเจลนั้นมี
ความสามารถในการกักเก็บน้ำมากแค่ไหน ซึ่งจะสอดคล้องกับความสามารถในการปลดปล่อย
สารสำคัญ

5. การศึกษาการสลายตัวของไฮโดรเจล

ไฮโดรเจลที่ก่อตัวเป็นเจลแล้วปริมาตร 40 ไมโครลิตร หลังบ่มด้วยแสงสีฟ้าทั้ง 4
ช่วงเวลาได้แก่ 30, 60, 90 และ 120 วินาที ช่วงเวลาละ 3 ตัวอย่าง ในจานเลี้ยงเชื้อ 24 หลุม รวม
ทั้งหมด 12 หลุม โดยอ้างอิงจากการศึกษาของ Maturavongsadit P. และคณะในปี 2016
ตัวอย่างดังกล่าวจะถูกย่อยในเอ็นไซม์ไฮยาลูโรนิเดส 100U ในสารละลาย PBS 400 ไมโครลิตร ที่
อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยจะเก็บสารละลายจากการทดลองทั้งหมดและเติมเอ็นไซม์ไฮยาลู
โรนิเดสในสารละลาย PBS ความเข้มข้นเท่าเดิมไปแทนที่ทุก 24 ชั่วโมง จนกว่าไฮโดรเจลจะ
ละลายหมด จากนั้นเก็บสารละลายดังกล่าวในอุณหภูมิ -20 °C จนกว่าจะนำไปทดสอบต่อไป การ
ทดสอบคาร์บาไฮลใช้เพื่อหาปริมาณกรดยูโรนิกที่ปลดปล่อยออกมาขณะไฮโดรเจลเกิดการ
สลายตัว โดยนำสารละลายที่เก็บมาได้ 50 ไมโครลิตร แบ่งใส่ลงในหลอดเอพเพนดอร์ฟตาม
ช่วงเวลาที่เก็บมา จากนั้นนำโซเดียมเตตระโบเรต (sodium tetraborate) ความเข้มข้น 25 มิลลิโม-
ลาร์ในกรดซัลฟูริกปริมาณ 200 ไมโครลิตร ใส่ในแต่ละหลอด และให้ความร้อนที่ 100 °C เป็นเวลา
10 นาที จากนั้นทิ้งให้เย็นตัวลงที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที เติม 0.125% คาร์บาไฮลในเอทา
นอลบริสุทธิ์ 50 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลอด และให้ความร้อนที่ 100 °C เป็นเวลาอีก 10 นาที
และทิ้งให้เย็นตัวลงที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นสารละลายจะถูกถ่ายลงในจาน
เลี้ยงเชื้อ 96 หลุม โดยแบ่งสารละลายจากแอพเพนดอร์ฟมาหลุมละ 100 ไมโครลิตร และถูกนำไป
อ่านค่าการดูดกลืนแสงในเครื่อง SpectraMax M2 Multi-Mode microplate reader (Molecular
Devices) ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร โดยนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาหาค่าเฉลี่ยและ
บันทึกเป็นกราฟ

6. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายในโครงสร้างของไฮโดรเจล

ศึกษาผ่านกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด เพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐาน
วิทยาภายในโครงสร้างของไฮโดรเจล โดยมีวิธีการคือนำไฮโดรเจลที่ผ่านการบ่มด้วยแสงสีฟ้าจน
เป็นเจลทั้ง 4 ช่วงเวลาได้แก่ 30, 60, 90 และ 120 วินาที ทิ้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปแช่
ในไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 30 นาที และนำไปเก็บไว้ในตู้ -80 องศาเซลเซียสเพื่อเตรียมนำไปแช่

แห้งแบบเยือกแข็งเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ก่อนนำมาตัดตามแนวขวาง (cross section) เพื่อดูลักษณะโครงสร้างภายใน และตามแนวยาว (longitudinal section) เพื่อดูลักษณะพื้นผิวภายนอก แล้วไปยึดกับแท่งเหล็กที่ปิดด้วยเทปคาร์บอน จากนั้นนำชิ้นตัวอย่างไปเคลือบด้วยทอง โดยจะทำการพื้นที่ของชิ้นตัวอย่างเพื่อศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของตัวอย่างที่ศึกษา

การเก็บรวบรวมข้อมูล

1. ทำการทดลองซ้ำอย่างน้อย 3 ครั้ง เพื่อแสดงถึงความสามารถในการทำซ้ำได้ (reproducibility) และความถูกต้องในการแปลผลการทดลอง
2. ประเมินระยะเวลาในการก่อตัวเป็นเจลในทุกกลุ่มตัวอย่างที่ผ่านการบ่มด้วยแสงสีฟ้าที่มีความยาวคลื่น 450-500nm ในช่วงระยะเวลาที่ต่างกัน ได้แก่ 30, 60, 90 และ 120 วินาที จากการทำ inverted tube test
3. ประเมินการพองตัวของไฮโดรเจลที่ผ่านการบ่มด้วยแสงสีฟ้าในช่วงระยะเวลาที่ต่างกัน เพื่อศึกษาความสามารถในการปลดปล่อยโปรตีนของไฮโดรเจล
4. ประเมินการสลายตัวของไฮโดรเจลผ่านการบ่มด้วยแสงสีฟ้าในช่วงระยะเวลาที่ต่างกัน
5. สังเกตและบรรยายลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไฮโดรเจลที่ศึกษาผ่านกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราดจากกลุ่มตัวอย่างที่นำมาสุ่มพื้นที่ของชิ้นตัวอย่าง

สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

- สถิติแบบพรรณนา เพื่อบรรยายผลการทดสอบการก่อตัวเป็นเจลและลักษณะทางสัณฐานวิทยา รวมถึงบรรยายแนวโน้มผลการทดสอบการพองตัวและสลายตัวของไฮโดรเจล

บทที่ 4

ผลการดำเนินงานวิจัย

การนำเสนอผลการดำเนินงานวิจัย

ผลการวิจัยครั้งนี้ ได้นำเสนอตามลำดับหัวข้อดังต่อไปนี้

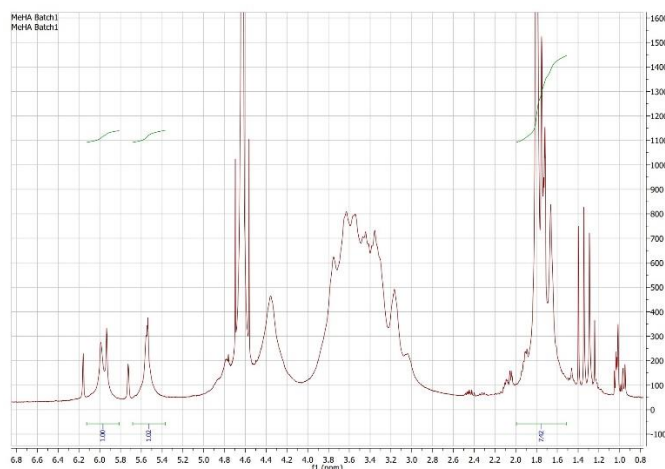
- ตอนที่ 1 การสังเคราะห์ไฮโดรเจลจากกรดไฮยาโลโรนิกและผสม blue light initiator
- ตอนที่ 2 ระยะเวลาในการก่อตัวเป็นเจลของไฮโดรเจล
- ตอนที่ 3 การพองตัวของไฮโดรเจล
- ตอนที่ 4 การสลายตัวของไฮโดรเจล
- ตอนที่ 5 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายในโครงสร้างของไฮโดรเจล

ผลการดำเนินงานวิจัย

ตอนที่ 1 การสังเคราะห์ไฮโดรเจลจากกรดไฮยาโลโรนิกและผสม blue light initiator

จากการศึกษาของ Maturavongsadit P. และคณะในปี 2016 ที่ศึกษาผลของโครงสร้างที่แตกต่างกันของ crosslinker ที่มีต่อผลต่อไฮโดรเจลจากกรดไฮยาโลโรนิกที่ผ่านการปรับปรุงโครงสร้างร่วมกับ methacrylate anhydride ก่อให้เกิดเป็น MeHA hydrogel พบว่า การใช้ crosslinker ชนิด dithiothreitol (DTT) ผ่านปฏิกิริยา click reaction มีระยะเวลาในการก่อตัวเป็นเจลเร็วที่สุดเมื่อเทียบกับการ-crosslink ด้วยสารอื่น ๆ โดยใช้ระยะเวลาในการก่อตัวเป็นเจลประมาณ 60 นาที และ MeHA ที่ใช้ในการทดลองมี degree of modification ประมาณร้อยละ 40 โดยวัดจากการทดสอบด้วยเทคนิค H-NMR spectroscopy (ภาพประกอบ 5)

ในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยได้สังเคราะห์ MeHA hydrogel ตามขั้นตอนอ้างอิงจากการศึกษาของ Trakiattikul N. ในปี 2018 ทั้งหมด 6 ครั้ง แต่ละครั้งวัด degree of modification ได้ดังแสดงในตาราง 1



ภาพประกอบ 5 แสดงตัวอย่างผลที่ได้จากการวัด degree of modification ด้วยเทคนิค $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy โดยคำนวณจากการวัดพื้นที่ใต้กราฟด้วยโปรแกรม MestReNova6

ตาราง 1 แสดง degree of modification ของ MeHA hydrogel ทั้งหมดในการศึกษาครั้งนี้

Batch	Degree of modification
1	69
2	36
3	42
4	46
5	71
6	76

จากนั้นผู้วิจัยได้นำเฉพาะ MeHA hydrogel ที่มี degree of modification มากกว่าร้อยละ 40 มาทดสอบต่อด้วยการนำมาผสมกับ blue light initiator ได้แก่ ลิเทียมฟีนิลไตรเมทิลเบนโซอิลฟอสฟิเนต (lithium phenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphinate (LAP)) โดยจากการศึกษาของ Wang G. และคณะในปี 2018 ที่ใช้ HA-furan ความเข้มข้น 150mg/L ที่มี degree of modification อยู่ที่ร้อยละ 68 ผสมกับสารละลาย LAP ความเข้มข้นเท่ากับ 15mg/L โดยเมื่อนำมาคิดคำนวณเปรียบเทียบกับน้ำหนักโมเลกุลพอลิเมอร์ของสารตั้งต้นในการวิจัยครั้งนี้แล้ว จะได้ความเข้มข้นของสารละลาย MeHA ที่ต้องใช้เท่ากับ 100mg/L เพื่อผสมกับสารละลาย LAP ความเข้มข้น 15mg/L

ตอนที่ 2 ระยะเวลาในการก่อตัวเป็นเจลของไฮโดรเจล

จากการศึกษาระยะเวลาในการก่อตัวเป็นเจลด้วยการทดสอบ inverted tube test โดยการนำสารละลาย MeHA ความเข้มข้น 100mg/L ผสมกับสารละลาย LAP ความเข้มข้น 15 mg/L แล้วแบ่งใส่ลงในหลอดเอพเพนดอร์ฟขนาด 1 มิลลิลิตร หลอดละ 500 ไมโครลิตร พบว่า MeHA polymer ที่ป้อนด้วยแสงสีฟ้าทั้ง 4 ช่วงระยะเวลาที่ใช้ในการบ่มได้แก่ 30, 60, 90 และ 120 วินาที ช่วงระยะเวลาละ 3 ตัวอย่าง มีการก่อตัวเป็นเจลที่สมบูรณ์ทั้ง 4 ช่วงระยะเวลา กล่าวคือเมื่อทำการคว่ำเอพเพนดอร์ฟลง ทุกกลุ่มตัวอย่างมีการก่อตัวเป็นเจลโดยไม่มีส่วนของเหลวเหลืออยู่ และสามารถต้านแรงโน้มถ่วงจากน้ำหนักของตัวเจลเองได้นานมากกว่า 30 วินาทีโดยไม่มีการไหลลงมาตามแรงโน้มถ่วง (ภาพประกอบ 6)



ก



ข



ค

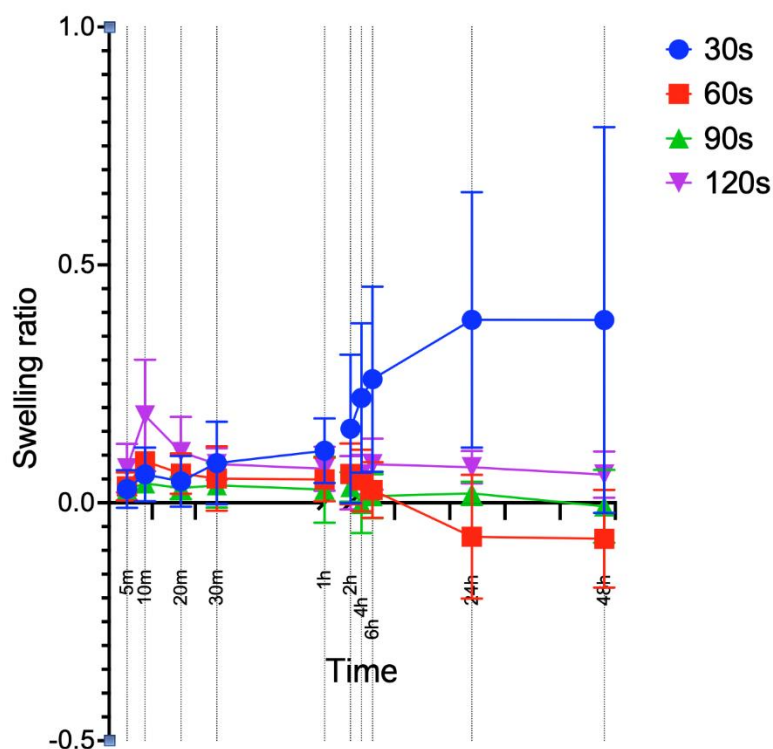


ง

ภาพประกอบ 6 แสดงผลการทดสอบ inverted tube test ของ MeHA polymer ทั้ง 4 กลุ่มทดสอบ (ก) บ่มด้วยแสงสีฟ้า 30 วินาที (ข) บ่มด้วยแสงสีฟ้า 60 วินาที (ค) บ่มด้วยแสงสีฟ้า 90 วินาที (ง) บ่มด้วยแสงสีฟ้า 120 วินาที

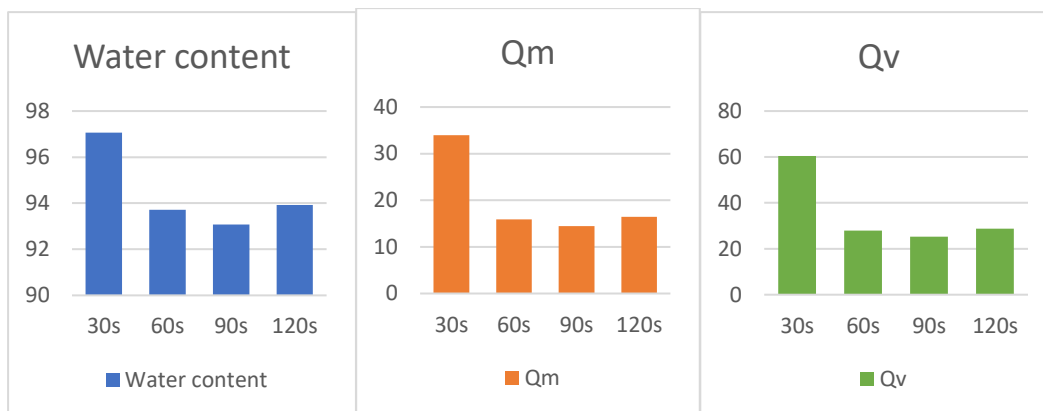
ตอนที่ 3 การพองตัวของไฮโดรเจล

จากการศึกษาการพองตัวของ MeHA hydrogel พบว่า ไฮโดรเจลกลุ่มที่บ่มด้วยแสงสีฟ้าเป็นระยะเวลา 60, 90 และ 120 วินาที มีน้ำหนักเจลเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 10 นาทีแรก หลังจากนั้นน้ำหนักจะค่อยๆ ลดลงอย่างต่อเนื่องและเริ่มคงที่เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมงจนถึง 48 ชั่วโมง ยกเว้นไฮโดรเจลกลุ่มที่บ่มด้วยแสงสีฟ้าเป็นระยะเวลา 30 วินาที จะมีน้ำหนักเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 10 นาทีแรกเช่นกัน หลังจากนั้นน้ำหนักจะลดลงเล็กน้อยแล้วเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจนถึง 24 ชั่วโมงก่อนที่จะเริ่มคงที่จนถึง 48 ชั่วโมง (ภาพประกอบ 7)

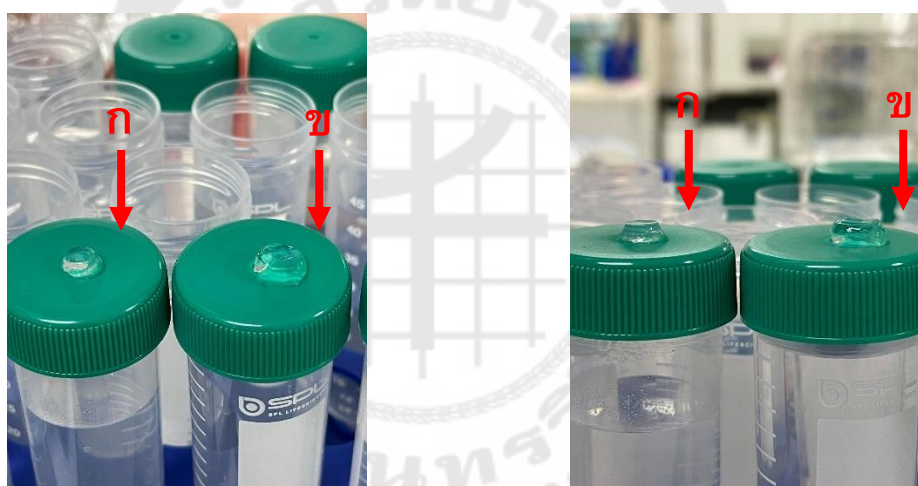


ภาพประกอบ 7 แสดงสัดส่วนการพองตัวของ MeHA hydrogel ที่บ่มด้วยแสงสีฟ้าเป็นระยะเวลา 30, 60, 90 และ 120 วินาที ตามช่วงระยะเวลาที่ซิงก์น้ำหนักหลังแช่ PBS ในหน่วยชั่วโมง

ภาพประกอบ 8 แสดงปริมาณน้ำภายในเจล, อัตราส่วนการพองตัวเชิงมวล (Q_m) และ อัตราส่วนการพองตัวเชิงปริมาตร (Q_v) พบว่า MeHA ไฮโดรเจลมีความสามารถในการดูดน้ำเข้าสู่เจลได้มากกว่าร้อยละ 90 ในทุกช่วงระยะเวลาที่ใช้ในการบ่ม อัตราส่วนการพองตัวเชิงมวล และอัตราส่วนการพองตัวเชิงปริมาตรเป็นดังนี้ บ่มด้วยแสง 30 วินาที ; $Q_m \sim 33.98$, $Q_v \sim 60.36$, บ่มด้วยแสง 60 วินาที ; $Q_m \sim 15.92$, $Q_v \sim 27.86$, บ่มด้วยแสง 90 วินาที ; $Q_m \sim 14.45$, $Q_v \sim 25.21$ และบ่มด้วยแสง 120 วินาที ; $Q_m \sim 16.44$, $Q_v \sim 28.79$ สรุปได้ว่า MeHA ไฮโดรเจลที่บ่มด้วยแสงสีฟ้าเป็นระยะเวลา 30 วินาทีที่มีความสามารถในการกักเก็บน้ำมากที่สุด คือประมาณร้อยละ 97 และมีความสามารถในการพองตัวมากที่สุดทั้งเชิงมวลและเชิงปริมาตร รวมถึงขนาดเจลที่ใหญ่ขึ้นแตกต่างอย่างชัดเจนจากตอนก่อนแช่ PBS (ภาพประกอบ 9)



ภาพประกอบ 8 แสดงปริมาณน้ำ, อัตราส่วนการพองตัวของเซลล์ และ อัตราส่วนการพองตัวของไฮโดรเจล



ภาพประกอบ 9 แสดงขนาดที่แตกต่างกันของไฮโดรเจลที่ผ่านการแช่ PBS เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดย (ก) แสดงเจลที่บ่มด้วยแสงสีฟ้าเป็นเวลา 60 วินาทีและ (ข) แสดงเจลที่บ่มด้วยแสงสีฟ้าเป็นเวลา 30 วินาที

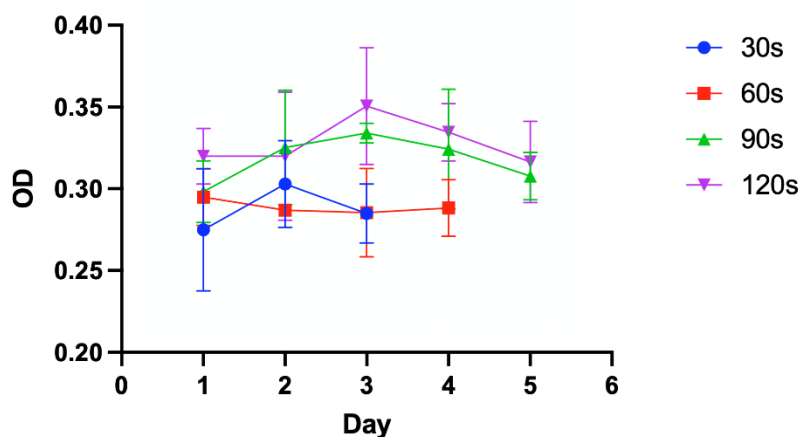
ตอนที่ 4 การสลายตัวของไฮโดรเจล

จากผลการทดลองพบว่า ไฮโดรเจลที่บ่มด้วยแสงสีฟ้าเป็นระยะเวลา 30, 60, 90 และ 120 วินาที จะสลายหมดใน 3, 4, 5 และ 5 วันตามลำดับ โดยกลุ่มที่บ่มด้วยแสงสีฟ้าเป็นระยะเวลา 90 และ 120 วินาที มีปริมาณกรดยูโรนิกที่สลายออกมาใกล้เคียงกัน กล่าวคือสามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยอยู่ในช่วงประมาณ 0.300-0.350 และสลายตัวหมดช้าที่สุดโดย

สลายตัวหมดใน 5 วัน ส่วนกลุ่มที่บ่มด้วยแสงสีฟ้าเป็นระยะเวลา 60 วินาที มีปริมาณกรดยูโรนิกที่สลายตัวต่อวันในอัตราที่คงที่ที่สุด โดยจากการวัดค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยในช่วง 0.285-0.295 และสลายตัวหมดใน 4 วัน สุดท้ายได้แก่กลุ่มที่บ่มด้วยแสงเป็นระยะเวลา 30 วินาที เป็นกลุ่มที่สลายตัวหมดเร็วที่สุดคือสลายตัวหมดใน 3 วันและมีค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยในช่วง 0.275-0.300 ดังแสดงในตาราง 2 และ ภาพประกอบ 10

ตาราง 2 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้จากสารละลายไฮยาโลูโรนิกเดส 100U ตามช่วงระยะเวลาที่ใช้ในการบ่มด้วยแสงสีฟ้า

ช่วงระยะเวลาที่ใช้ในการบ่มด้วยแสงสีฟ้า (วินาที)	ระยะเวลาในการเก็บสารละลาย (วัน)	ค่าการดูดกลืนแสง (OD)
30	1	0.275±0.037
	2	0.303±0.027
	3	0.285±0.018
60	1	0.295±0.017
	2	0.287±0.002
	3	0.285±0.027
	4	0.288±0.017
90	1	0.298±0.019
	2	0.325±0.035
	3	0.334±0.006
	4	0.324±0.037
	5	0.308±0.015
120	1	0.320±0.017
	2	0.320±0.039
	3	0.351±0.036
	4	0.335±0.018
	5	0.316±0.025



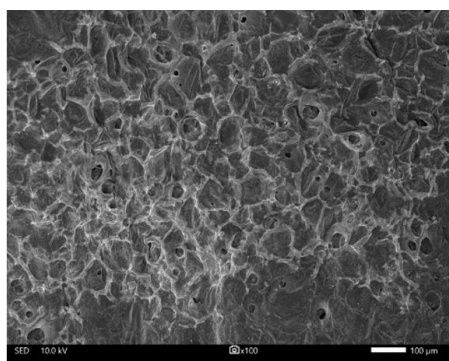
ภาพประกอบ 10 แสดงแนวโน้มการสลายตัวของไฮโดรเจลจากค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้จากสารละลายไฮยาโลูโรนิก 100U ตามช่วงระยะเวลาที่ใช้ในการบ่มด้วยแสงสีฟ้า

ตอนที่ 5 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายในโครงสร้างของไฮโดรเจล

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายในโครงสร้างของไฮโดรเจลผ่านกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด พบว่าที่พื้นผิวของ MeHA hydrogel ที่บ่มด้วยแสงสีฟ้าช่วงระยะเวลาที่นานกว่าจะมีพื้นผิวที่เป็นเนื้อเดียวกัน (homogeneity) มากกว่า ในส่วนของโครงสร้างภายในของไฮโดรเจลพบว่าไฮโดรเจลที่บ่มด้วยแสงสีฟ้าในช่วงระยะเวลา 90 และ 120 วินาที มีลักษณะเป็นรูพรุน (porous formation) ที่ชัดเจน แตกต่างกับไฮโดรเจลที่บ่มด้วยแสงสีฟ้าช่วงระยะเวลา 30 และ 60 วินาที ที่มีลักษณะเป็นแผ่น (sheet) และเมื่อดูในส่วนของโครงสร้างภายในร่วมกับบริเวณขอบของไฮโดรเจลพบว่ามีลักษณะไปในทิศทางเดียวกัน นั่นคือไฮโดรเจลที่บ่มด้วยแสงสีฟ้าในช่วงระยะเวลา 90 และ 120 วินาที มีโครงสร้างภายในเป็นรูพรุนโดยบริเวณขอบจะมีความหนาแน่นของโครงสร้างมากกว่าบริเวณภายใน ส่วนไฮโดรเจลที่บ่มด้วยแสงสีฟ้าในช่วงระยะเวลา 30 และ 60 วินาทีมีโครงสร้างภายในที่ไม่ชัดเจนแต่ยังสังเกตได้ว่าโครงสร้างบริเวณขอบมีความหนาแน่นมากกว่าภายในเช่นกัน (ภาพประกอบ 11)

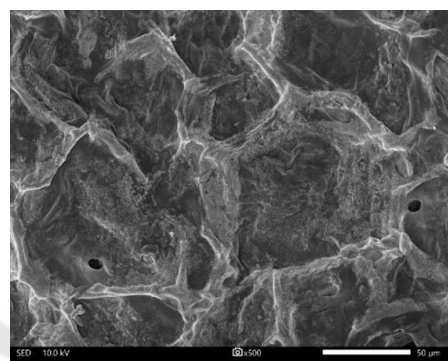
โดยจากการวัดความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางรูพรุนของ MeHA hydrogel กลุ่มที่บ่มด้วยแสงสีฟ้าเป็นระยะเวลา 90 และ 120 วินาทีผ่านโปรแกรม ImageJ พบว่าไฮโดรเจลทั้ง 2 กลุ่มมีความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางรูพรุนเฉลี่ยอยู่ที่ประมาณ 105 ไมครอน (ภาพประกอบ 12)

ภาพส่วนพื้นผิว



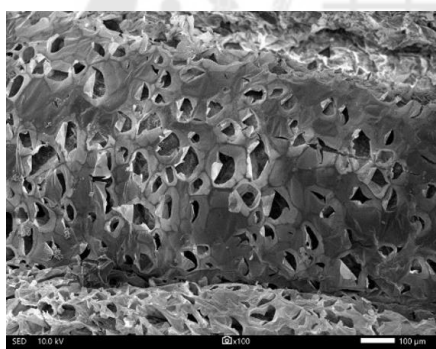
30s, surface 100X

ภาพพื้นผิวกำลังขยาย 100 เท่า
กลุ่มที่ป่นด้วยแสง 30 วินาที



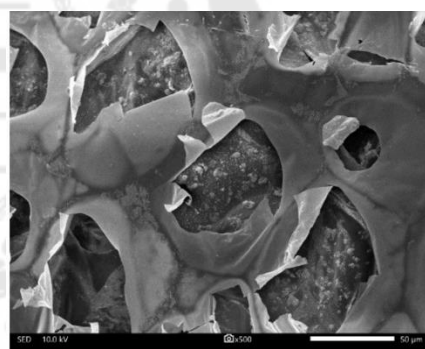
30s, surface 500X

ภาพพื้นผิวกำลังขยาย 500 เท่า
กลุ่มที่ป่นด้วยแสง 30 วินาที



60s, surface 100X

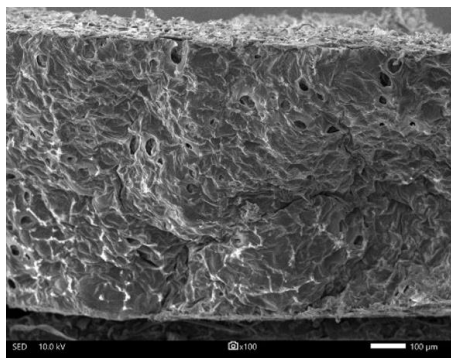
ภาพพื้นผิวกำลังขยาย 100 เท่า
กลุ่มที่ป่นด้วยแสง 60 วินาที



60s, surface 500X

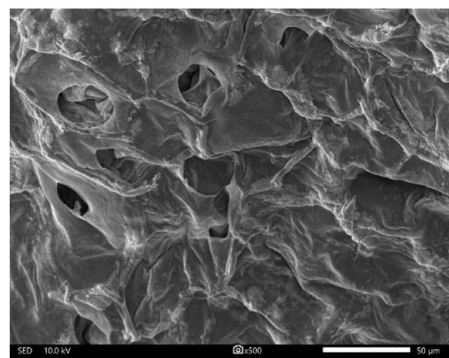
ภาพพื้นผิวกำลังขยาย 500 เท่า
กลุ่มที่ป่นด้วยแสง 60 วินาที

ภาพส่วนพื้นผิว (ต่อ)



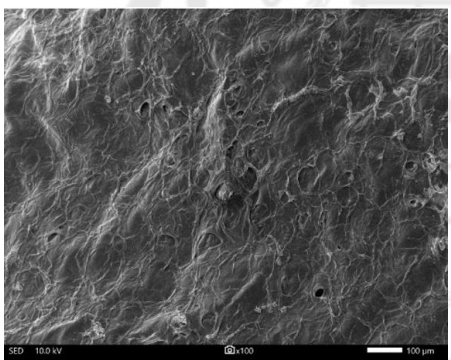
90s, surface 100X

ภาพพื้นผิวกำลังขยาย 100 เท่า
กลุ่มที่ป่นด้วยแสง 90 วินาที



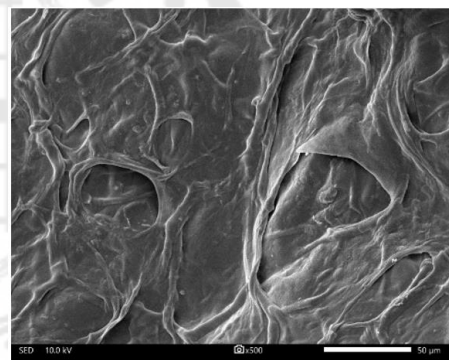
90s, surface 500X

ภาพพื้นผิวกำลังขยาย 500 เท่า
กลุ่มที่ป่นด้วยแสง 90 วินาที



120s, surface 100X

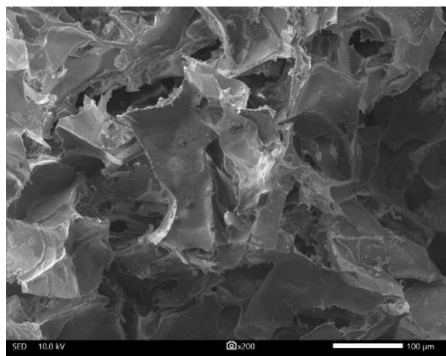
ภาพพื้นผิวกำลังขยาย 100 เท่า
กลุ่มที่ป่นด้วยแสง 120 วินาที



120s, surface 500X

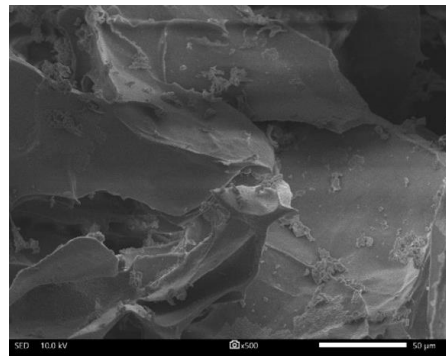
ภาพพื้นผิวกำลังขยาย 500 เท่า
กลุ่มที่ป่นด้วยแสง 120 วินาที

ภาพตัดขวาง



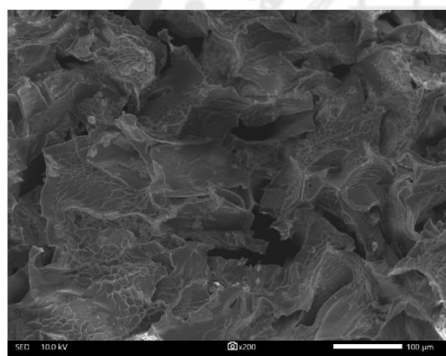
30s, internal cross section 200X

ภาพตัดขวางกำลังขยาย 200 เท่า
กลุ่มที่ป้อนด้วยแสง 30 วินาที



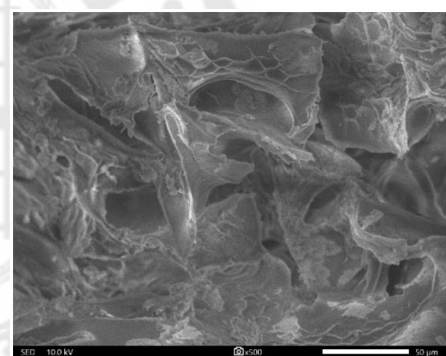
30s, internal cross section 500X

ภาพตัดขวางกำลังขยาย 500 เท่า
กลุ่มที่ป้อนด้วยแสง 30 วินาที



60s, internal cross section 200X

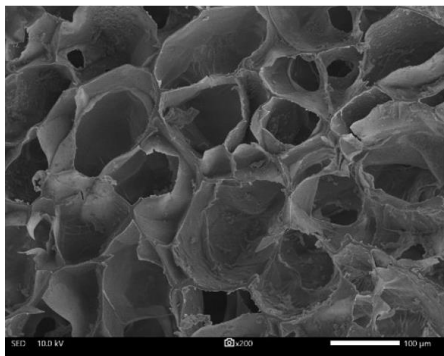
ภาพตัดขวางกำลังขยาย 200 เท่า
กลุ่มที่ป้อนด้วยแสง 60 วินาที



60s, internal cross section 500X

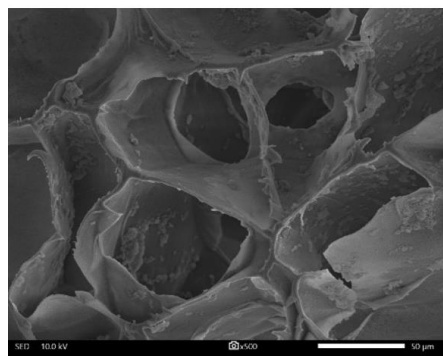
ภาพตัดขวางกำลังขยาย 500 เท่า
กลุ่มที่ป้อนด้วยแสง 60 วินาที

ภาพตัดขวาง (ต่อ)



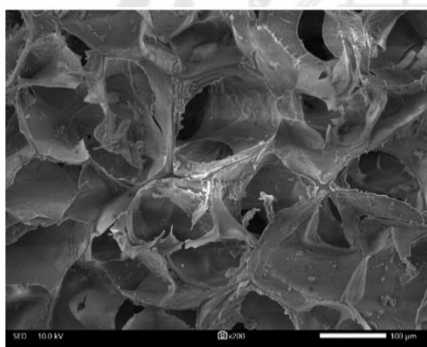
90s, internal cross section 200X

ภาพตัดขวางกำลังขยาย 200 เท่า
กลุ่มที่ป้อนด้วยแสง 90 วินาที



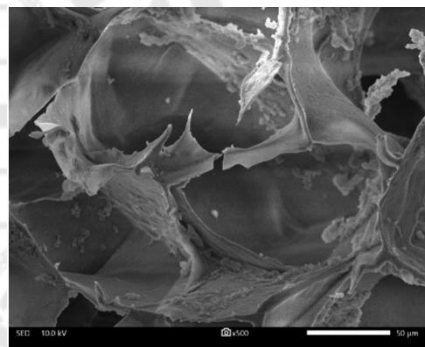
90s, internal cross section 500X

ภาพตัดขวางกำลังขยาย 500 เท่า
กลุ่มที่ป้อนด้วยแสง 90 วินาที



120s, internal cross section 200X

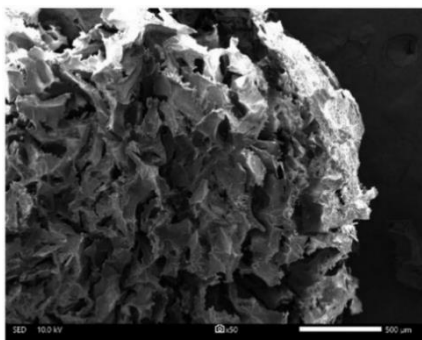
ภาพตัดขวางกำลังขยาย 200 เท่า
กลุ่มที่ป้อนด้วยแสง 120 วินาที



120s, internal cross section 500X

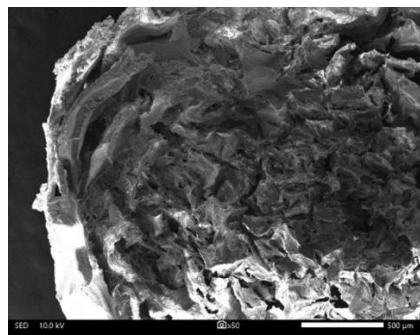
ภาพตัดขวางกำลังขยาย 500 เท่า
กลุ่มที่ป้อนด้วยแสง 120 วินาที

ภาพตัดขวางส่วนขอบ



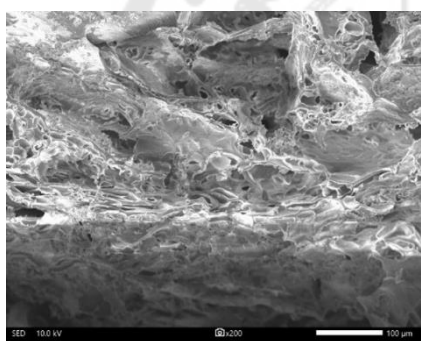
30s, internal-surface cross section 50X

ภาพตัดขวางส่วนขอบกำลังขยาย 50 เท่า
กลุ่มที่ป่นด้วยแสง 30 วินาที



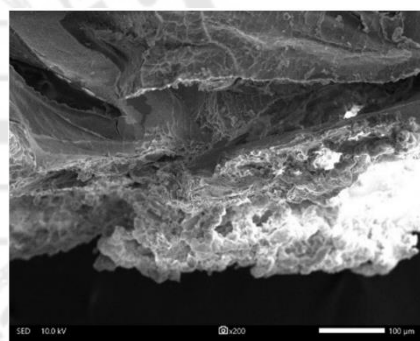
60s, internal-surface cross section 50X

ภาพตัดขวางส่วนขอบกำลังขยาย 50 เท่า
กลุ่มที่ป่นด้วยแสง 60 วินาที



30s, internal-surface cross section 200X

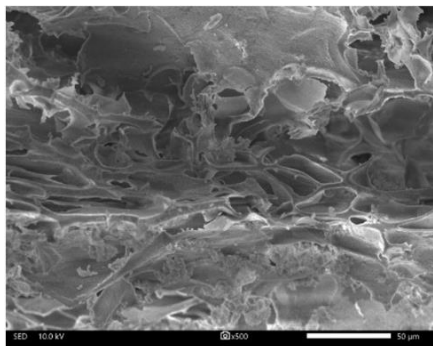
ภาพตัดขวางส่วนขอบกำลังขยาย 200 เท่า
กลุ่มที่ป่นด้วยแสง 30 วินาที



60s, internal-surface cross section 200X

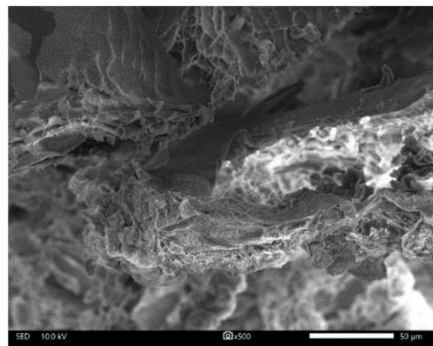
ภาพตัดขวางส่วนขอบกำลังขยาย 200 เท่า
กลุ่มที่ป่นด้วยแสง 60 วินาที

ภาพตัดขวางส่วนขอบ (ต่อ)



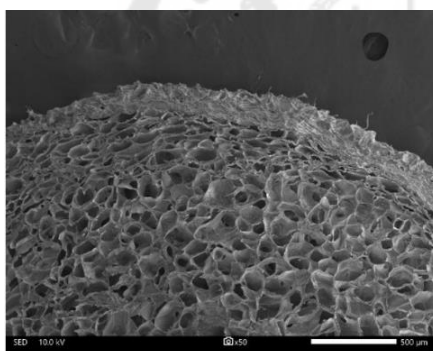
30s, internal-surface cross section 500X

ภาพตัดขวางส่วนขอบกำลังขยาย 500 เท่า
กลุ่มที่ป่นด้วยแสง 30 วินาที



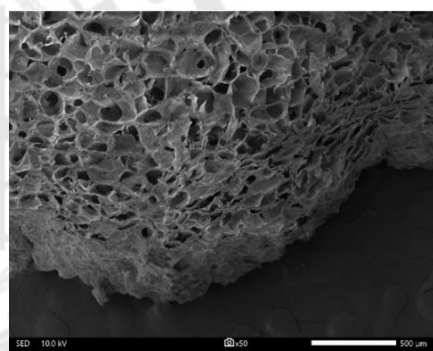
60s, internal-surface cross section 500X

ภาพตัดขวางส่วนขอบกำลังขยาย 500 เท่า
กลุ่มที่ป่นด้วยแสง 60 วินาที



90s, internal-surface cross section 50X

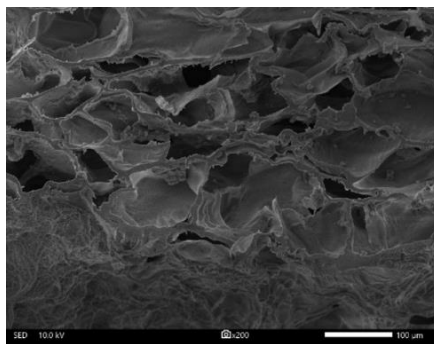
ภาพตัดขวางส่วนขอบกำลังขยาย 50 เท่า
กลุ่มที่ป่นด้วยแสง 90 วินาที



120s, internal-surface cross section 50X

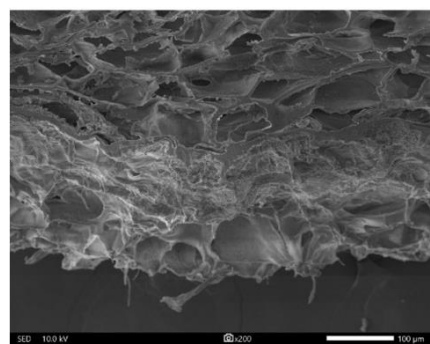
ภาพตัดขวางส่วนขอบกำลังขยาย 50 เท่า
กลุ่มที่ป่นด้วยแสง 120 วินาที

ภาพตัดขวางส่วนขอบ (ต่อ)



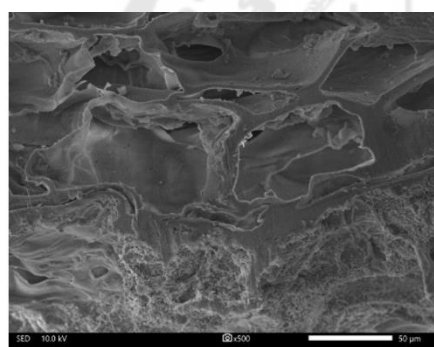
90s, internal-surface cross section 200X

ภาพตัดขวางส่วนขอบกำลังขยาย 200 เท่า
กลุ่มที่ป่นด้วยแสง 90 วินาที



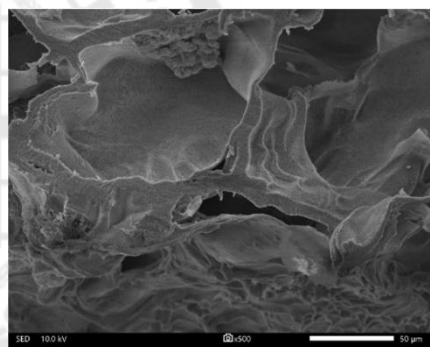
120s, internal-surface cross section 200X

ภาพตัดขวางส่วนขอบกำลังขยาย 200 เท่า
กลุ่มที่ป่นด้วยแสง 120 วินาที



90s, internal-surface cross section 500X

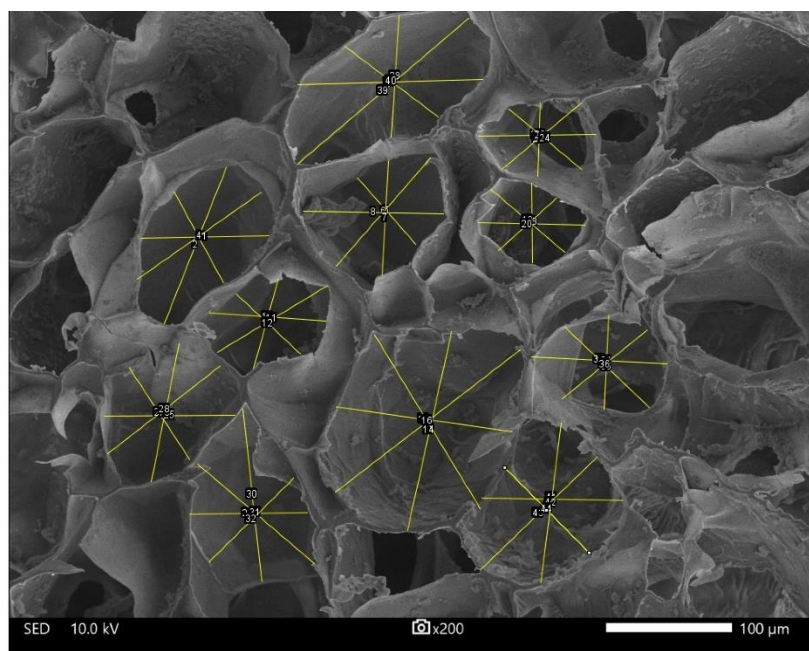
ภาพตัดขวางส่วนขอบกำลังขยาย 500 เท่า
กลุ่มที่ป่นด้วยแสง 90 วินาที



120s, internal-surface cross section 500X

ภาพตัดขวางส่วนขอบกำลังขยาย 500 เท่า
กลุ่มที่ป่นด้วยแสง 120 วินาที

ภาพประกอบ 11 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายในโครงสร้างของไฮโดรเจล



ภาพประกอบ 12 แสดงตัวอย่างการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางรูพรุนของไฮโดรเจล
ด้วยโปรแกรม ImageJ

บทที่ 5

อภิปรายผล ข้อเสนอแนะ และ สรุปผลการวิจัย

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบ MeHA ไฮโดรเจลที่มีการพอลิเมอไรเซชันจากการบ่มด้วยแสงสีฟ้าในช่วงระยะเวลาที่แตกต่างกันเพื่อหาระยะเวลาในการก่อตัวเป็นเจลที่เหมาะสม และ ศึกษาความแตกต่างของคุณสมบัติทางกายภาพรวมถึงลักษณะพื้นฐานวิทยาภายในโครงสร้างของไฮโดรเจลที่เหมาะสมกับงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อแข็งเพื่อสามารถนำมาใช้ได้อย่างเหมาะสมทางคลินิกต่อไป

การสังเคราะห์ไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกและผสม blue light initiator ในการวิจัยครั้งนี้ พบว่าผลการสังเคราะห์ไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกที่นำมาปรับปรุงโครงสร้างร่วมกับ methacrylate anhydride ก่อให้เกิดเป็น MeHA hydrogel ส่งผลให้เกิดการปรับปรุงโครงสร้าง (degree of modification) ตั้งแต่ร้อยละ 36 ถึง 76 ซึ่งเมื่อนำมาละลายใน PBS ก่อให้เกิดเป็นสารละลาย MeHA ที่มีความข้นหนืดและเหมาะสมในการนำไปผสมกับสารละลาย LAP ที่ใช้เป็นสารกระตุ้นในการครอสลิงค์ให้เกิดการพอลิเมอไรเซชันจากการบ่มด้วยแสงสีฟ้า สอดคล้องกับการศึกษาของ Maturavongsadit P. และคณะในปี 2016 ที่ใช้ MeHA hydrogel ที่มี degree of modification เฉลี่ยที่ร้อยละ 40 ก่อนนำไปละลายใน PBS โดยกำหนดความเข้มข้นของสารละลายที่ใช้เท่ากับ 3% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เช่นเดียวกันกับการศึกษาของ Trakiattikul N. และคณะในปี 2018 ก็ได้แนะนำให้ใช้สารละลาย MeHA ที่ความเข้มข้นนี้เช่นกัน และจากการศึกษาของ Wang G. และคณะในปี 2018 ที่ศึกษาไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกในรูปแบบฉีดที่ผ่านการพอลิเมอไรเซชันจากการบ่มด้วยแสงโดยใช้ LAP เป็น light initiator ร่วมกับการปฏิกิริยา thermal-induced Diels-Alder reaction ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน พบว่าไฮโดรเจลสามารถพอลิเมอไรเซชันก่อตัวเป็นเจลได้ภายในระยะเวลาเพียง 30 วินาที โดยผลการทดลองของงานวิจัยครั้งนี้ให้ผลไปในทิศทางเดียวกัน กล่าวคือ MeHA พอลิเมอร์ในการทดลองครั้งนี้สามารถก่อตัวเป็นเจลได้อย่างรวดเร็วตั้งแต่ 30 วินาทีแรกเช่นกัน

สำหรับระยะเวลาในการก่อตัวเป็นเจลของไฮโดรเจล จากการศึกษาระยะเวลาในการก่อตัวเป็นเจลด้วยการทดสอบ inverted tube test โดยการนำสารละลาย MeHA ความเข้มข้น 100mg/L ผสมกับสารละลาย LAP ความเข้มข้น 15 mg/L แล้วบ่มด้วยแสงสีฟ้าทั้ง 4 ช่วงระยะเวลาที่ใช้ในการบ่มได้แก่ 30, 60, 90 และ 120 วินาที พบว่าพอลิเมอร์มีการก่อตัวเป็นเจลที่สมบูรณ์ทั้ง 4 ช่วงระยะเวลาที่ใช้ในการบ่ม กล่าวคือเมื่อทำการคว่ำเอพเพนดอร์ฟลง ทุกกลุ่มตัวอย่างมีการก่อตัวเป็นเจลโดยไม่มีส่วนของเหลวเหลืออยู่และสามารถต้านแรงโน้มถ่วงจาก

น้ำหนักของตัวเจลเองได้นานมากกว่า 30 วินาทีโดยไม่มีการตกลงมา จะเห็นได้ว่าการครอสลิงค์ให้เกิดการพอลิเมอไรเซชันจากการบ่มด้วยแสงสามารถทำให้พอลิเมอร์ก่อตัวเป็นเจลได้อย่างรวดเร็ว เมื่อเทียบกับการครอสลิงค์ด้วยสารเคมี (chemical crosslinking) อ้างอิงจากการศึกษาของ Oryan A. และคณะในปี 2018 กล่าวว่า chemical crosslinking เป็นวิธีการที่ใช้กันมากที่สุดใน การปรับปรุงโครงสร้างของพอลิเมอร์ชนิดต่างๆรวมถึงไฮโดรเจลที่ใช้ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อแข็ง โดย chemical crosslinking มีข้อดีหลายประการ เช่น สารบางตัวเป็นพิษต่อเซลล์ จำเป็นต้อง มีการล้างสารกระตุ้นออกด้วยสารละลายจำเพาะหลังการครอสลิงค์ หรือ มีระดับการครอสลิงค์ (degree of crosslinking) ที่ต่ำ รวมถึงระยะเวลาในการพอลิเมอไรเซชันที่นาน เป็นต้น

สำหรับ MeHA ไฮโดรเจนนั้นหากเปรียบเทียบกับการศึกษาอื่นๆ ก่อนหน้าที่มีการใช้ chemical crosslinking ในการปรับปรุงโครงสร้าง จากการศึกษาของ Trombino S. และคณะในปี 2019 พบว่าการศึกษาส่วนใหญ่มีการใช้ปฏิกิริยา click reaction ซึ่งในปัจจุบันเป็นปฏิกิริยาเคมีที่ ได้รับความนิยมในการครอสลิงค์ไฮโดรเจลเนื่องจากมีความจำเพาะสูงและมีเงื่อนไขในการ เกิดปฏิกิริยาน้อย โดยมีหลายการศึกษา (Maturavongsadit P. และคณะในปี 2016, Trakiattikul N. และคณะในปี 2018, Areevijit K. และคณะในปี 2019) ที่ศึกษา MeHA ไฮโดรเจลที่มีการครอส ลิงค์ด้วย DTT ผ่านปฏิกิริยา click reaction นี้ พบว่ามีระยะเวลาในการก่อตัวเป็นเจลของไฮโดร เจลอยู่ที่ประมาณ 30 – 60 นาที ซึ่งเมื่อเทียบกับการครอสลิงค์ให้เกิดการพอลิเมอไรเซชันจากการ บ่มด้วยแสงนั้น การบ่มด้วยแสงสามารถทำให้พอลิเมอร์ก่อตัวเป็นเจลได้อย่างรวดเร็วกว่ามาก โดย นอกจากผลการศึกษาของ Wang G. และคณะในปี 2018 ที่กล่าวมาก่อนหน้านี้แล้ว ยังมีอีกหลาย การศึกษาที่แนะนำการใช้ LAP เป็นสารกระตุ้นให้เกิดการครอสลิงค์ของพอลิเมอร์ ยกตัวอย่าง การศึกษาของ Fairbanks B. และคณะในปี 2009 ได้ใช้ LAP เป็น light initiator ในการพอลิเมอไรเซชันไดอะคริเลตพอลิเอทิลีนไกลคอล (diacrylated polyethyleneglycol; PEGDA) ไฮโดรเจล พบว่า LAP มีคุณสมบัติการละลายน้ำที่ดีและในการพอลิเมอไรเซชัน PEGDA ไฮโดรเจลจากการ บ่มด้วยแสงที่มีความยาวคลื่น 365nm พบว่ามีอัตราการพอลิเมอไรเซชันของไฮโดรเจลที่รวดเร็ว เช่นกัน และหากเมื่อพิจารณาเพียงปัจจัยในส่วนขอระยะเวลาที่ใช้ในการบ่ม ซึ่งระยะเวลาในการ ก่อตัวเป็นเจลที่นานที่สุดในการศึกษาค้างนี้ได้แก่ 120 วินาที ก็ยังถือเป็นช่วงระยะเวลาที่รวดเร็ว และเหมาะสมในการนำไปประยุกต์ใช้งานในคลินิกได้จริงตามวัตถุประสงค์งานวิจัยที่มุ่งเน้นในงาน วิศวกรรมเนื้อเยื่อแข็งสำหรับการฝังรากเทียม เนื่องจากการทำหัตถการในช่องปากจำเป็นต้องใช้ ความรวดเร็วเพื่อป้องกันการปนเปื้อนในบริเวณที่ทำหัตถการรวมไปถึงหากระยะเวลาในการทำ

หัตถการยิ่งสั้นก็จะส่งผลต่อความร่วมมือของผู้ป่วยในขณะที่ทำหัตถการที่จะช่วยให้ทันตแพทย์สามารถปฏิบัติงานได้อย่างสมบูรณ์และให้ผลสำเร็จสูงยิ่งขึ้น

ด้านการพองตัวของไฮโดรเจล ในการวิจัยครั้งนี้ พบว่า MeHA ไฮโดรเจลที่บ่มด้วยแสงสีฟ้าเป็นระยะเวลาตั้งแต่ 30, 60, 90 และ 120 วินาที มีความสามารถในการดูดน้ำมากกว่าร้อยละ 90 ในทุกกลุ่มการทดลอง โดยผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Maturavongsadit P. และคณะในปี 2016 และ Trakiattikul N. และคณะในปี 2018 ที่ใช้ DTT ในการ-crosslink MeHA ไฮโดรเจล แต่เมื่อพิจารณาอัตราส่วนการพองตัวเชิงมวล (Q_m) และอัตราส่วนการพองตัวเชิงปริมาตร (Q_v) พบว่า Q_m และ Q_v ของไฮโดรเจลในกลุ่มที่บ่มด้วยแสงสีฟ้าเป็นระยะเวลา 60, 90 และ 120 วินาที มีค่าการพองตัวที่น้อยกว่าคือ $Q_m \sim 15$ และ $Q_v \sim 27$ โดยผลการศึกษาของ Maturavongsadit P. และคณะในปี 2016 ที่มีค่า $Q_m \sim 40$ และ $Q_v \sim 50$ ในทางกลับกันกลับมีค่ามากกว่าผลการศึกษาของ Trakiattikul N. และคณะในปี 2018 ที่ได้ $Q_m \sim 9-11$ และ $Q_v \sim 16-18$ ซึ่งอาจเป็นผลมากจากการใช้ MeHA ไฮโดรเจลที่มีส่วนผสมของแมนนิทอลทำให้กระบวนการอบระเหยแห้งแบบเยือกแข็ง (lyophilization) อาจยังไม่สามารถกำจัดน้ำออกไปจากเจลได้ทั้งหมด ในส่วนของไฮโดรเจลกลุ่มที่บ่มด้วยแสงสีฟ้าเป็นระยะเวลา 30 วินาทีจะมีค่า $Q_m \sim 34$ และ $Q_v \sim 60$ ซึ่งมากกว่ากลุ่มอื่นๆในการทดลองครั้งนี้ อาจเป็นผลมาจากระยะเวลาการบ่มที่น้อยทำให้โครงสร้างของไฮโดรเจลเกิดการ-crosslink สานกันเป็นร่างแหพอลิเมอร์ที่มีความหนาแน่นน้อยกว่ากลุ่มที่บ่มด้วยแสงเป็นระยะเวลาที่นานกว่า ทำให้น้ำสามารถเข้าไปแทรกตัวอยู่ภายในเจลได้มากกว่า สามารถอนุมานได้ว่ายิ่งอัตราส่วนการพองตัวเชิงมวลและเชิงปริมาตรมาก แสดงว่าเจลมีเสถียรภาพที่น้อย

อีกประเด็นที่ต้องคำนึงถึงสำหรับวัสดุทางชีวภาพที่จะนำมาใช้ทางคลินิกที่สำคัญ คือ คุณสมบัติในการสลายตัวของไฮโดรเจล เนื่องจากพบว่าหากไม่มีการสลายตัวของวัสดุที่สมบูรณ์ จะก่อให้เกิดการตอบสนองของร่างกายและเนื้อเยื่อโดยรอบ เกิดขบวนการอักเสบและต่อต้านวัสดุแปลกปลอมที่เหลืออยู่ แต่ในทางกลับกัน หากวัสดุทางชีวภาพที่ใส่ลงไปมีการสลายตัวที่รวดเร็วมากเกินไป ก็จะไม่มียาหรือเสถียรภาพเพียงพอที่จะนำพาสารสำคัญเข้าไปในบริเวณที่ต้องการได้เช่นกัน

จากการศึกษาการสลายตัวของไฮโดรเจลพบว่า MeHA ไฮโดรเจลที่บ่มด้วยแสงสีฟ้าเป็นช่วงระยะเวลาต่างๆได้แก่ 30, 60, 90 และ 120 วินาที สามารถสลายตัวได้หมดในสารละลายไฮยาโลูโรนิค 100U โดยกลุ่มที่สลายตัวหมดเร็วที่สุดคือกลุ่มที่บ่มด้วยแสงสีฟ้าเป็นระยะเวลา 30 วินาที สลายตัวหมดใน 3 วัน ถัดมาคือกลุ่มที่บ่มด้วยแสงสีฟ้าเป็นระยะเวลา 60 วินาที สลายตัว

หมดใน 4 วัน และกลุ่มที่สลายตัวช้าที่สุดคือกลุ่มที่บ่มด้วยแสงสีฟ้าเป็นระยะเวลา 90 และ 120 วินาที ซึ่งสลายตัวหมดใน 5 วัน โดยกลุ่มที่บ่มด้วยแสงสีฟ้าเป็นระยะเวลา 60 วินาทีมีอัตราการสลายตัวที่คงที่ที่สุด กล่าวคือมีค่าการดูดกลืนแสงที่ใกล้เคียงกันในแต่ละวันที่เก็บตัวอย่าง โดยจากการศึกษาของ Maturavongsadit P. และคณะในปี 2016 พบว่า MeHA ไฮโดรเจลที่ครอสลิงค์ด้วย DTT มีการสลายตัวหมดในสารละลายไฮยาลูโรนิก 100U ภายใน 2 วัน โดยมีปริมาณกรดยูโรนิกที่สลายออกมามากกว่าร้อยละ 65 ใน 24 ชั่วโมงแรก จะเห็นได้ว่าการครอสลิงค์ทำให้เกิดการพอลิเมอไรเซชันจากการบ่มด้วยแสงนั้น นอกจากมีระยะเวลาในการก่อตัวเป็นเจลที่รวดเร็วแล้ว เจลที่ได้ยังมีโครงสร้างที่แข็งแรงมากกว่าการครอสลิงค์ด้วยสารเคมี (chemical crosslinking) เมื่อพิจารณาจากระยะเวลาการสลายตัวที่ช้าและอัตราการสลายตัวที่คงที่กว่าในทุกกลุ่ม ดังนั้นจึงสามารถอนุมานได้ว่ายิ่งระยะเวลาในการบ่มด้วยแสงที่นานกว่า จะส่งผลให้เจลมีการครอสลิงค์ที่สมบูรณ์มากกว่า จากเหตุผลข้างต้นไฮโดรเจลที่มีการพอลิเมอไรเซชันจากการบ่มด้วยแสงสีฟ้าจึงมีความเหมาะสมที่จะนำไปพัฒนาต่อยอดเพื่อใช้ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อแข็งหรือระบบขนส่งยาที่ต้องการให้เจลสามารถกักเก็บตัวยาไว้ได้นาน อย่างไรก็ตามยังจำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมหากต้องการที่จะนำไปประยุกต์ใช้ในการรักษาระยะยาวที่จำเป็นต้องให้เจลมีการสลายตัวที่ช้ากว่านี้ รวมถึงรูปแบบการปลดปล่อยสารสำคัญ (protein releasing profile) ว่ามีผลกับการสลายตัวของเจลหรือไม่

การศึกษาลักษณะพื้นฐานวิทยาภายในโครงสร้างของไฮโดรเจลพบว่า MeHA ไฮโดรเจลกลุ่มที่บ่มด้วยแสงสีฟ้าเป็นระยะเวลา 90 และ 120 วินาทีมีพื้นผิวที่เป็นเนื้อเดียวกัน (homogeneity) มากกว่ากลุ่มที่บ่มด้วยแสงสีฟ้าเป็นระยะเวลา 30 และ 60 วินาที รวมถึงไฮโดรเจลกลุ่มที่บ่มด้วยแสงสีฟ้าเป็นระยะเวลา 90 และ 120 วินาทียังมีโครงสร้างภายในที่มีลักษณะเป็นรูพรุนชัดเจนสานต่อกันไปทั่วทุกบริเวณของโครงสร้าง ซึ่งเป็นคุณสมบัติพื้นฐานของสแคฟโฟลด์ที่ดี และมีความเหมาะสมที่จะนำไปพัฒนาต่อยอดเพื่อใช้เป็นระบบขนส่งสารที่มีคุณภาพ โดยอาจเป็นผลมาจากระยะเวลาการบ่มด้วยแสงสีฟ้าที่นานกว่าทำให้เกิดการพอลิเมอไรเซชันจากการครอสลิงค์ที่สมบูรณ์มากกว่ากลุ่มที่บ่มด้วยแสงสีฟ้าเป็นระยะเวลา 30 และ 60 วินาที ที่จะเห็นรูพรุนและลักษณะโครงสร้างที่ไม่ชัดเจน

นอกจากลักษณะโครงสร้างที่เป็นรูพรุนแล้ว ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของรูพรุนก็เป็นปัจจัยสำคัญที่จะส่งผลให้ เซลล์, เนื้อเยื่อ, สารอาหาร รวมถึงของเสียสามารถแพร่ผ่านเข้าออกได้อย่างเหมาะสม จากการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางรูพรุนของไฮโดรเจลกลุ่มที่บ่มด้วยแสงสีฟ้าเป็นระยะเวลา 90 วินาทีและ 120 วินาทีด้วยโปรแกรม ImageJ พบว่ามีความยาวเส้นผ่านศูนย์กลาง

เฉลี่ยอยู่ที่ประมาณ 105 ไมครอน โดยจากการศึกษาของ Pluta K. และคณะในปี 2014 และ Yassin M. ในปี 2017 ได้ให้ข้อสรุปตรงกันว่าขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของรูพรุนในสแคฟโฟลด์ที่เหมาะสมที่สุดสำหรับงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อแข็งอยู่ที่ความยาวระหว่าง 100 ถึง 500 ไมครอน ซึ่งหากรูพรุนมีขนาดใหญ่เกินไปก็อาจส่งผลในแง่ของความแข็งแรงของสแคฟโฟลด์ได้ ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่าไฮโดรเจลกลุ่มที่บ่มด้วยแสงสีฟ้าเป็นระยะเวลา 90 และ 120 วินาที มีขนาดรูพรุนที่เหมาะสมสำหรับนำไปพัฒนาต่อยอดเพื่อประยุกต์ใช้ทางคลินิกในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อแข็งได้ในอนาคต

สรุปผลการศึกษาวิจัย

จากการศึกษาครั้งนี้สามารถสรุปได้ว่า ระยะเวลาในการบ่ม MeHA ไฮโดรเจลที่เร็วที่สุดและทำให้ไฮโดรเจลมีคุณสมบัติทางกายภาพที่เหมาะสมในการนำไปประยุกต์ใช้ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อแข็งอยู่ที่ 90 วินาที เนื่องจากไฮโดรเจลมีความสามารถในการพองตัวที่ดี, สามารถสลายตัวได้หมดในระยะเวลาที่เหมาะสม และมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่เหมาะสมได้แก่ การมีรูพรุนที่สานต่อกันไปทั่วทุกพื้นผิวและมีความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางรูพรุนที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของเซลล์กระดูก

ข้อเสนอแนะในการทำวิจัยครั้งต่อไป

การศึกษานี้ได้ศึกษา MeHA hydrogel ที่มีการครอสลิงค์ให้เกิดการพอลิเมอไรเซชันจากการบ่มด้วยแสงสีฟ้าด้วยการผสม blue light initiator ได้แก่ ลิเทียมฟีนิลไดรเมทิลเบนโซอิลฟอสฟิเนต (lithium phenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphinate) หรือ LAP โดยจากการศึกษาทำให้ได้ทราบถึงสัดส่วนที่เหมาะสมระหว่างสารละลาย MeHA และ LAP เพื่อให้ได้พอลิเมอร์ที่สามารถก่อตัวเป็นเจลได้จากการบ่มด้วยแสงสีฟ้า นอกจากนี้ยังได้ศึกษาระยะเวลาในการก่อตัวเป็นเจลรวมถึงคุณสมบัติทางกายภาพ ได้แก่ การพองตัวของไฮโดรเจล, การสลายตัวของไฮโดรเจล และ ลักษณะรูพรุนภายในโครงสร้างของไฮโดรเจล

เนื่องจากการศึกษานี้มุ่งหวังที่จะนำไปพัฒนาต่อยอดในการประยุกต์ใช้ทางคลินิกกับผู้ป่วย ดังนั้นในการศึกษากครั้งต่อไปจึงควรที่จะศึกษาถึงความเข้ากันได้กับเซลล์อันเป็นคุณสมบัติพื้นฐานของสแคฟโฟลด์รวมถึงอาจมีการพิจารณาใส่ growth factor และศึกษาการปลดปล่อย

สารสำคัญ ซึ่งล้วนเป็นองค์ประกอบสำคัญของงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อ เพื่อทดสอบว่ามีผลต่อคุณสมบัติทางกายภาพของไฮโดรเจลชนิดนี้หรือไม่



บรรณานุกรม

1. World Health Organization. (2017 M. 10 facts on ageing and health. 2017.
2. Gaviria L, Salcido JP, Guda T, Ong JL. Current trends in dental implants. J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg. 2014;40(2):50-60.
3. Venkataraman N, Bansal S, Bansal P, Narayan S. Dynamics of bone graft healing around implants. Journal of the International Clinical Dental Research Organization. 2015;7(3):40-7.
4. Bertolai R, Catelani C, Aversa A, Rossi A, Giannini D, Bani D. Bone graft and mesenchymal stem cells: clinical observations and histological analysis. Clin Cases Miner Bone Metab. 2015;12(2):183-7.
5. Gandia C, Armiñan A, García-Verdugo JM, Lledó E, Ruiz A, Miñana MD, et al. Human Dental Pulp Stem Cells Improve Left Ventricular Function, Induce Angiogenesis, and Reduce Infarct Size in Rats with Acute Myocardial Infarction. STEM CELLS. 2008;26(3):638-45.
6. Park J-C, Bae E-B, Kim S-E, Kim S-Y, Choi K-H, Choi J-W, et al. Effects of BMP-2 Delivery in Calcium Phosphate Bone Graft Materials with Different Compositions on Bone Regeneration. Materials (Basel, Switzerland). 2016;9(11):954.
7. Nikolova MP, Chavali MS. Recent advances in biomaterials for 3D scaffolds: A review. Bioact Mater. 2019;4:271-92.
8. Edwards S, Werkmeister J, Ramshaw J. Carbon nanotubes in scaffolds for tissue engineering. Expert review of medical devices. 2009;6:499-505.
9. Newman P, Minett A, Ellis-Behnke R, Zreiqat H. Carbon Nanotubes: their Potential and Pitfalls for Bone Tissue Regeneration and Engineering. Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine. 2013;9.
10. Zhai P, Peng X, Li B, Liu Y, Sun H, Li X. The application of hyaluronic acid in bone regeneration. Int J Biol Macromol. 2020;151:1224-39.
11. Bhakta G, Rai B, Lim ZX, Hui JH, Stein GS, van Wijnen AJ, et al. Hyaluronic acid-based hydrogels functionalized with heparin that support controlled release of bioactive

BMP-2. *Biomaterials*. 2012;33(26):6113-22.

12. Maturavongsadit P, Bi X, Metavarayuth K, Luckanagul JA, Wang Q. Influence of Cross-Linkers on the in Vitro Chondrogenesis of Mesenchymal Stem Cells in Hyaluronic Acid Hydrogels. *ACS Applied Materials & Interfaces*. 2017;9(4):3318-29.
13. Trakiattikul N, Dhanesuan N, Luckanagul JA, Rungsiyanont S. The Development of Mannitol/BSA Methacrylated Hyaluronic Acid Hydrogels as an Injectable Drug Delivery Platform. *SWU Dent J*. 2018;Vol. 11 No.2:41-54.
14. Areevijit K, Dhanesuan N, Luckanagul JA, Rungsiyanont S. Biocompatibility of Methacrylated Hyaluronic Acid Hydrogel to Alveolar Bone Cells. *SWU Dent J*. 2019;Vol. 12 No.2:22-37.
15. Mane S. Effect of Chemical Crosslinking on Properties of Polymer Microbeads: A Review. *Canadian chemical Transactions*. 2016;3:473-85.
16. Pluta K, Malina D, Sobczak-kupiec A. *Scaffolds For Tissue Engineering*. 2014.
17. Murphy CM, O'Brien FJ, Little DG, Schindeler A. Cell-scaffold interactions in the bone tissue engineering triad. *Eur Cell Mater*. 2013;26:120-32.
18. Mhanna R, Hasan A. *Tissue Engineering for Artificial Organs : Regenerative Medicine, Smart Diagnostics and Personalized Medicine*. Wiley. 2017:3-34.
19. Neto AS, Ferreira JMF. Synthetic and Marine-Derived Porous Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Materials (Basel)*. 2018;11(9).
20. Chocholata P, Kulda V, Babuska V. Fabrication of Scaffolds for Bone-Tissue Regeneration. *Materials (Basel)*. 2019;12(4).
21. Titsinides S, Agrogiannis G, Karatzas T. Bone grafting materials in dentoalveolar reconstruction: A comprehensive review. *Jpn Dent Sci Rev*. 2019;55(1):26-32.
22. Oryan A, Alidadi S, Moshiri A, Maffulli N. Bone regenerative medicine: classic options, novel strategies, and future directions. *J Orthop Surg Res*. 2014;9(1):18-.
23. Yassin MAAY. Surface Hydrophilicity: A Key Factor In Developing Bone Tissue Engineering Constructs 2017.
24. Pina S, Ribeiro VP, Marques CF, Maia FR, Silva TH, Reis RL, et al. Scaffolding

Strategies for Tissue Engineering and Regenerative Medicine Applications. Materials (Basel). 2019;12(11).

25. Trombino S, Servidio C, Curcio F, Cassano R. Strategies for Hyaluronic Acid-Based Hydrogel Design in Drug Delivery. Pharmaceuticals. 2019;11(8).

26. El-Sherbiny IM, Yacoub MH. Hydrogel scaffolds for tissue engineering: Progress and challenges. Glob Cardiol Sci Pract. 2013;2013(3):316-42.

27. Burdick JA, Prestwich GD. Hyaluronic acid hydrogels for biomedical applications. Adv Mater. 2011;23(12):H41-56.

28. Kondiah PJ, Choonara YE, Kondiah PP, Marimuthu T, Kumar P, du Toit LC, et al. A Review of Injectable Polymeric Hydrogel Systems for Application in Bone Tissue Engineering. Molecules. 2016;21(11).

29. Liu M, Zeng X, Ma C, Yi H, Ali Z, Mou X, et al. Injectable hydrogels for cartilage and bone tissue engineering. Bone Res. 2017;5:17014.

30. Maturavongsadit P, Luckanagul JA, Metavarayuth K, Zhao X, Chen L, Lin Y, et al. Promotion of In Vitro Chondrogenesis of Mesenchymal Stem Cells Using In Situ Hyaluronic Hydrogel Functionalized with Rod-Like Viral Nanoparticles. Biomacromolecules. 2016;17(6):1930-8.

31. Zhu J, Tang X, Jia Y, Ho C-T, Huang Q. Applications and Delivery Mechanisms of Hyaluronic Acid used for Topical/Transdermal Delivery - A review. International Journal of Pharmaceutics. 2020;578:119127.

32. Parhi R. Cross-Linked Hydrogel for Pharmaceutical Applications: A Review. Adv Pharm Bull. 2017;7(4):515-30.

33. Maitra J, Shukla VK. Cross-linking in Hydrogels - A Review. A Review, American Journal of Polymer Science. 2014;Vol. 4 No. 2:25-31.

34. Oryan A, Kamali A, Moshiri A, Baharvand H, Daemi H. Chemical crosslinking of biopolymeric scaffolds: Current knowledge and future directions of crosslinked engineered bone scaffolds. International Journal of Biological Macromolecules. 2018;107:678-88.

35. Fairbanks B, Schwartz M, Bowman C, Anseth K. Photoinitiated polymerization of PEG-diacrylate with lithium phenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphinate: Polymerization rate

and cytocompatibility. *Biomaterials*. 2009;30:6702-7.

36. Nguyen KT, West JL. Photopolymerizable hydrogels for tissue engineering applications. *Biomaterials*. 2002;23(22):4307-14.

37. Nakamura Y, Lee R, Coote ML, Yamago S. Termination Mechanism of the Radical Polymerization of Acrylates. *Macromol Rapid Commun*. 2016;37(6):506-13.

38. Fenn SL, Oldinski RA. Visible light crosslinking of methacrylated hyaluronan hydrogels for injectable tissue repair. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2016;104(6):1229-36.

39. Donnelly PE, Chen T, Finch A, Brial C, Maher SA, Torzilli PA. Photocrosslinked tyramine-substituted hyaluronate hydrogels with tunable mechanical properties improve immediate tissue-hydrogel interfacial strength in articular cartilage. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2017;28(6):582-600.

40. Beninatto R, Barbera C, Lucchi O, Borsato G, Serena E, Guarise C, et al. Photocrosslinked hydrogels from coumarin derivatives of hyaluronic acid for tissue engineering applications. *Materials Science and Engineering C*. 2019;96:625-34.

41. Sun G, Huang Y, Li D, Chen E, Zhong Y, Fan Q, et al. Blue Light Initiated Photopolymerization: Kinetics and Synthesis of Superabsorbent and Robust Poly(N,N'-dimethylacrylamide/Sodium Acrylate) Hydrogels. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 2019;58(22):9266-75.

42. Kamoun E, Winkel A, Eisenburger M, Menzel H. Carboxylated Camphorquinone as Visible-Light Photoinitiator for Biomedical Application: Synthesis, Characterization, and Application. *Arabian Journal of Chemistry*. 2014;23.

43. Wang G, Cao X, Dong H, Zeng L, Yu C, Chen X. A Hyaluronic Acid Based Injectable Hydrogel Formed via Photo-Crosslinking Reaction and Thermal-Induced Diels-Alder Reaction for Cartilage Tissue Engineering. *Polymers (Basel)*. 2018;10(9):949.

ภาคผนวก

แผนการดำเนินงาน

ตาราง 3 แผนการดำเนินงานวิจัย

ขั้นตอน	ปีการศึกษาที่ 1 (ส.ค. 62-ก.ค. 63)												
	ส.ค.	ก.ย.	ต.ค.	พ.ย.	ธ.ค.	ม.ค.	ก.พ.	มี.ค.	เม.ย.	พ.ค.	มิ.ย.	ก.ค.	
สืบค้นเอกสาร	←		→										
สั่งซื้อและเตรียมอุปกรณ์				←		→							
เขียนเค้าโครงงานวิจัยและดำเนินการวิจัย							←						→
ดำเนินการวิจัย											←		→

ตาราง 3 แผนการดำเนินงานวิจัย(ต่อ)

[illegible]

ตาราง 3 แผนการดำเนินงานวิจัย(ต่อ)

ขั้นตอน	ปีการศึกษาที่ 3 (ส.ค. 64-ก.ค. 65)											
	ส.ค.	ก.ย.	ต.ค.	พ.ย.	ธ.ค.	ม.ค.	ก.พ.	มี.ค.	เม.ย.	พ.ค.	มิ.ย.	ก.ค.
ดำเนินการวิจัย	←			→								
วิเคราะห์และสรุปผล				←		→						
เขียนรายงานวิจัย						←	→					
ตีพิมพ์งานวิจัย								←				→

ค่าใช้จ่ายในการวิจัย

ตาราง 4 ค่าใช้จ่ายในงานวิจัย

รายการ	รายละเอียด	ราคา (บาท)
1. วัสดุสำนักงานและเอกสาร		
2. วัสดุวิทยาศาสตร์	สารเคมีและวัสดุสำหรับการทดลอง	50,000
	อุปกรณ์และเครื่องมือในการทดลอง	50,000
รวม		100,000

รายการสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

1. Dipotassium phosphate (K_2HPO_4)
2. Potassium dihydrogenphosphate (KH_2PO_4)
3. Sodium hydroxide (NaOH)
4. Sodium chloride (NaCl)
5. Potassium chloride (KCl)
6. Di-sodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4)
7. Hydrochloric acid (HCl)
8. Sodium hyaluronate
9. Methacrylic anhydride
10. Lithium phenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphinate (LAP)
11. Deuterium oxide (D_2O)

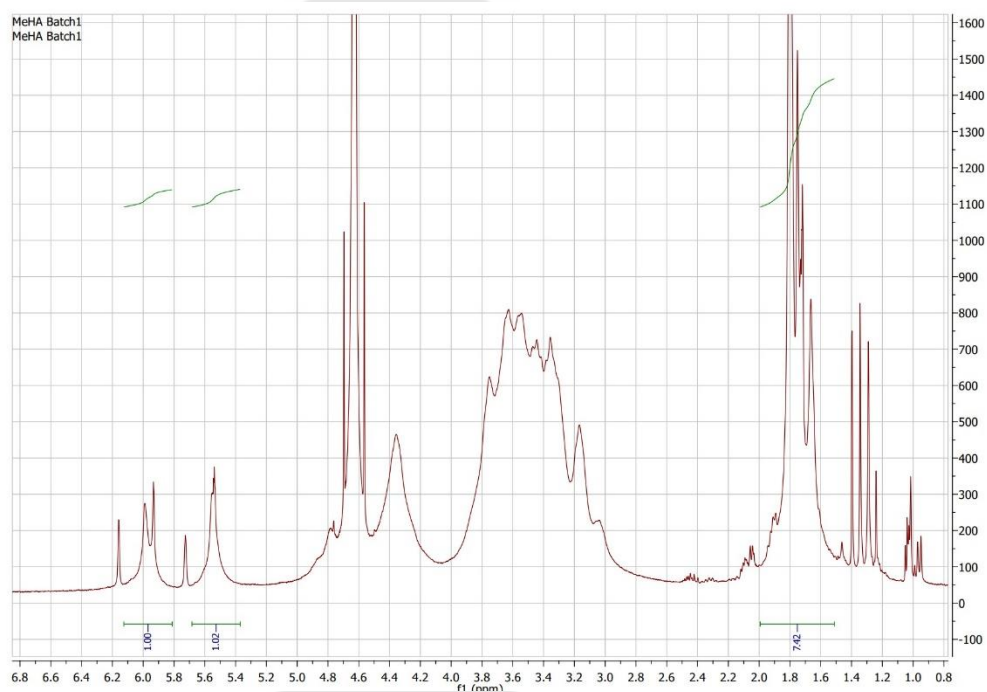
การสังเคราะห์ MeHA hydrogel

1. นำกรดไฮยาลูรอนิกน้ำหนักโมเลกุล 47 กิโลดาลตัน ไปละลายใน potassium phosphate buffer อัตราส่วน 1% โดยน้ำหนัก ในสภาวะที่มีค่า pH = 8
2. หยด methacrylic anhydride อัตราส่วนเชิงมวล 10:1 ต่อ HA monomer ลงในสารละลายที่มี อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียสและคอยควบคุมอุณหภูมิในระหว่างการเกิดปฏิกิริยาให้อยู่ในช่วงอุณหภูมิ 0-4 องศาเซลเซียสเสมอ
3. ปรับค่า pH ของสารละลายให้มีค่ามากกว่าเท่ากับ 8 อยู่ตลอดเวลา โดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 5 โมลาร์
4. ปลอ่ยให้ปฏิกิริยาดำเนินต่อไปจนครบ 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 0-4 องศาเซลเซียส
5. จากนั้นนำสารละลายที่เตรียมได้มาใส่ถุงแลกเปลี่ยนสาร (dialysis bag) แช่ในน้ำกลั่นบริสุทธิ์ (ultrapure water) ไปปั่นบนแกนแม่เหล็กที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสอย่างน้อย 48 ชั่วโมง
6. นำสารละลายที่ผ่านการ dialysis แล้วไปปั่นด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็ว 10,000 รอบ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
7. นำส่วนที่ตกตะกอนออก แล้วนำไปแช่แข็งทันที
8. นำไปแช่แข็งแบบเยือกแข็ง

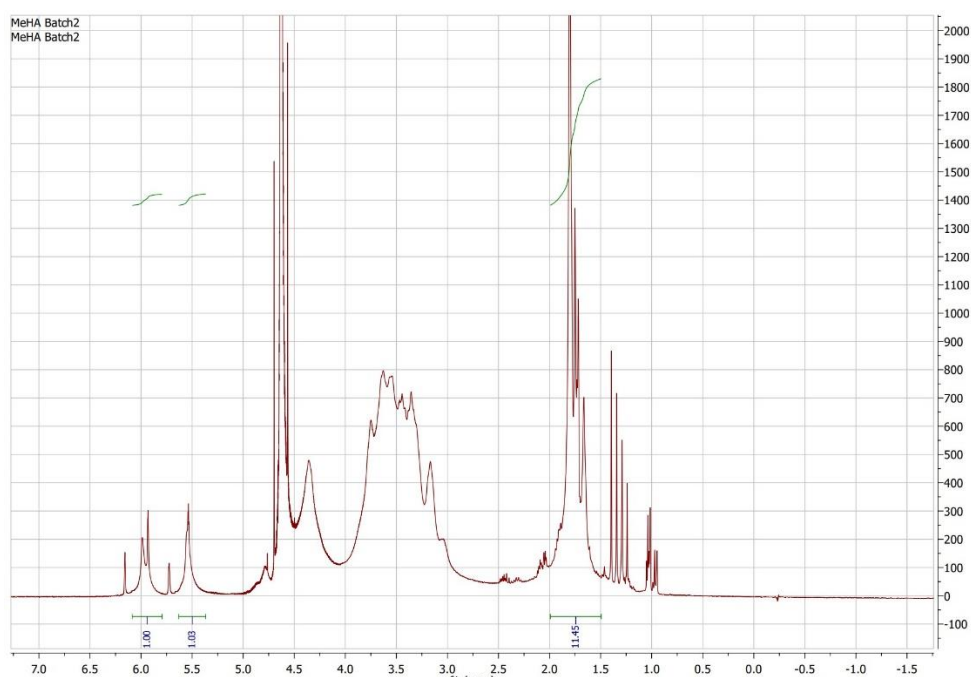
9. นำไปตรวจดู degree of modification ของ MeHA hydrogel ด้วยเทคนิคโปรตอน-นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโคปี (Proton nuclear magnetic resonance spectroscopy : ^1H -NMR spectroscopy)

ค่า degree of modification ของ MeHA hydrogel จากการ ตรวจ ^1H -NMR spectroscopy

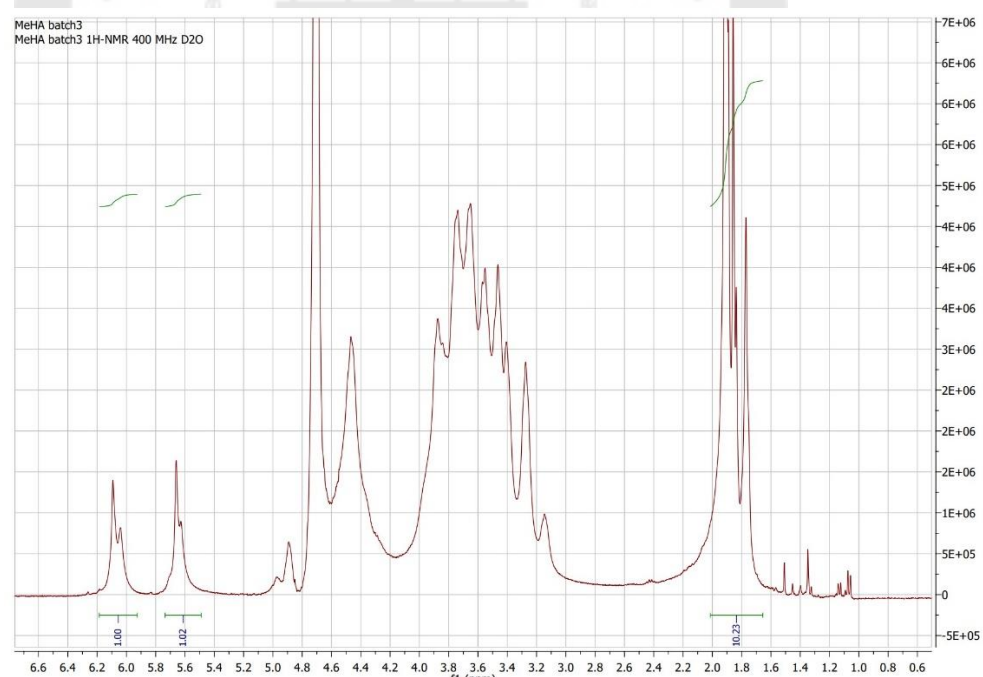
Batch 1 : degree of modification = 69



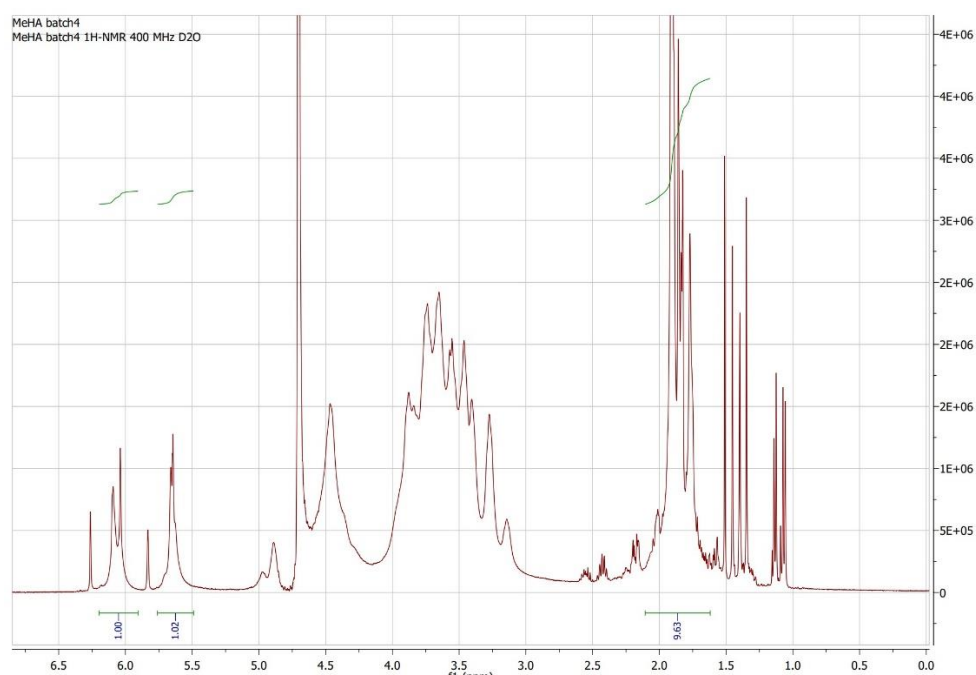
Batch 2 : degree of modification = 36



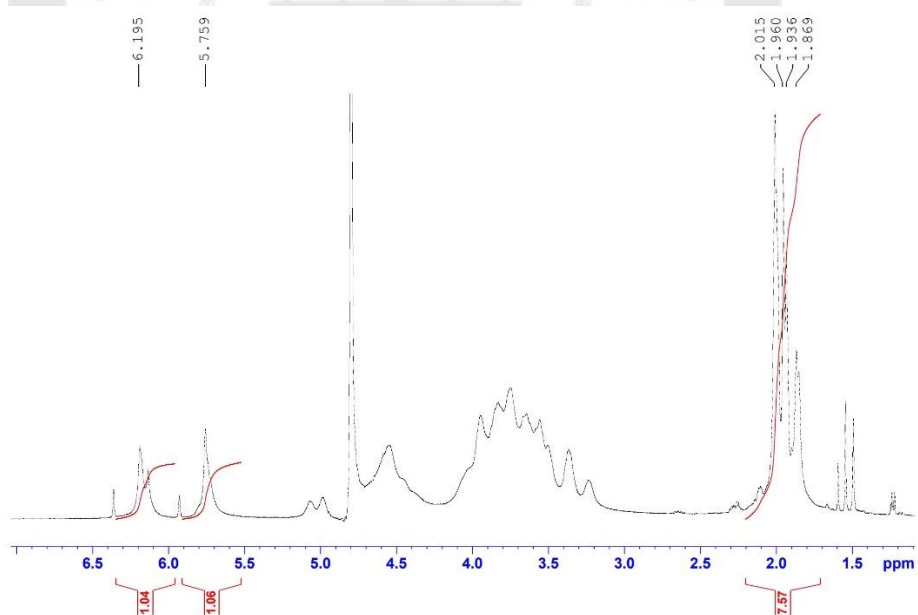
Batch 3 : degree of modification = 42



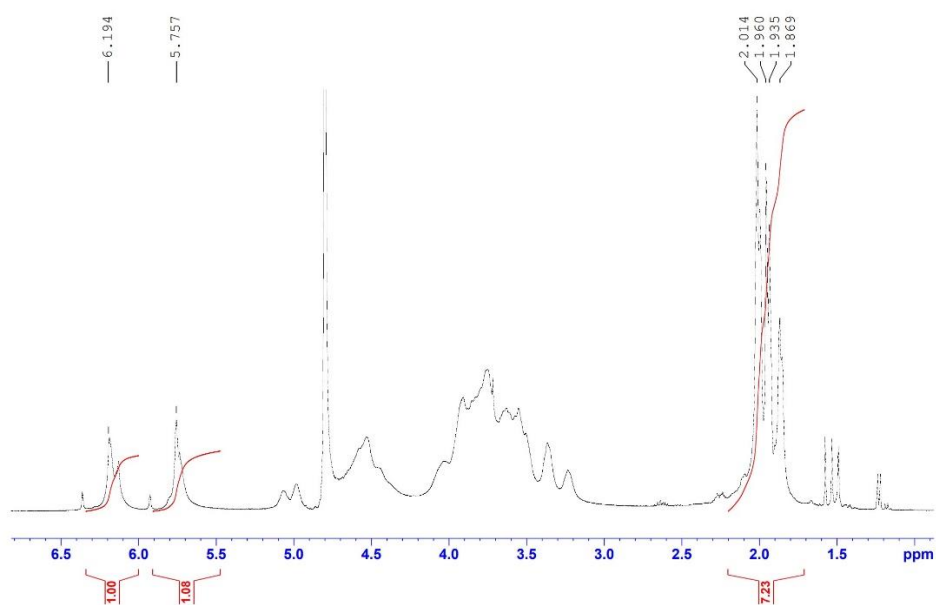
Batch 4 : degree of modification = 46



Batch 5 : degree of modification = 71



Batch 6 : degree of modification = 76



ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	ฐรี เชาวน์พาณิชย์เจริญ
วัน เดือน ปี เกิด	22 กรกฎาคม 2536
สถานที่เกิด	กรุงเทพมหานคร
วุฒิการศึกษา	ทันตแพทยศาสตรบัณฑิต คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

