



ความเข้ากันได้ทางชีวภาพของไฟโบรบลาสต์แอล 929 กับไฮโดรเจลจาก  
กรดไฮยาลูโรนิกที่มีการพอลิเมอไรเซชันโดยแสงสีฟ้า  
THE BIOCOMPATIBILITY OF L929 FIBROBLAST AND  
HYALURONIC ACID BASED HYDROGEL POLYMERIZED BY BLUE LIGHT

ธนกันต์ จิวะเจริญ



ความเข้ากันได้ทางชีวภาพของไฟโบรบลาสต์แอล 929 กับไฮโดรเจลจาก  
กรดไฮยาลูโรนิกที่มีการพอลิเมอไรเซชันโดยแสงสีฟ้า



ปริญญานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร  
วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาการช่องปากและแม็กซิลโลเฟเชียล  
คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ  
ปีการศึกษา 2564  
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

THE BIOCOMPATIBILITY OF L929 FIBROBLAST AND  
HYALURONIC ACID BASED HYDROGEL POLYMERIZED BY BLUE LIGHT



TANAKAN JIVACHAROEN

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

ความเข้ากันได้ทางชีวภาพของไฟโบรบลาสต์แอล 929 กับไฮโดรเจลจาก

กรดไฮยาลูโรนิกที่มีการพอลิเมอไรเซชันโดยแสงสีฟ้า

ของ

ธนกันต์ จิระเจริญ

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร  
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาการช่องปากและแม็กซิลโลเฟเชียล

ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ฉัตรชัย เอกปัญญาสกุล)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์

..... ที่ปรึกษาหลัก ..... ประธาน  
(รองศาสตราจารย์ ดร.สรสัณห์ รังสิยานนท์) (รองศาสตราจารย์ ดร.เนืระชา สารขวนะกิจ)

..... ที่ปรึกษาร่วม ..... กรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร.เนืระดา ธเนศวร) (อาจารย์ ดร.สินีภัทร์ ตลิ่งจิตร)

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

ชื่อเรื่อง	ความเข้ากันได้ทางชีวภาพของไฟโบรบลาสต์แอล 929 กับไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกที่มีการพอลิเมอไรเซชันโดยแสงสีฟ้า
ผู้วิจัย	ธนกันต์ จิวะเจริญ
ปริญญา	วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต
ปีการศึกษา	2564
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. สรศักดิ์ รังสิยานนท์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร. นิรดา ธเนศวร
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จิตติมา ลัคนากุล

กรดไฮยาลูโรนิกเป็นสารที่สามารถพบได้ทั่วไปในแมทริกซ์ระหว่างเซลล์มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพที่ดีกับเซลล์ร่างกายมนุษย์ ไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกจึงเป็นหนึ่งในวัสดุโครงสร้างทางชีวภาพที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อ การศึกษาครั้งนี้ได้นำเอาไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกที่ปรับปรุงโครงสร้างด้วยเมทาคริลเลตแอนไฮไดรด์แล้วครอสลิงค์เป็นโครงสร้างสามมิติด้วยแอลเอพีที่กระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาโดยแสงสีฟ้ามาศึกษาความเข้ากันได้ทางชีวภาพกับไฟโบรบลาสต์แอล 929 ผ่านการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์โดยอ้อม การศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์เมื่อเลี้ยงร่วมกับไฮโดรเจลในลักษณะสองมิติและสามมิติ และการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ พบว่าไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกที่มีการพอลิเมอไรเซชันโดยแสงสีฟ้ามีความเข้ากันได้ทางชีวภาพที่ดีกับไฟโบรบลาสต์แอล 929 โดยเซลล์สามารถมีชีวิตอยู่ได้ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่สัมผัสกับไฮโดรเจลและยังคงเจริญเติบโตได้เมื่อนำมาเลี้ยงร่วมกับไฮโดรเจลทั้งในลักษณะสองมิติและสามมิติ แม้จะเจริญเติบโตช้ากว่ากลุ่มควบคุมในช่วง 3-5 วันแรก แต่ก็สามารถเจริญเติบโตได้มากขึ้นในเวลาต่อมา และพบว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดมีลักษณะของพื้นผิวเซลล์ที่ปกติ เซลล์ส่วนใหญ่มีรูปร่างกลม บางส่วนพบการยื่นแขนงของเซลล์คล้ายรูปทรงกระสวยและพบเซลล์ที่เข้าสู่ขั้นตอนการแบ่งเซลล์อันแสดงให้เห็นถึงการเจริญเติบโตของเซลล์ ความรู้ที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ถือเป็นรากฐานสำคัญในการทำความเข้าใจการตอบสนองของเซลล์ต่อไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกที่มีการพอลิเมอไรเซชันโดยแสงสีฟ้า ซึ่งคาดว่าจะพัฒนาไปเป็นโครงสร้างทางชีวภาพที่ดีสำหรับใช้ในการขนส่งเซลล์ ด้วยหรือปัจจัยทางเคมีสำหรับงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อในทางคลินิกต่อไปในอนาคตอันใกล้

คำสำคัญ : ไฟโบรบลาสต์แอล 929, ไฮโดรเจล, กรดไฮยาลูโรนิก, ความเข้ากันได้ทางชีวภาพ

Title	THE BIOCOMPATIBILITY OF L929 FIBROBLAST AND HYALURONIC ACID BASED HYDROGEL POLYMERIZED BY BLUE LIGHT
Author	TANAKAN JIVACHAROEN
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

Hyaluronic acid is generally found in most extracellular matrices and has good biocompatibility with human cells. Thus, hyaluronic acid-based hydrogels are one of the most commonly used in the field of tissue engineering. In this study, methacrylated hyaluronic acid-based hydrogel cross-linked by LAP and initiated with blue light was tested for biocompatibility with L929 fibroblast. The tests consisted of indirect cytotoxicity assay, proliferation in 2D and 3D assay, and studied the cell morphology. The results showed that a hyaluronic acid-based hydrogel polymerized by blue light has good biocompatibility to the L929 fibroblast. The cells were viable when the culture in hydrogel extracts and can proliferate in 2D and 3D culture assays. The proliferation rate were limited in the first three to five days and would increase days later. The cell morphology under scanning electron microscopy revealed normal cell surface morphology, the shape of the cells were round in general, some extended the cell process to a spindle shape, and the cells that underwent the process of mitosis process were detected and demonstrated cell proliferation. The knowledge from this study provides a proper foundation in understanding the responses of cells to a hyaluronic acid-based hydrogel that is crucial to developing an excellent scaffold for clinical use in the future.

Keyword : L929 Fibroblast, Hydrogel, Hyaluronic acid, Biocompatibility

## กิตติกรรมประกาศ

การจัดทำปริญญาานิพนธ์ในครั้งนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดีเนื่องจากได้รับความช่วยเหลือและความกรุณาอย่างยิ่งจากคณาจารย์และบุคคลหลายท่านทั้งที่ได้กล่าวถึงและไม่ได้กล่าวถึง ผู้วิจัยมีความปิติยินดีอย่างยิ่งและขอโน้มกราบขอบพระคุณ รศ.ดร.ทพ. สรศักดิ์ รั้งสิยานนท์ อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก รศ.ดร.ทพญ. นีรดา ธเนศวร และ ผศ.ดร.ภญ. จิตติมา ลักนากุล อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่ให้คำแนะนำและชี้แนะข้อควรปรับปรุงต่างๆตลอดการจัดทำปริญญาานิพนธ์ในครั้งนี้ จนสำเร็จออกมาเป็นงานวิจัยที่ทรงคุณค่าแก่วงการวิศวกรรมเนื้อเยื่อและวงการทันตกรรม

ขอขอบคุณคณะเภสัชศาสตร์ และศูนย์เครื่องมือวิจัยทางเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับการเอื้อเฟื้อสถานที่ปฏิบัติการ ตลอดจนวัสดุและอุปกรณ์ทั้งหมดที่ใช้ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ในภาควิชาวิทยาการเภสัชกรรมและเภสัชอุตสาหกรรม และเจ้าหน้าที่ในศูนย์เครื่องมือวิจัยทางเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับความช่วยเหลือและคำแนะนำต่างๆ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการสำหรับนิสิตหลังปริญญา คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ สำหรับเครื่องมือและคำแนะนำในการศึกษาวิจัยครั้งนี้

ท้ายที่สุดขอกราบขอบพระคุณครอบครัว คุณพ่อ คุณแม่ น้องชาย รวมถึงเพื่อนๆรุ่นพี่และรุ่นน้องทุกคนสำหรับกำลังใจและการสนับสนุนอย่างดีโดยตลอด จนสามารถทำให้งานวิจัยในครั้งนี้สำเร็จลุล่วงออกมาได้ตามเป้าหมายทุกประการ ทำให้ผู้วิจัยได้รับประสบการณ์ ความรู้ และความรู้ทางจำอันทรงคุณค่าที่มีอาภรณ์ล้อมเฝ้า

ธนกันต์ จิวะเจริญ



## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย .....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ .....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ .....	ช
สารบัญตาราง.....	ฎ
สารบัญรูปภาพ .....	ฏ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ภูมิหลัง .....	1
วัตถุประสงค์ของงานวิจัย .....	3
ความสำคัญของงานวิจัย .....	3
ขอบเขตของงานวิจัย .....	3
กรอบแนวคิดงานวิจัย.....	4
สมมติฐานในการวิจัย.....	5
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	6
การหายของบาดแผล (Wound healing) .....	6
การหายของชั้นเยื่อบุผิว (Epithelialization) .....	7
ระยะของการหายของแผล (Phases of wound healing) .....	8
ปัจจัยที่ส่งผลต่อการหายของแผล (Factors that impair wound healing) .....	14
การหายของแผลแบบปฐมภูมิ ทุติยภูมิ ตติยภูมิ (Primary, secondary, and tertiary wound healing).....	15
การหายของแผลบริเวณเยื่อเมือก (Wound healing of mucosa) .....	16

การหายของแผลถอนฟัน (Healing of extraction socket).....	16
การหายของแผลบริเวณกระดูก (Bone healing) .....	17
บทบาทของโกรทแฟคเตอร์ (The role of growth factors).....	18
เซลล์ไฟโบรบลาสต์ (Fibroblast cell) .....	19
ลักษณะทั่วไปของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (General appearance of fibroblast cell) .....	19
การจดจำของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (Memory of fibroblast cell) .....	20
การเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (Fibroblast cell differentiation) .....	21
ไฟโบรบลาสต์ 929 (Fibroblast L929 cell).....	23
วิศวกรรมเนื้อเยื่อ (Tissue engineering) .....	25
การทำงานกับเซลล์ .....	25
ตัวอย่างการใช้วิศวกรรมเนื้อเยื่อในการรักษา.....	26
ไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิก (Hyaluronic acid based hydrogel).....	27
การเชื่อมขวางจากการบ่มด้วยแสง (Photo-cross link) .....	29
การทดสอบความเข้ากันได้ของเซลล์กับวัสดุสแคฟโฟลด์ (Compatibility test) .....	31
วิธีวิเคราะห์เอ็มทีที .....	32
วิธีซาซุรินรีดักชัน.....	32
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	34
การกำหนดกลุ่มตัวอย่าง .....	34
ขั้นตอนการทดลอง.....	35
1.การสังเคราะห์ไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกที่มีการพอลิเมอไรเซชันโดยแสงสีฟ้า .....	35
1.1 การสังเคราะห์เมทาคริลิตไฮยาลูโรนิกแอซิด.....	35
1.1.1 การผสมเมทาคริลิตแอนไฮไดรต์กับโซเดียมไฮยาลูโรเนต .....	36
1.1.2 การกำจัดเมทาคริลิตแอนไฮไดรต์ส่วนเกิน .....	37

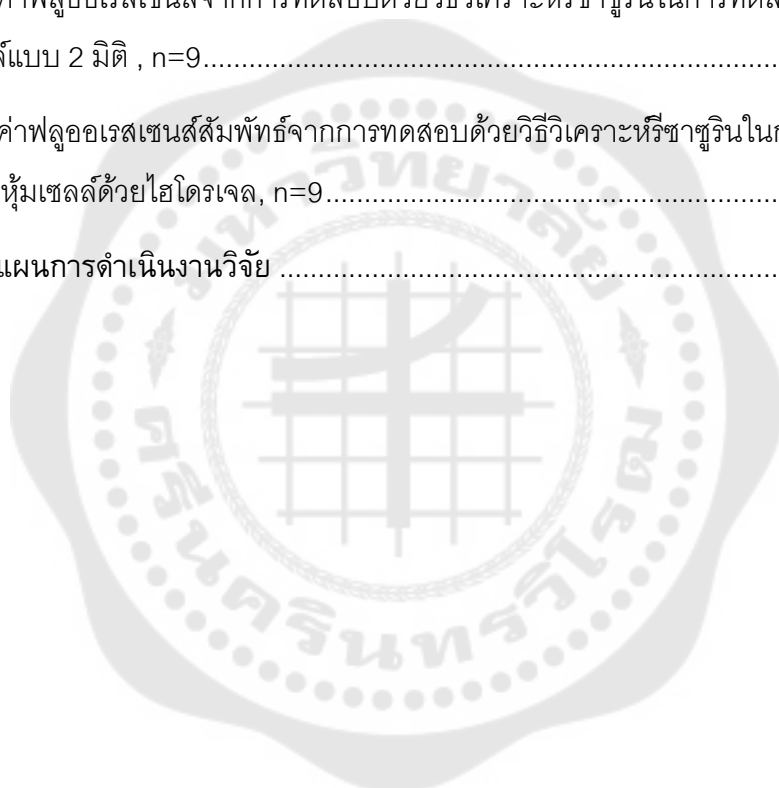
1.1.3 การตรวจปริมาณการเกิดการปรับปรุง (Degree of modification) .	37
1.1.4 การฆ่าเชื้อเมทาคริลेटไฮยาโลโรนิกแอซิด.....	39
1.2 การเตรียมสารละลายไฮโดรเจล .....	39
1.2.1 การผสมเมทาคริลेटไฮยาโลโรนิกกับแอลเอพี .....	39
1.2.2 การก่อตัวเป็นไฮโดรเจล.....	39
2.การทดสอบความเข้ากันได้ของไฟโบริบลาสต์แอล 929 กับไฮโดรเจลจากกรดไฮยาโลโรนิก ที่มีการพอลิเมอไรซันโดยแสงสีฟ้า .....	40
2.1 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์โดยอ้อม (Indirect cytotoxicity assay) .....	40
2.2 การทดสอบการเจริญเติบโตของเซลล์.....	41
2.2.1 การทดสอบด้วยวิธีการเลี้ยงเซลล์แบบ 2 มิติ (2D culture assay) ..	41
2.2.2 การทดสอบด้วยวิธีการห่อหุ้มเซลล์ด้วยไฮโดรเจล (Encapsulation assay).....	43
2.3 การตรวจดูลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์.....	44
การเก็บรวบรวมข้อมูล .....	45
สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล.....	45
บทที่ 4 ผลการวิจัย .....	46
ผลการสังเคราะห์เมทาคริลेटไฮยาโลโรนิกแอซิด .....	46
ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์โดยอ้อม (Indirect cytotoxicity assay).....	47
ผลการทดสอบด้วยวิธีการเลี้ยงเซลล์แบบ 2 มิติ (2D culture assay).....	49
ผลการทดสอบด้วยวิธีการห่อหุ้มเซลล์ด้วยไฮโดรเจล (Encapsulation assay).....	51
ผลการตรวจดูลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ .....	53
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ .....	56
สรุปผลการวิจัย.....	56
อภิปรายผล .....	56

ข้อเสนอแนะ .....	65
บรรณานุกรม .....	66
ภาคผนวก.....	76
แผนการดำเนินงาน.....	77
ประวัติผู้เขียน.....	80



## สารบัญตาราง

	หน้า
ตาราง 1 โกรทแฟคเตอร์ที่เกี่ยวข้องกับการหายของบาดแผล .....	19
ตาราง 2 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้จากวิธีวิเคราะห์เอ็มทีทีในการทดสอบ Indirect Cytotoxicity Assay, n=9.....	48
ตาราง 3 ค่าฟลูออเรสเซนส์จากการทดสอบด้วยวิธีวิเคราะห์ชาซูรินในการทดสอบด้วยวิธีการเลี้ยงเซลล์แบบ 2 มิติ , n=9.....	51
ตาราง 4 ค่าฟลูออเรสเซนส์สัมพันธ์จากการทดสอบด้วยวิธีวิเคราะห์ชาซูรินในการทดสอบด้วยวิธีการห่อหุ้มเซลล์ด้วยไฮโดรเจล, n=9.....	52
ตาราง 5 แผนการดำเนินงานวิจัย .....	77



## สารบัญรูปภาพ

หน้า

ภาพประกอบ 1 กรอบแนวคิดงานวิจัย .....	4
ภาพประกอบ 2 แสดงระยะของหลอดเลือด (A) ก่อนการเกิดการขยายตัวของหลอดเลือด (B) การขยายตัวของหลอดเลือดจากผลของฮีปตามีนและโพรสตาแกลนดิน เกิดช่องว่างทำให้พลาสมาและเซลล์เม็ดเลือดขาวออกจากหลอดเลือด .....	9
ภาพประกอบ 3 แสดงระยะอักเสบ พบเซลล์เยื่อบุผิวเริ่มแบ่งตัวได้ลิ้มเลือดและมีเซลล์ลิ้มโฟไซต์บริเวณแผล .....	11
ภาพประกอบ 4 แสดงระยะการเพิ่มจำนวน ชั้นเยื่อบุผิวมีการเจริญภายใต้ลิ้มเลือด พบการสร้างเส้นเลือดฝอยใหม่และมีการสร้างคอลลาเจนบริเวณแผล .....	12
ภาพประกอบ 5 แสดงช่วงท้ายของระยะเพิ่มจำนวนที่มีการหนาตัวมากขึ้นของชั้นเยื่อบุผิวและการเรียงตัวของเส้นใยคอลลาเจนที่หนาแน่นและไม่เป็นระเบียบ .....	13
ภาพประกอบ 6 แสดงระยะการสร้างใหม่ มีการเรียงตัวของเส้นใยคอลลาเจนใหม่และการหนาตัวเป็นปกติของชั้นเยื่อบุผิว .....	14
ภาพประกอบ 7 แสดงภาพไฟโบรบลาสต์แอล 929 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ .....	25
ภาพประกอบ 8 แสดงการกำหนดกลุ่มตัวอย่างในงานวิจัยครั้งนี้ .....	35
ภาพประกอบ 9 แสดงการเกิดปฏิกิริยาในขั้นตอนการปรับปรุงโครงสร้างกรดไฮยาลูโรนิกด้วย เมทาคริเลตแอนไฮไดรด์ <sup>(84)</sup> .....	37
ภาพประกอบ 10 แสดงกราฟผลการทำโปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโคปี ของเมทาคริเลตไฮยาลูโรนิกแอซิด โดย a คือพีคของโปรตอนของเมทิลจากหมู่วินิล b คือพีคของโปรตอนของเมทิลจากหมู่วินิล c คือพีคของโปรตอนเมทิลจากกรดไฮยาลูโรนิก .....	38
ภาพประกอบ 11 แสดงขั้นตอนการสังเคราะห์เมทาคริเลตไฮยาลูโรนิกแอซิดไฮโดรเจล .....	40
ภาพประกอบ 12 แสดงขั้นตอนการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์โดยอ้อม .....	41
ภาพประกอบ 13 แสดงขั้นตอนการทดสอบด้วยวิธีการเลี้ยงเซลล์แบบ 2 มิติ .....	42
ภาพประกอบ 14 แสดงขั้นตอนการทดสอบด้วยวิธีการห่อหุ้มเซลล์ด้วยไฮโดรเจล .....	44

ภาพประกอบ 15 ตัวอย่างผลการทดสอบหาปริมาณการเกิดการปรับปรุงโครงสร้าง ด้วยวิธี  
โปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโคปีในการสังเคราะห์ครั้งที่ 1..... 47

ภาพประกอบ 16 แผนภูมิแท่งแสดงผลการทดสอบ Indirect Cytotoxicity Assay ค่าที่แสดงคือ  
mean ± SD, n=9, โดยใช้สถิติ Kruskal-Wallis test ร่วมกับ Dunn's multiple comparisons test,  
p<0.05 โดย \* หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ p<0.05, \*\* หมายถึงมี  
ความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ p<0.01, \*\*\* หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมี  
นัยสำคัญทางสถิติที่ p<0.001, \*\*\*\* หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  
p<0.0001 ..... 49

ภาพประกอบ 17 กราฟแสดงผลการทดสอบ 2D Culture Assay, mean ± SD, n=9, โดยใช้สถิติ  
One-way ANOVA ร่วมกับ Tukey's multiple comparisons test, p<0.05 โดย \* หมายถึงมีความ  
แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ p<0.05, \*\* หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ  
ทางสถิติที่ p<0.01, \*\*\* หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ p<0.001, \*\*\*\*  
หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ p<0.0001 ..... 51

ภาพประกอบ 18 แผนภูมิแท่งแสดงผลการทดสอบ Encapsulation Culture Assay, mean ± SD,  
n=9, โดยใช้สถิติ Kruskal-Wallis test ร่วมกับ Dunn's multiple comparisons test ในการ  
วิเคราะห์ภายในกลุ่มทดลองและใช้สถิติ Mann Whitney test ในการวิเคราะห์ระหว่างกลุ่มทดลอง,  
p<0.05 โดย \* หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ p<0.05, \*\* หมายถึงมี  
ความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ p<0.01, \*\*\* หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมี  
นัยสำคัญทางสถิติที่ p<0.001, \*\*\*\* หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  
p<0.0001 ..... 53

ภาพประกอบ 19 แสดงตัวอย่างภาพถ่ายไฟโบรบลาสต์ 929 ที่เลี้ยงด้วยวิธีห่อหุ้มเซลล์ด้วย ไฮโดร  
เจลเป็นเวลา 12 วันและนำมาตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด A  
ภาพถ่ายที่กำลังขยาย 100 เท่า B-D ภาพถ่ายกำลังขยาย 500 เท่า E-F ภาพถ่ายที่กำลังขยาย  
1000 เท่า G-H ภาพถ่ายกำลังขยาย 2000 เท่า I ภาพถ่ายกำลังขยาย 5000 เท่า ..... 54

ภาพประกอบ 20 แสดงตัวอย่างภาพถ่ายไฟโบรบลาสต์แอล 929 ที่เลี้ยงด้วยวิธีห่อหุ้มเซลล์ด้วย  
ไฮโดรเจลเป็นเวลา 12 วันและนำมาตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ภาพ  
ทางซ้ายเป็นภาพของเซลล์ในกลุ่มที่เลี้ยงร่วมกับไฮโดรเจลที่ได้รับการฉายแสงสีฟ้าเป็นเวลา 60

วินาทีที่กำลังขยาย 1000X ภาพทางขวาเป็นภาพของเซลล์ในกลุ่มที่เลี้ยงร่วมกับไฮโดรเจลที่ได้รับ การฉายแสงสีฟ้าเป็นเวลา 90 วินาทีที่กำลังขยาย 2000X.....	55
ภาพประกอบ 21 แสดงตัวอย่างภาพถ่ายภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดของไฟ โบรบลาสต์แอล 929 ที่เลี้ยงด้วยวิธีเลี้ยงแบบ 2 มิติที่กำลังขยาย 1000 เท่า.....	55
ภาพประกอบ 22 เอกสารรับรองจริยธรรมโครงการวิจัยที่ทำในมนุษย์ จากคณะกรรมการจริยธรรม สำหรับพิจารณาโครงการวิจัยที่ทำในมนุษย์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ หมายเลขรหัสโครงการ SWUEC-479/2563X .....	78





## บทที่ 1

### บทนำ

#### ภูมิหลัง

การเข้าใจถึงกลไกการตอบสนองของเซลล์ต่อวัสดุโครงร่างทางชีวภาพเป็นหัวใจสำคัญที่จะนำไปสู่การพัฒนาในงานด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ (Tissue engineering) ในปัจจุบันได้มีการนำความรู้ทางด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อมาใช้ในการรักษารอยโรคทั้งในเนื้อเยื่ออ่อนและในเนื้อเยื่อแข็ง อาทิ บริเวณเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนซึ่งเป็นเนื้อเยื่อที่มีเซลล์กระดูกอ่อนอาศัยอยู่น้อยและไม่พบหลอดเลือดภายในเนื้อเยื่อนี้ เมื่อเกิดรอยโรคขึ้นจึงมีการซ่อมแซมด้วยตัวเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนเองได้ยากหนึ่งในวิธีการรักษาที่ใช้ความรู้ทางด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ คือการเก็บเกี่ยวเซลล์กระดูกอ่อนของคนไข้จากบริเวณที่ไม่เป็นโรค ไปคัดแยกและเพิ่มจำนวนในห้องปฏิบัติการจนได้ปริมาณเซลล์กระดูกอ่อนที่มากพอ จากนั้นจึงนำกลับมาปลูกถ่ายยังบริเวณกระดูกอ่อนที่เป็นรอยโรค เพื่อช่วยให้เกิดการซ่อมแซมรวมไปถึงการสร้างใหม่เพื่อทดแทนเนื้อเยื่อที่เสียไป<sup>(1)</sup> ในทางทันตกรรมได้มีการใช้ความรู้ทางด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อมาประกอบการรักษาทั้งในงานเนื้อเยื่อแข็ง เช่น การปลูกกระดูกโดยใช้วัสดุทางชีวภาพจากสิ่งมีชีวิตสปีชีส์อื่น (Xenogenic bone graft) ร่วมกับการใช้โกรทแฟกเตอร์ชนิดบีเอ็มพี (Bone morphogenetic protein; BMP) ชักนำให้เกิดการสร้างกระดูกในบริเวณที่กระดูกขากรรไกรละลายตัวไปเพื่อเตรียมเนื้อเยื่อก่อนการรักษาด้วยรากฟันเทียม ในส่วนของการผ่าตัดในบริเวณเนื้อเยื่ออ่อนเพื่อเตรียมเนื้อเยื่อก่อนการรักษาด้วยรากฟันเทียมก็มีการนำความรู้ทางวิศวกรรมเนื้อเยื่อมาประยุกต์ใช้ เช่น การนำวัสดุโครงร่างทางชีวภาพหรือที่เรียกว่า แสคเฟอลด์ (Scaffold) จากผิวหนังที่ทำการกำจัดเซลล์ออก (Acellular dermal matrix) มาใช้ในการผ่าตัดเพื่อปรับปรุงเหงือกที่มีปริมาณเคราตินและมีความหนาน้อย โดยตัววัสดุโครงร่างทางชีวภาพนี้จะชักนำให้เซลล์ไฟโบรบลาสต์และเซลล์เยื่อบุผิวเข้ามาเพิ่มจำนวนตามโครงร่างของแสคเฟอลด์และประสานกันกับวัสดุเป็นเนื้อเยื่อเหงือกที่มีเคราตินเหมาะสมต่อการต้านทานแรงบดเคี้ยว ซึ่งเป็นการลดการผ่าตัดในตำแหน่งเพดานปากเพื่อนำเหงือกมาปลูกยังตำแหน่งรอยโรค ทำให้ความเสี่ยงที่จะเกิดผลข้างเคียงจากการผ่าตัดลดลง

วิศวกรรมเนื้อเยื่อนั้นเป็นวิชาที่นำหลักการและวิธีการของวิศวกรรมและวิทยาศาสตร์ชีวภาพมาประยุกต์ใช้เพื่อเสริมสร้างความเข้าใจในความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและการทำงานในภาวะปกติและภาวะที่เป็นโรคของเนื้อเยื่อ รวมไปถึงการพัฒนาสิ่งทดแทนเพื่อนำมาซ่อมแซมหรือปรับปรุงการทำงานของเนื้อเยื่อให้ดียิ่งขึ้น<sup>(2)</sup> การทำงานในสายวิศวกรรมเนื้อเยื่อนั้นใช้ความรู้

หลากหลายสาขาที่เกี่ยวข้องกับองค์ความรู้ของเซลล์ วัสดุชีวภาพ (Biomaterials) หรือสแคฟโฟลด์ (Scaffold) ปัจจัยทางเคมี (Chemical factors) และกระบวนการทางวิศวกรรม (Engineering methodology)

ไฮโดรเจล (hydrogel) เป็นหนึ่งในสแคฟโฟลด์ที่ได้รับความนิยมเป็นอย่างมาก เนื่องด้วยไฮโดรเจลเป็นพอลิเมอร์ที่มีโครงสร้างเป็นร่างแหในสามมิติ มีรูพรุน และความสามารถในการดึงดูดน้ำ เมื่อไฮโดรเจลสัมผัสกับน้ำจะเกิดการพองตัวและเก็บกักน้ำไว้ในปริมาณมาก ด้วยความที่ไฮโดรเจลมีโครงสร้างที่เป็นรูพรุนและกักเก็บน้ำได้ในปริมาณมาก จึงมีการนำมาใช้เป็นระบบในการขนส่งยา (Drug delivery system)<sup>(3)</sup> เพื่อช่วยให้มีการนำส่งยาในตำแหน่งที่เฉพาะเจาะจงได้ดียิ่งขึ้น ไฮโดรเจลสามารถผลิตได้จากสารตั้งต้นหลายชนิด โดยไฮโดรเจลที่ผลิตจากกรดไฮยาลูโรนิกเป็นหนึ่งในชนิดที่ได้รับความนิยม เนื่องจากมีส่วนประกอบคล้ายกับสารแมทริกซ์ระหว่างเซลล์ มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพสูง สามารถสลายตัวได้โดยเอนไซม์ภายในร่างกายมนุษย์ และสามารถพัฒนาปรับปรุงคุณสมบัติให้เหมาะสมกับการใช้งานในประเภทต่างๆ ได้ดี เช่น การพัฒนาให้มีลักษณะการใช้งานในรูปแบบฉีด หรือปรับปรุงให้มีลักษณะคล้ายฟองน้ำ เป็นต้น<sup>(4)</sup> แต่จากการศึกษาของ Trakiattikul (2018)<sup>(5)</sup> และ Areevijit (2019)<sup>(6)</sup> พบว่าการสังเคราะห์ไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกยังมีข้อจำกัดบางประการในขั้นตอนการเตรียมสารตัวอย่างเช่น ปริมาณการเกิดการปรับปรุง (Degree of modification) ในการสังเคราะห์พอลิเมอสายหลัก ที่มีค่าไม่แน่นอนและระยะเวลาในการก่อตัวเป็นเจล (Gelation time) ยังไม่สามารถควบคุมให้ได้เวลาที่เท่ากันในแต่ละครั้งของการสังเคราะห์ เนื่องมาจากขั้นตอนการเตรียมที่มีความซับซ้อนและต้องการความแม่นยำสูง<sup>(6)</sup> ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะพัฒนาไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกที่สามารถควบคุมสมบัติที่เกี่ยวข้องกับการนำไปใช้จริงทางคลินิก ได้แก่ ระยะเวลาการก่อตัวเป็นเจลและความเข้ากันได้ทางชีวภาพกับเซลล์ โดยหากสามารถควบคุมปัจจัยด้านนี้ได้จะทำให้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในคลินิกได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น ในการศึกษาของ Chaopanitcharoen (2021)<sup>(7)</sup> ได้มีการศึกษาสมบัติทางกายภาพของไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกที่มีการพอลิเมอไรเซชันโดยแสงสีฟ้าที่ได้รับการบ่มด้วยแสงสีฟ้าเป็นระยะเวลาต่างๆ ผลที่ได้พบว่าที่ระยะเวลาการบ่มที่ 60 วินาทีและ 90 วินาที ไฮโดรเจลที่ก่อตัวแล้วมีคุณสมบัติทางกายภาพที่ดี มีรูพรุนที่มีขนาดใกล้เคียงกันทั่วตลอดทั้งไฮโดรเจลและมีความสามารถในการพองตัวเมื่อสัมผัสกับน้ำ กักเก็บน้ำได้ดี และสามารถย่อยสลายได้หมดเมื่อใส่เอนไซม์ไฮยาลูโรนเดสลงไปในไฮโดรเจล<sup>(7)</sup> สมบัติเหล่านี้เป็นสมบัติของสแคฟโฟลด์ที่ดีซึ่งเชื่อว่าจะช่วยให้เซลล์สามารถเจริญเติบโตได้เมื่อนำมาเลี้ยงร่วมกับไฮโดรเจล<sup>(8-10)</sup> ในงานวิจัยครั้งนี้จะเป็นการศึกษาต่อยอดจากงานวิจัยของ Chaopanitcharoen

(2021)<sup>(7)</sup> โดยจะทำการศึกษาความเข้ากันได้ทางชีวภาพ (Biocompatibility) ของไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกที่มีการพอลิเมอไรเซชันโดยแสงสีฟ้ากับเซลล์ไลน์ไฟโบรบลาสต์แอล 929 ซึ่งเป็นเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากหนูซึ่งถูกแนะนำใช้ในการทดสอบอุปกรณ์ทางการแพทย์ในห้องปฏิบัติการตามมาตรฐานขององค์การมาตรฐานสากล (ISO 10993-5) โดยหวังว่าการศึกษานี้จะสามารถนำไปต่อยอดเพื่อสร้างวัสดุโครงร่างทางชีวภาพที่มีคุณสมบัติที่ดีเพื่อในการรักษารอยโรคบริเวณเนื้อเยื่ออ่อนและ/หรือเนื้อเยื่อแข็งต่อไป

### **วัตถุประสงค์ของงานวิจัย**

เพื่อศึกษาความเข้ากันได้ทางชีวภาพของเซลล์ไฟโบรบลาสต์แอล 929 กับไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกที่มีการพอลิเมอไรเซชันโดยแสงสีฟ้า

### **ความสำคัญของงานวิจัย**

เพื่อพัฒนาไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกชนิดที่มีการพอลิเมอไรเซชันจากการบ่มด้วยแสงสีฟ้าที่มีสมบัติทางกายภาพที่เหมาะสม มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพกับเซลล์ไลน์ไฟโบรบลาสต์แอล 929 เพื่อนำไปใช้ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อต่อไป

### **ขอบเขตของงานวิจัย**

ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้เป็นการศึกษาวิจัยพื้นฐาน (Basic research) ในห้องปฏิบัติการเพื่อพัฒนาไฮโดรเจลชนิดที่มีการพอลิเมอไรเซชันโดยแสงสีฟ้าที่มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพ (Biocompatibility) ที่ดีเพื่อนำไปใช้ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อต่อไป ในงานวิจัยครั้งนี้จะทำการศึกษาความเข้ากันได้ทางชีวภาพของไฮโดรเจลกับไฟโบรบลาสต์แอล 929 ผ่านการทดสอบสามารถทดสอบ อันได้แก่ ความเป็นพิษต่อเซลล์โดยอ้อม การเจริญเติบโตของเซลล์เมื่อเลี้ยงร่วมกับไฮโดรเจลในลักษณะสองมิติและสามมิติ และการตรวจดูลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ผ่านกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope; SEM) โดยในการศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์และการตรวจดูลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์จะทำการเปรียบเทียบเซลล์ที่เลี้ยงร่วมกับไฮโดรเจลที่ได้รับการฉายแสงเป็นเวลา 60 วินาทีและ 90 วินาที

## ตัวแปรที่ศึกษา

ตัวแปรต้น : ไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกที่มีการพอลิเมอไรเซชันโดยแสงสีฟ้า

ตัวแปรตาม : ความเข้ากันได้ทางชีวภาพของไฟโบรบลาสต์แอล 929 กับไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกที่มีการพอลิเมอไรเซชันโดยแสงสีฟ้า

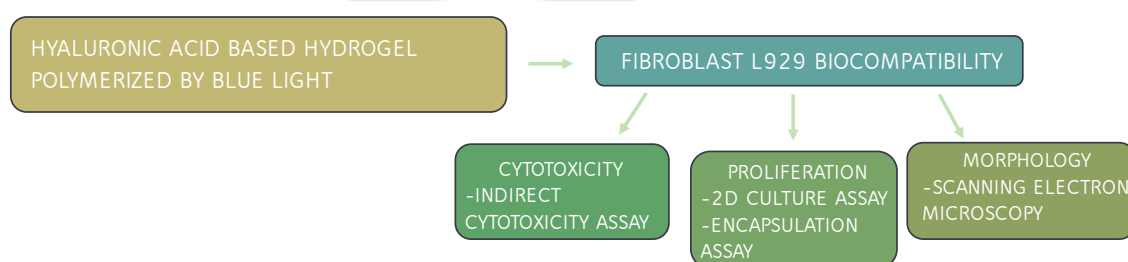
ตัวแปรควบคุม : อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดดีเอ็มอีเอ็ม (Dulbecco's modified eagle's medium: DMEM) งานเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม สำหรับเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5%

## นิยามศัพท์เฉพาะ

1. ไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกที่มีการพอลิเมอไรเซชันโดยแสงสีฟ้า หมายถึง วัสดุทางชีวภาพที่สามารถย่อยสลายได้ชนิดไฮโดรเจลที่มีพอลิเมอไรเซชันหลักคือกรดไฮยาลูโรนิกที่ปรับปรุงโครงสร้างด้วยเมทาคริลเลตแอนไฮไดรด์และครอสลิงค์เป็นโครงร่างสามมิติด้วยแอลอีพีซึ่งถูกกระตุ้นปฏิกิริยาโดยแสงสีฟ้า

2. ไฟโบรบลาสต์แอล 929 หมายถึง เซลล์ไลน์ไฟโบรบลาสต์ที่เก็บจากเนื้อเยื่อเกี่ยวพันใต้ผิวหนังของหนูเพศผู้อายุ 100 วัน ที่จัดจำหน่ายโดยบริษัทไบโอมิเดียไทยแลนด์ ซึ่งเป็นเซลล์ไลน์ไฟโบรบลาสต์ที่ใช้เป็นมาตรฐานในการทดสอบอุปกรณ์การแพทย์ทางห้องปฏิบัติการตามคำแนะนำขององค์การมาตรฐานสากล (ISO 10993-5)

## กรอบแนวคิดงานวิจัย



ภาพประกอบ 1 กรอบแนวคิดงานวิจัย

### สมมติฐานในการวิจัย

สมมติฐานหลัก : ไม่มีความแตกต่างกันในแง่ความเข้ากันได้ทางชีวภาพของไฟโบรบลาสต์แอล 929 ในแต่ละกลุ่มทดสอบ

สมมติฐานรอง : มีความแตกต่างกันในแง่ความเข้ากันได้ทางชีวภาพของเซลล์ไลน์ไฟโบรบลาสต์แอล 929 ในแต่ละกลุ่มทดสอบ



## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในการวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง และได้นำเสนอตามหัวข้อต่อไปนี้

การหายของบาดแผล (Wound healing)

เซลล์ไฟโบรบลาสต์ (Fibroblast cell)

วิศวกรรมเนื้อเยื่อ (Tissue engineering)

ไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิก (Hyaluronic acid based hydrogel)

การทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพ (Biocompatibility test)

#### การหายของบาดแผล (Wound healing)

เมื่อเกิดการบาดเจ็บและทำลายความต่อเนื่องของเนื้อเยื่อขึ้นไม่ว่าในระดับใด ร่างกายจะเกิดการตอบสนองด้วยการซ่อมแซมหรือเกิดการเจริญทดแทนขึ้นเพื่อให้เนื้อเยื่อในตำแหน่งที่ถูกทำลายกลับมาทำหน้าที่ได้ใกล้เคียงปกติอีกครั้ง การหายของบาดแผลในเนื้อเยื่อชนิดต่างๆนั้นถึงจะมีความแตกต่างแต่ก็ใกล้เคียงกัน<sup>(11)</sup> โดยสาเหตุของการบาดเจ็บอาจเกิดจากอุบัติเหตุ สารเคมี การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิหรือการผ่าตัด เป็นต้น การบาดเจ็บต่อเนื้อเยื่อหรือที่เรียกว่าบาดแผลนั้นสามารถแบ่งได้เป็น 4 กลุ่มตามระดับของความสะอาดของแผล<sup>(12)</sup> ดังนี้

แผลสะอาด (Clean wound) หมายถึงแผลที่ปราศจากการติดเชื้อ การอักเสบ และไม่ได้อยู่ในบริเวณทางเดินอาหาร ทางเดินหายใจ หรือระบบขับถ่ายและระบบสืบพันธุ์<sup>(12)</sup> ซึ่งแผลประเภทนี้มักเป็นแผลที่เกิดจากการผ่าตัดในบริเวณที่ไม่ใช่ทางเดินอาหาร ทางเดินหายใจ หรือระบบขับถ่ายและระบบสืบพันธุ์ ซึ่งมีแนวโน้มที่จะหายด้วยการหายของแผลแบบปฐมภูมิ (Primary wound healing) ซึ่งจะกล่าวถึงในภายหลัง

แผลสะอาดปนเปื้อน (Clean-contaminated wound) หมายถึงแผลที่มีการติดต่อกับสิ่งแวดล้อมที่มีการปนเปื้อนไม่มาก มีการสัมผัสกับเชื้อประจำถิ่นเป็นส่วนใหญ่และอยู่ในวิสัยที่ควบคุมได้ การผ่าตัดภายในช่องปากจะถือเป็นการทำให้เกิดแผลในกลุ่มนี้ รวมถึงการเกิดแผลผ่าตัดในบริเวณทางเดินอาหาร ทางเดินหายใจและระบบขับถ่าย<sup>(12)</sup> ซึ่งมีแนวโน้มจะมีการหายของแผลแบบปฐมภูมิ แผลในกลุ่มนี้จำเป็นต้องมีการติดตามอาการอย่างใกล้ชิดหากทำหัตถการที่

เกี่ยวข้องกับการสร้างเนื้อเยื่อเพื่อทดแทนเนื้อเยื่อบริเวณรอยโรค (Tissue regeneration) เนื่องจากบริเวณที่ทำการตัดการจะสัมผัสกับสิ่งแวดล้อมที่มีการปนเปื้อนอยู่ตลอดเวลา

แผลปนเปื้อน (Contaminated wound) หมายถึงแผลที่มีการปนเปื้อนกับเชื้อค่อนข้างมากและ/หรือมีการปนเปื้อนของสิ่งแปลกปลอม (Foreign body) บริเวณบาดแผลด้วย<sup>(13)</sup> แผลประเภทนี้มักพบจากการเกิดอุบัติเหตุที่มีการฉีกขาดของเนื้อเยื่อ ซึ่งมีแนวโน้มที่จะมีการหายของแผลแบบทุติยภูมิ (Secondary wound healing)

แผลติดเชื้อ (Infected wound) หมายถึงแผลที่มีการก่อตัวของเชื้อในปริมาณมาก มักพบร่วมกับการมีหนองในบริเวณบาดแผล แผลในกลุ่มนี้ควรได้รับการรักษาโดยการผ่าตัดร่วมกับการให้ยาฆ่าเชื้อโดยเร็ว เพราะอาจทำให้เกิดการติดเชื้อในกระแสเลือด (Septicemia) ได้<sup>(14)</sup>

ในการทำการตัดการที่เกี่ยวข้องกับการผ่าตัดนั้นผู้ทำการตัดการจำเป็นต้องมีความรู้ความเข้าใจถึงลักษณะและการจัดการกับบาดแผลแต่ละประเภท เพื่อที่จะเตรียมบาดแผลให้อยู่ในภาวะที่เหมาะสมแก่การหายของแผล ดังนั้นการเข้าใจถึงขั้นตอนและหลักการของการหายของแผลจึงเป็นสิ่งที่สำคัญ

### การหายของชั้นเยื่อบุผิว (Epithelialization)

ชั้นเยื่อบุผิวในบริเวณช่องปากและผิวหนังจะประกอบด้วยเซลล์รูปร่างแบนเรียงตัวกันหลายชั้น (Stratified squamous epithelium) ในภาวะปกติเซลล์ในชั้นฐาน (Basal cell layer) ของเยื่อบุผิวนั้นจะมีการเพิ่มจำนวนหรือที่เรียกว่าการแบ่งเซลล์ในระดับที่ต่ำ และเกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเพื่อทดแทนเซลล์ในชั้นถัดขึ้นมา อาจกล่าวได้ว่าเซลล์เยื่อบุผิวนั้นมีความสามารถในการแบ่งเซลล์อยู่ หนึ่งในกลไกสำคัญที่ควบคุมอัตราการแบ่งเซลล์ของเซลล์เยื่อบุผิวนั้นเรียกว่าการยับยั้งด้วยการสัมผัส (Contact inhibition)<sup>(15)</sup> โดยตัวรับสัมผัสบนผิวเซลล์เมื่อได้รับการกระตุ้นโดยการสัมผัสกับเซลล์ข้างเคียง จะส่งสัญญาณเพื่อยับยั้งกระบวนการภายในวัฏจักรเซลล์เพื่อหยุดการเพิ่มจำนวนของเซลล์เยื่อบุผิว ซึ่งปรากฏการณ์นี้สามารถพบเจอได้ในห้องปฏิบัติการเช่นกัน เห็นได้จากเมื่อเรานำเซลล์เยื่อบุผิวมาเลี้ยงในจานเลี้ยงเซลล์ในภาวะที่เหมาะสมเซลล์จะแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนขึ้น เมื่อเซลล์เพิ่มจำนวนจนใกล้เต็มจานเลี้ยงเซลล์ (Confluency) จะเกิดการยับยั้งด้วยการสัมผัสขึ้น ทำให้เซลล์หยุดการแบ่งเซลล์ภายในจานเลี้ยงเซลล์ ลักษณะนี้จะพบเจอในการเลี้ยงเซลล์เยื่อบุผิวที่เป็นเซลล์ปกติในการเลี้ยงเซลล์แบบ 2 มิติ ตัวอย่างการเกิดการยับยั้งด้วยการสัมผัสในทางคลินิก เช่น เมื่อเกิดการติดต่อบริเวณช่องปากและโพรงอากาศแม็กซิลารีภายหลังการถอนฟัน (Oroantral communication) เยื่อบุผิว

บริเวณช่องปากและบริเวณฐานของโพรงอากาศแม็กซิลารีจะเกิดการบาดเจ็บขึ้น ทำให้มีการแบ่งตัวของเยื่อบุผิวทั้ง 2 หากบริเวณที่มีการติดต่อบริเวณช่องปากและโพรงอากาศแม็กซิลารีมีขนาดใหญ่ เซลล์เยื่อบุผิวทั้ง 2 จะแบ่งเซลล์จนมาสัมผัสกันก่อนที่จะแบ่งเซลล์ไปถึงยังขอบแผลอีกฝั่ง ทำให้เกิดการยับยั้งด้วยการสัมผัสขึ้นและเกิดเป็นทางเชื่อมบริเวณช่องปากและโพรงอากาศแม็กซิลารีขึ้น (Oroantral fistula) ซึ่งจะคงอยู่ไปตลอด หากไม่ได้รับการรักษาโดยการผ่าตัด

เมื่อเกิดการบาดเจ็บจะเกิดการแยกจากกันของเซลล์ภายในชั้นเยื่อบุผิว เซลล์เยื่อบุผิวที่อยู่บริเวณขอบแผลทั้ง 2 ฝั่งจะเกิดการเพิ่มแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนและเคลื่อนเข้าหากัน จนเมื่อเซลล์เยื่อบุผิวสัมผัสกันจะเกิดการยับยั้งการแบ่งเซลล์ขึ้น บาดแผลประเภทที่มีขอบเขตอยู่ภายในชั้นเยื่อบุผิวเพียงอย่างเดียวหรือที่เรียกว่าแผลถลอกนั้น (Abrasions) การหายก็จะเกิดจากการแบ่งเซลล์ของเซลล์เยื่อบุผิวที่อยู่โดยรอบบาดแผลนั้น แต่ในบาดแผลที่ลึกจนถึงเนื้อเยื่อในชั้นใต้เยื่อบุผิวซึ่งเป็นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่มีหลอดเลือดอยู่ การบาดเจ็บในชั้นนี้จะทำให้เกิดการฉีกขาดของเส้นเลือดขึ้น ในส่วนการหายของเยื่อบุผิวในกรณีนี้นั้นจะเกิดขึ้นหลังจากเลือดเริ่มหยุดไหลและมีลิ่มเลือดปกคลุมบริเวณแผล เซลล์เยื่อบุผิวจะแบ่งตัวไปบนชั้นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันใต้ต่อลิ่มเลือดจนไปถึงเยื่อบุผิวอีกฝั่งของบาดแผล<sup>(16)</sup>

#### ระยะของการหายของแผล (Phases of wound healing)

การหายของแผลจะเกิดขึ้นในรูปแบบที่คล้ายคลึงกันไม่ว่าการบาดเจ็บจะเกิดจากสาเหตุใด โดยจุดมุ่งหมายของการหายของแผลคือการบูรณะเนื้อเยื่อที่สูญเสียไปรวมถึงการทำให้เนื้อเยื่อนั้นกลับมาทำงานได้ใกล้เคียงปกติ การหายของแผลอาจแบ่งได้เป็น 3 ระยะหลักๆคือ ระยะอักเสบของแผล (Inflammatory phase) ระยะการเพิ่มจำนวน (Proliferation or fibroblast phase) และระยะการสร้างใหม่ (Remodeling phase)<sup>(11)</sup>

#### ระยะอักเสบของแผล (Inflammatory phase)

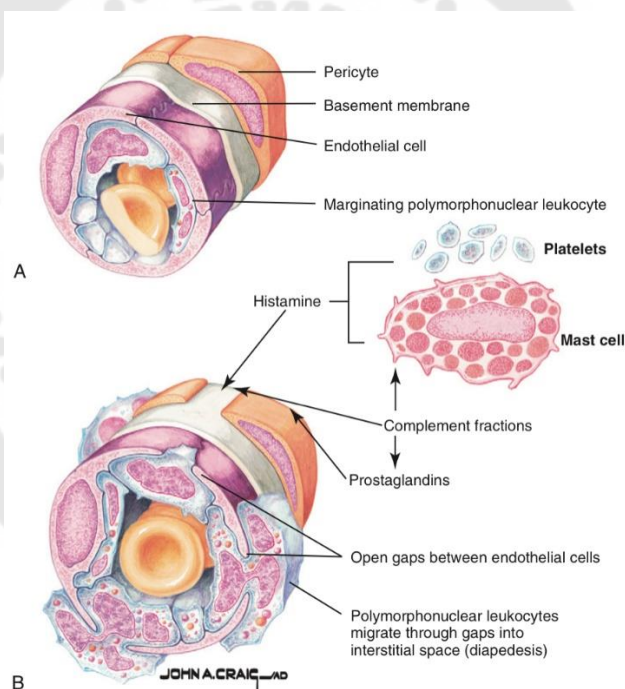
ระยะอักเสบของแผลจะเกิดขึ้นทันทีที่มีการบาดเจ็บของเนื้อเยื่อ เริ่มต้นจากการที่เมื่อมีเลือดออกแล้วเกล็ดเลือดมาเกาะตัวกันเพื่อหยุดการไหลของเลือด พร้อมทั้งมีการหลั่งสารเพื่อดึงดูดเม็ดเลือดขาวเข้ามาบริเวณแผล โดยภาพรวมในระยะอักเสบจะมีการเพิ่มขึ้นของสารน้ำและไซโตไคน์ (Cytokine) ภายในเนื้อเยื่อและมีเซลล์เม็ดเลือดขาวออกมาจากหลอดเลือดเพื่อกำจัดสิ่งแปลกปลอม<sup>(17)</sup> ระยะอักเสบจะกินเวลาประมาณ 3-5 วันในการบาดเจ็บปกติที่ไม่มีปัจจัยอื่นที่รบกวนการหายของแผลมาเกี่ยวข้อง ระยะนี้อักเสบจะแบ่งออกเป็น 2 ระยะย่อยได้แก่

#### ระยะของหลอดเลือด (Vascular phase)

เมื่อเกิดการบาดเจ็บขึ้น เส้นเลือดที่ได้รับความเสียหายจะเกิดการหดตัวเพื่อลดการสูญเสียเลือดและลดปริมาณเลือดที่มายังบริเวณแผลเพื่อเอื้อให้เกล็ดเลือดมารวมตัวได้



เร็วขึ้น หลังจากนั้นจะมีการหลั่งฮีสตามีน (Histamine) และโพรสตาแกลนดินอีวันและอีทู (Prostaglandin E<sub>1</sub> and E<sub>2</sub>) ส่งผลให้เกิดการขยายหลอดเลือดเพื่อให้เกิดช่องว่างระหว่างเยื่อบุผิวหลอดเลือดขึ้น เม็ดเลือดขาวและพลาสมาจะออกจากหลอดเลือดผ่านทางช่องว่างนี้ไปสะสมอยู่บริเวณเนื้อเยื่อรอบๆแผล เชื่อว่าการที่พลาสมาออกมาจากหลอดเลือดนั้นก็เพื่อเป็นการเจือจางเชื้อจากภายนอกร่างกายเรียกว่าการบวมน้ำ (Edema) ลักษณะเฉพาะของการอักเสบคือ ปวด (Dolor) บวม (Tumor) แดง (Rubor) ร้อน (Calor) และการสูญเสียการทำงานที่ (Functio laesa)<sup>(18)</sup> การที่อุณหภูมิบริเวณที่อักเสบสูงขึ้นหรือที่เรียกว่าร้อนและมีสีแดงมากขึ้นเกิดจากการขยายตัวของหลอดเลือดทำให้มีเลือดมายังบริเวณแผลมากขึ้น การบวมเกิดจากการที่สารน้ำไหลออกจากหลอดเลือดมาสะสมยังบริเวณแผล ส่วนความเจ็บปวดและสูญเสียการทำงานที่เกิดจากฮีสตามีน โพรสตาแกลนดินและแรงดันจากการบวมน้ำ



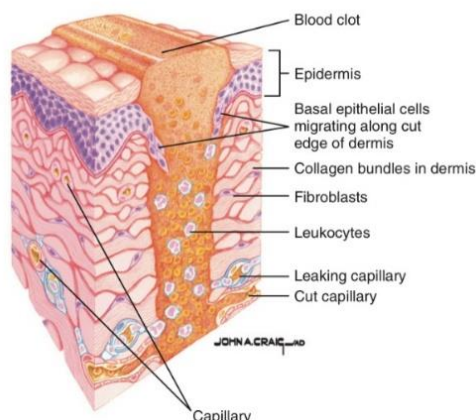
ภาพประกอบ 2 แสดงระยะของหลอดเลือด (A) ก่อนการเกิดการขยายตัวของหลอดเลือด (B) การขยายตัวของหลอดเลือดจากผลของฮีสตามีนและโพรสตาแกลนดิน เกิดช่องว่างทำให้พลาสมาและเซลล์เม็ดเลือดขาวออกจากหลอดเลือด

ที่มา Netter illustration from [www.netterimages.com](http://www.netterimages.com)

### ระยะของเซลล์ (Cellular phase)

ในระยะนี้คือระยะที่มีการทำงานของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน โดยเริ่มต้นจากการกระตุ้นของคอมพลีเมนต์ (Complement) โดยตัวหลักคือซีสามเอและซีห้าเอ (Complement C<sub>3a</sub> and C<sub>5a</sub>) ทำหน้าที่เป็นปัจจัยดึงดูดทางเคมี (Chemotactic factors) กระตุ้นให้เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิล (Neutrophil) มาเกาะบริเวณผนังของหลอดเลือด (Margination) และเกิดการแทรกตัวออกจากหลอดเลือดเข้าสู่บริเวณแผล (Diapedesis or extravasation) โดยนิวโทรฟิลจะเข้ามายังบริเวณแผลภายในไม่กี่นาทีหลังเกิดการบาดเจ็บ เมื่อเวลาผ่านไปหนึ่งถึงสองชั่วโมงเซลล์เม็ดเลือดขาวแมคโครฟาจ (Macrophage) จะเข้ามายังบริเวณแผล<sup>(19)</sup> โดยนิวโทรฟิลและแมคโครฟาจถือเป็นส่วนหนึ่งของระบบภูมิคุ้มกันโดยกำเนิด (Innate immunity) และท้ายที่สุดเมื่อเวลาผ่านไปเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ (Lymphocyte) จะตามมารวมตัวบริเวณแผล ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ (Adaptive immunity) จะเห็นได้ว่าการเปลี่ยนผ่านเซลล์ที่มาทำหน้าที่ในบริเวณแผลเมื่อเวลาผ่านไป ซึ่งเป็นผลมาจากการหลั่งไซโตไคน์ที่จำเพาะเพื่อดึงดูดเซลล์อย่างเป็นระบบ เมื่อนิวโทรฟิลพบเจอแบคทีเรียในแผลจะหลั่งเพอร์ออกไซด์ (Peroxide) และไลโซไซม์ (Lysozyme) ออกจากแกรนูโลภายในเซลล์ (Degranulation) ซึ่งมีส่วนประกอบหลักเป็นเอนไซม์ที่มีหน้าที่ย่อยโปรตีนเพื่อกำจัดแบคทีเรีย สิ่งแปลกปลอม รวมถึงเศษเซลล์หรือเนื้อเยื่อที่ตายแล้ว การกำจัดสิ่งแปลกปลอมนอกจากนิวโทรฟิลแล้ว แมคโครฟาจก็เป็นอีกหนึ่งเซลล์ที่มีบทบาทสำคัญเช่นกัน แมคโครฟาจยังมีหน้าที่ในการหลั่งไซโตไคน์เพื่อดึงดูดลิมโฟไซต์ รวมถึงนำแอนติเจนที่พบ (Antigen) ไปนำเสนอให้กับลิมโฟไซต์เพื่อชักนำให้เกิดการกำจัดเชื้อแบบจำเพาะต่อไป<sup>(11)</sup>

ในบางครั้งระยะอักเสบถูกเรียกเป็นระยะที่ล่าช้า (Lag phase) เพราะในระยะนี้ไม่มีการเพิ่มขึ้นของความแข็งแรงของแผล เนื่องจากมีการสร้างเส้นใยจำพวกคอลลาเจน (Collagen fiber) เพิ่มขึ้นน้อยมาก ปัจจัยหลักที่ค้ำจุนแผลในระยะนี้คือไฟบริน (Fibrin) ซึ่งมีความแข็งแรงน้อย



ภาพประกอบ 3 แสดงระยะอักเสบ พบเซลล์เยื่อบุผิวเริ่มแบ่งตัวใต้ลิ่มเลือดและมีเซลล์ลิมโฟไซต์ บริเวณแผล

ที่มา Netter illustration from www.netterimages.com

### ระยะการเพิ่มจำนวน (Proliferation or fibroblast phase)

เป็นระยะที่เกิดขึ้นช่วงประมาณ 3-12 วันหลังเกิดบาดแผล ระยะนี้จะเป็นการซ่อมแซมความต่อเนื่องให้เกิดขึ้นใหม่หลังจากที่เนื้อเยื่อถูกทำลายไปจากการเกิดบาดแผล และมีการสร้างเส้นเลือดใหม่รวมถึงการสร้างชั้นเยื่อบุผิว โกรทแฟคเตอร์ (Growth factor) ที่หลังจากแมคโครฟาจมีความสำคัญมากในระยะนี้ เนื่องจากจะกระตุ้นให้เกิดการอพยพของไฟโบรบลาสต์ การเพิ่มจำนวนและสร้างคอลลาเจน<sup>(20)</sup>

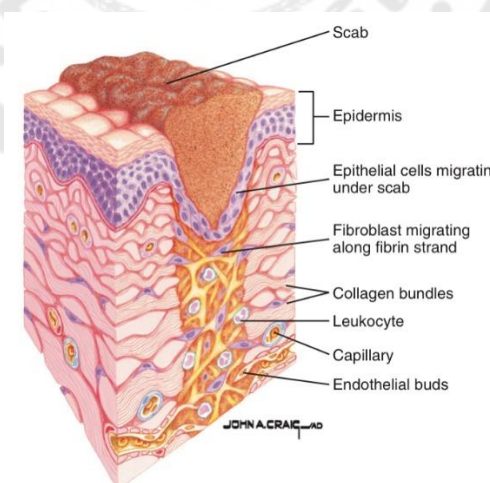
ใน 3-4 วันแรกหลังจากเกิดบาดแผล ภายในลิ่มเลือดจะพบร่างแหของไฟบรินซึ่งเป็นตำแหน่งที่เซลล์ไฟโบรบลาสต์จะหลั่งสารพื้น (Ground substance) ซึ่งเป็นสารประกอบจำพวกไกลแคน (Glycans) เช่น ไกลโคสะมิโนไกลแคน (Glycosaminoglycan) โปรตีโอไกลแคน (Proteoglycan) รวมถึงสร้างโทรโปคอลลาเจน (Tropocollagen) และไฟโบรเนกติน (Fibronectin)<sup>(21, 22)</sup> ซึ่งช่วยในการคงความเสถียรของไฟบริน การจดจำสิ่งแปลกปลอมของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันและชักนำให้แมคโครฟาจมากำจัดไฟบรินต่อไป อาจเรียกขั้นตอนนี้ว่าเป็นขั้นไฟโบรพลาสติก (Fibroplastic stage) ไฟโบรบลาสต์ในขั้นตอนนี้เกิดจากการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ต้นกำเนิด (Pluripotent stem cell) ซึ่งถูกกระตุ้นจากพีดีจีเอฟ (Platelet-derived growth factor; PDGF)<sup>(23)</sup> ที่หลังจากเกรนูลของเกล็ดเลือดและทีจีเอฟเบต้า (Transforming growth factor beta; TGF- $\beta$ ) ที่หลังจากแมคโครฟาจ ไฟโบรบลาสต์บางส่วนอาจมีการ

เปลี่ยนแปลงรูปร่างไปเป็นไมโอไฟโบรบลาสต์ (Myofibroblast)<sup>(24)</sup> ซึ่งสามารถหดตัวเพื่อทำให้บริเวณที่ต้องได้รับการรักษาดัน้อยลง<sup>(22)</sup>

อีกหน้าที่หนึ่งของไฟบริน คือเป็นส่วนหนึ่งในการช่วยสร้างหลอดเลือดฝอยซึ่งแตกแขนงออกมาจากหลอดเลือดบริเวณขอบแผล เมื่อหลอดเลือดฝอยเริ่มแข็งแรงจะมีการหลั่งพลาสมิน (Plasmin) ออกมาเพื่อย่อยสลายไฟบรินที่หมดความจำเป็นลง โกรทแฟคเตอร์สำคัญในขั้นตอนการสร้างหลอดเลือดคือวีอีจีเอฟ (Vascular endothelial growth factor; VEGF) และเอฟจีเอฟ (Fibroblast growth factor; FGF)<sup>(11)</sup>

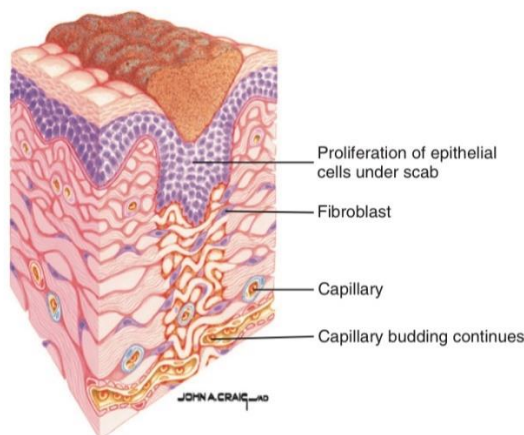
โทรโปคอลลาเจนที่สร้างจากไฟโบรบลาสต์จะเกิดการเชื่อมโยงข้าม (Cross-linking) กันเป็นคอลลาเจน ซึ่งในระยะแรกจะมีการเรียงตัวของเส้นใยคอลลาเจนที่ไม่เป็นระเบียบ แต่ก็ชัดเจนด้วยการสร้างในปริมาณที่มากเพื่อช่วยเพิ่มความแข็งแรงให้กับโครงสร้างบริเวณบาดแผล เมื่อผ่านระยะไฟโบรบลาสต์พบว่าความแข็งแรงของบาดแผลเพิ่มขึ้นอย่างมาก และคงอยู่ประมาณ 2-3 สัปดาห์ พบว่าถ้ามีแรงดึงกระทำที่แผลในช่วงแรกของการสร้างคอลลาเจน แผลจะฉีกขาดจากกันบริเวณแนวเดิมที่เกิดแผลในตอนแรก แต่ถ้าแรงดึงกระทำในช่วงหลังของการสร้างคอลลาเจน แผลจะฉีกขาดบริเวณรอยต่อของเส้นใยคอลลาเจนเก่าและใหม่<sup>(25)</sup>

เมื่อจบระยะการเพิ่มจำนวนแผลจะมีความแข็งแรงเพิ่มขึ้นเนื่องจากมีการสร้างคอลลาเจนในปริมาณมาก และแผลจะมีลักษณะสีแดงเนื่องจากมีการสร้างเส้นเลือดใหม่ ในระยะนี้แผลจะสามารถรับแรงได้ประมาณ 70% ของเนื้อเยื่อปกติ



ภาพประกอบ 4 แสดงระยะการเพิ่มจำนวน ชั้นเยื่อบุผิวมีการเจริญภายใต้ลิ้มเลือด พบการสร้างเส้นเลือดฝอยใหม่และมีการสร้างคอลลาเจนบริเวณแผล

ที่มา Netter illustration from [www.netterimages.com](http://www.netterimages.com)



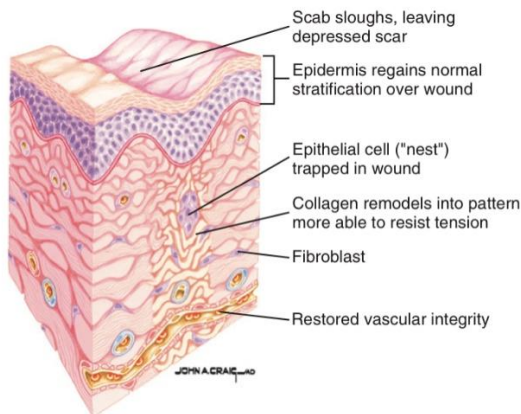
ภาพประกอบ 5 แสดงช่วงท้ายของระยะเพิ่มจำนวนที่มีการหนาตัวมากขึ้นของชั้นเยื่อผิวและมี การเรียงตัวของเส้นใยคอลลาเจนที่หนาแน่นและไม่เป็นระเบียบ

ที่มา Netter illustration from [www.netterimages.com](http://www.netterimages.com)

### ระยะการสร้างใหม่ (Remodeling phase)

เป็นระยะสุดท้ายในขั้นตอนการหายของแผล ซึ่งเป็นระยะที่กินเวลานานที่สุด อาจใช้เวลาตั้งแต่หลายสัปดาห์จนถึงหลายเดือน ขึ้นกับประเภทของเนื้อเยื่อที่เกิดการสร้างใหม่ ระยะนี้อาจเรียกอีกชื่อหนึ่งว่าระยะเจริญเต็มที่ (Maturation phase) ในระยะนี้เส้นใยคอลลาเจนที่ เรียงตัวไม่เป็นระเบียบ จะถูกย่อยสลายออกไปบางส่วน ด้วยเอนไซม์เมทริกซ์ เมทริกซ์ (Matrix metalloproteinase; MMP) และทดแทนด้วยเส้นใยคอลลาเจนที่เรียงเป็นระเบียบมากขึ้น ในแนวต้านต่อแรงดึงของแผล ช่วงระยะการเพิ่มจำนวนเส้นใยคอลลาเจนที่สร้างเกือบทั้งหมดจะ เป็นเส้นใยคอลลาเจนแบบที่สาม (Type III collagen) ซึ่งจะถูกแทนที่ด้วยเส้นใยคอลลาเจนแบบที่ หนึ่ง (Type I collagen) ซึ่งมีความยืดหยุ่นและรับแรงได้มากกว่าในระยะการสร้างใหม่นี้<sup>(17)</sup> ใน ระยะนี้ความแข็งแรงของแผลจะค่อยๆเพิ่มอย่างช้าๆ ไม่เพิ่มเร็วเหมือนในระยะก่อน ความแข็งแรง โดยรวมมักไม่มากไปกว่า 85% ของเนื้อเยื่อปกติ ในระยะนี้ปริมาณเส้นใยคอลลาเจนจะลดลง เนื่องจากการเรียงตัวมีประสิทธิภาพมากขึ้น และเริ่มมีการลดเมตาบอลิซึม (Metabolism) บริเวณ แผล ทำให้เลือดที่มายังบริเวณนี้ลดลง ส่งผลให้แผลมีความแข็งแรงน้อยลงรวมถึงมีสีแดงน้อยลงด้วย เส้นใยที่สร้างในขั้นตอนการหายของแผลจะเป็นเส้นใยคอลลาเจนเป็นหลัก ทำให้แผลเป็นหลังจาก เสร็จสิ้นขั้นตอนการหายแล้วมักสูญเสียความยืดหยุ่นของเนื้อเยื่อไป เนื่องจากขาดเส้นใยประเภท อื่น ในช่วงแรกของระยะการสร้างใหม่จะเกิดการหดตัวของแผลขึ้น (Wound contraction) ซึ่งกลไก

ยังไม่แน่ชัดว่าเกิดจากอะไร การหดตัวของแผลทำให้ขนาดของแผลเป็นเล็กลง แต่อาจกระทบต่อความสวยงามหรือการทำงานของอวัยวะได้หากแผลมีขนาดใหญ่



ภาพประกอบ 6 แสดงระยะการสร้างใหม่ มีการเรียงตัวของเส้นใยคอลลาเจนใหม่และการหนาตัวเป็นปกติของชั้นเยื่อบุผิว

ที่มา Netter illustration from [www.netterimages.com](http://www.netterimages.com)

### ปัจจัยที่ส่งผลต่อการหายของแผล (Factors that impair wound healing)

มีปัจจัย 4 อย่างที่ส่งผลต่อการหายของแผล ได้แก่ สิ่งแปลกปลอม (Foreign body) เนื้อเยื่อที่ตาย (Necrotic tissue) ภาวะขาดเลือด (Ischemia) และแรงดึงบริเวณแผล (Wound tension)<sup>(11)</sup>

#### สิ่งแปลกปลอม

สิ่งที่ถือเป็นสิ่งแปลกปลอมสำหรับร่างกายคือสิ่งที่ตัวรับของร่างกายไม่สามารถจดจำได้ว่าเป็นแอนติเจนของตัวเอง (Self antigen) ซึ่งอาจจะเป็นแบคทีเรีย เชื้อรา ฝุ่น หรือวัสดุเย็บแผล ซึ่งหากเป็นสิ่งแปลกปลอมจำพวกเชื้อจุลินทรีย์จะเกิดการเพิ่มจำนวนและทำให้เกิดการติดเชื้อ ซึ่งจะเกิดการทำลายเนื้อเยื่อในบริเวณที่ติดเชื้อตามมา<sup>(26)</sup> หากเป็นวัสดุอื่นๆถ้าหากสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ อาจก่อให้เกิดการตอบสนองโดยการอักเสบแบบเรื้อรัง หรือหากไม่สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ สิ่งแปลกปลอมนั้นอาจกลายเป็นสิ่งที่ขัดขวางการทำลายเชื้อจุลินทรีย์ของระบบภูมิคุ้มกันทำให้เกิดการติดเชื้อตามมาได้

#### เนื้อเยื่อที่ตาย

เนื้อเยื่อที่ตายนั้นจะขัดขวางการหายของแผล โดยขวางไม่ให้เซลล์เยื่อบุผิวหรือเซลล์ไฟโบรบลาสต์เพิ่มจำนวนเข้ามา โดยปกติเนื้อเยื่อที่ตายจะถูกกำจัดโดยเม็ดเลือดขาว

ชนิดฟาโกไซต์ (Phagocytes) หากเนื้อเยื่อที่ตายมีปริมาณมากจะทำให้ต้องใช้เวลาในการกำจัดนาน ส่งผลให้เกิดระยะอักเสบที่เรื้อรังของแผลขึ้น<sup>(27)</sup> ประการที่สองคือ เนื้อเยื่อที่ตายจะทำตัวเหมือนเป็นสิ่งแปลกปลอม กล่าวคือขัดขวางการกำจัดเชื้อจุลินทรีย์และเป็นแหล่งอาหารให้กับจุลินทรีย์ส่งผลให้เกิดการติดเชื้อตามมาได้

#### ภาวะขาดเลือด

การขาดเลือดนั้นส่งผลต่อการหายของแผลในหลายด้าน ทั้งทำให้ปริมาณแอนติบอดี (Antibody) และเม็ดเลือดขาวที่เดินทางไปยังบริเวณแผลมีน้อยลง รวมถึงยาฆ่าเชื้อก็จะเดินทางไปยังแผลได้น้อยลงด้วย ส่งผลให้เพิ่มโอกาสในการติดเชื้อมากขึ้น การขาดเลือดยังทำให้เนื้อเยื่อบริเวณแผลขาดสารอาหารและออกซิเจนทำให้เกิดเนื้อเยื่อที่ตายมีมากขึ้น<sup>(28)</sup> สาเหตุของการขาดเลือดนั้นมีหลายสาเหตุ อาทิ การเย็บแผลที่แน่นจนเกินไป การออกแบบแผ่นหึงอกที่ไม่ดี การที่มีแรงดันบริเวณแผลมากๆ เช่น การมีเลือดคั่ง (Hematoma) การมีโรคของหลอดเลือดโรคความดันต่ำ หรือภาวะโลหิตจาง<sup>(29)</sup>

#### แรงดึงบริเวณแผล

แรงดึงในแนวที่ออกจากแผลจะส่งผลให้แผลเกิดการฉีกขาดใหม่อีกครั้งได้<sup>(30)</sup> ซึ่งวิธีการที่จะช่วยลดปัญหานี้คือการเย็บแผล แต่หากทำการตัดไหมเร็วเกินไปแล้วเนื้อเยื่อบริเวณแผลยังไม่แข็งแรงเพียงพอที่จะต้านแรงดึงแยกจากกันของแผลอาจส่งผลให้แผลเกิดการเปิดใหม่ได้

#### การหายของแผลแบบปฐมภูมิ ทุตติภูมิ ตติภูมิ (Primary, secondary, and tertiary wound healing)

การหายของแผลแบบปฐมภูมิคือการหายของแผลชนิดที่ไม่มีการสูญเสียเนื้อเยื่อและขอบของแผลถูกวางกลับในตำแหน่งเดิมและยึดให้หนึ่งเพื่อให้เกิดการหาย การหายแบบนี้จะเกิดแผลเป็นน้อยและเกิดการหดตัวของแผลน้อย เพราะลดกระบวนการหายของชั้นเยื่อผิวหนังใหม่ลดพื้นที่ที่ต้องสร้างเส้นใยคอลลาเจน และลดเวลาในการสร้างใหม่<sup>(31)</sup> การหายของแผลแบบทุติภูมิเป็นการหายของแผลที่มีการหายไปของเนื้อเยื่อระหว่างขอบแผลแต่ละมั่ง ทำให้ไม่สามารถนำขอบแผลมาชิดกันในตำแหน่งที่ถูกต้องตามกายวิภาคได้ ทำให้ในการหายของแผลต้องมีการสร้างเยื่อผิวหนัง เส้นใยคอลลาเจน การหดตัวของแผล และการสร้างใหม่ของแผลที่มากกว่าการหายของแผลแบบปฐมภูมิ ส่งผลให้การหายของแผลใช้เวลานานกว่าและเกิดแผลเป็นมากกว่า<sup>(32)</sup> เช่น การหายของแผลหลังการถอนฟัน การหายของแผลแบบตติภูมิเป็นการเรียกการหายของแผลที่มีการปลูกเนื้อเยื่อทดแทนบริเวณที่สูญเสียไปพร้อมด้วย

### การหายของแผลบริเวณเยื่อเมือก (Wound healing of mucosa)

เนื้อเยื่อในบริเวณทางเดินอาหารนั้นจะสามารถแบ่งเป็นชั้นจากบริเวณที่ติดกับช่องว่างเข้าไปชั้นที่ลึกขึ้นได้ 4 ชั้น คือ ชั้นเยื่อเมือก (Mucosa) ซึ่งประกอบด้วยเยื่อบุผิว เนื้อเยื่อเกี่ยวพันชนิดโปร่ง (Lamina propria) และกล้ามเนื้อเรียบเรียงตัว 3-10 ชั้น โดยด้านในจะเรียงตัวในแนวยาวและด้านนอกเรียงตัวเป็นวง (Muscularis mucosae) ชั้นกล้ามเนื้อเรียบบางชั้นถือเป็นจุดสิ้นสุดของชั้นเยื่อเมือก ชั้นถัดมาคือชั้นใต้เยื่อเมือก (Submucosa) ซึ่งประกอบด้วยเนื้อเยื่อเกี่ยวพันชนิดหนาแน่น (Dense connective tissue) ภายในจะมีหลอดเลือดและปมประสาท (Meissner's plexus) มาเลี้ยงยังเนื้อเยื่อ ชั้นที่สามคือชั้นของกล้ามเนื้อ (Muscularis externa) ชั้นนี้จะประกอบด้วยกล้ามเนื้อเรียบเรียงตัว 2 ชั้นเช่นเดียวกับในชั้นเยื่อเมือกแต่แตกต่างกันที่ในชั้นนี้จะเป็นมัดกล้ามเนื้อที่มีความหนาแน่นมากและมีหน้าที่หลักในการทำให้เกิดการเคลื่อนที่ (Peristalsis) ของอาหาร (Bolus) ระหว่างกล้ามเนื้อเรียบทั้ง 2 ชั้นจะพบปมประสาทพาราซิมพาเทติก (Auerbach's plexus) ชั้นที่สี่คือชั้นของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันบางๆ (Serosa) ซึ่งในบางบริเวณจะพบเยื่อบุผิวปกคลุมชั้นนี้ได้ ในแต่ละบริเวณของทางเดินอาหารจะไม่ได้พบชั้นของเนื้อเยื่อครบทั้ง 4 ชั้น จำนวนชั้นของเนื้อเยื่อที่พบจะแตกต่างกันออกไปตามแต่ละบริเวณ<sup>(32)</sup> และในบางบริเวณเช่น บริเวณช่องปากจะพบกล้ามเนื้อลายภายใต้ชั้นใต้เยื่อเมือกได้เช่นกัน

การหายของบาดแผลที่เกิดขึ้นในทางเดินอาหารนั้นจะขึ้นกับความลึกของบาดแผล แต่หลักการโดยรวมนั้นจะใกล้เคียงกับการหายของบาดแผลดังที่ได้กล่าวไปแล้วข้างต้น หากบาดแผลที่เกิดขึ้นอยู่ในชั้นเยื่อเมือกการหายของบาดแผลจะเกิดขึ้นโดยเซลล์บริเวณฐานของชั้นเยื่อบุผิวที่อยู่บริเวณของแผล แบ่งตัวเข้าหากันจนเกิดการสัมผัสกันและมีการสร้างโครงสร้างที่ใช้ยึดกับเซลล์ข้างเคียงใหม่ (Tight junction) บาดแผลลักษณะนี้มักไม่เกิดการอักเสบและมีโอกาสน้อยที่จะเกิดแผลเป็นขึ้น แต่ในบางกรณีที่บาดแผลอยู่ในชั้นเยื่อเมือกแต่เกิดการอักเสบขึ้นสามารถพบได้ในบาดแผลที่มีสิ่งรบกวนการหาย เช่น มีการเกิดการกดทับบริเวณบาดแผลอย่างรวดเร็ว เป็นต้น<sup>(33)</sup> หากบาดแผลลึกถึงชั้นใต้เยื่อเมือกขั้นตอนการหายของบาดแผลมักเกิดขึ้นทั้ง 3 ระยะ และมักมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ไปเป็นไมโอไฟโบรบลาสต์เพื่อสร้างเส้นใยคอลลาเจนในขั้นตอนการหายของแผลและเหมือนกับๆ ในบริเวณอื่นหลังจากระยะทั้ง 3 ของการหายของบาดแผลเนื้อเยื่อมักไม่มีความแข็งแรงเท่ากับเนื้อเยื่อเดิมและมีแผลเป็นเกิดขึ้นด้วยเสมอ<sup>(34)</sup>

### การหายของแผลถอนฟัน (Healing of extraction socket)

หลังการถอนฟันออกไปจะเกิดกระบวนการหายของแผลทั้ง 3 ระยะตามที่ได้กล่าวไปข้างต้น โดยลักษณะการหายของแผลถอนฟันจะเป็นการหายแบบทุติยภูมิ<sup>(35)</sup> ภายในแผลหลังการ



ถอนฟันนั้นจะประกอบด้วยกระดูกส่วนเปลือกนอก (Cortical bone) ที่ปกคลุมไปด้วยเอ็นยึดปริทันต์ (Periodontal ligament) ที่ถูกทำให้ฉีกขาดจากการถอนฟันและพบเนื้อเยื่อเยื่อปริเวณเหงือกรอบๆตัวฟัน หลังถอนฟันจะมีเลือดออกซึ่งในภายหลังจะกลายเป็นลิ่มเลือดปกคลุมบริเวณแผลถอนฟันไว้ซึ่งจะช่วยลดการติดต่อบริเวณสิ่งแปลกปลอมภายในช่องปากกับบริเวณแผลถอนฟันโดยตรง ในสัปดาห์แรกจะเกิดการอักเสบและตามมาด้วยระยะการเพิ่มจำนวน มีการกำจัดเชื้อโรค รวมถึงเศษเซลล์ที่ตายโดยเม็ดเลือดขาวและมีการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ เริ่มมีการสร้างเส้นใยคอลลาเจนและเริ่มมีการสร้างหลอดเลือดใหม่ ในขณะเดียวกันเซลล์ในชั้นเยื่อปริเวณก็จะแบ่งเซลล์ลงมาตามแผลถอนฟันได้ต่อลิ่มเลือดจนมาถึงบริเวณที่เป็นเนื้อเยื่อแกรนูเลชัน (Granulation tissue) ซึ่งเป็นบริเวณที่เกิดการหายของแผลในระยะต่างๆและในช่วงท้ายของสัปดาห์แรกจะมีการรวมตัวของเซลล์ออสติโอคลาสต์ (Osteoclast) ที่บริเวณสันกระดูกของแผลถอนฟัน<sup>(36)</sup> ในสัปดาห์ที่สอง จะพบเนื้อเยื่อแกรนูเลชันในแผลถอนฟันเป็นจำนวนมากและเริ่มพบการสร้างเนื้อเยื่อกระดูกในบริเวณใกล้กับกระดูกส่วนเปลือกนอกของแผลถอนฟัน ในสัปดาห์ที่สาม เป็นต้นไปจะพบการละลายตัวของกระดูกส่วนเปลือกนอกและมีการสร้างกระดูกใหม่ภายในเนื้อเยื่อแกรนูเลชัน กระบวนการนี้จะเสร็จสมบูรณ์ในช่วง 4-6 เดือน ซึ่งระดับของเหงือกและกระดูกจะต่ำกว่าบริเวณข้างเคียงและไม่พบกระดูกส่วนเปลือกนอกภายในตำแหน่งที่เคยถอนฟันไป ในส่วนของเนื้อเยื่อปริเวณมักจะปกคลุมแผลสมบูรณ์ในช่วง 2-4 สัปดาห์แรกโดยขึ้นกับขนาดของแผลถอนฟัน<sup>(37)</sup>

### การหายของแผลบริเวณกระดูก (Bone healing)

เมื่อเกิดบาดแผลบริเวณกระดูกขึ้น การหายจะยังคงเกิดขึ้น 3 ระยะเหมือนในเนื้อเยื่ออ่อน แต่แตกต่างกันที่เซลล์หลักในการหายของบาดแผลจะไม่ใช้เซลล์ไฟโบรบลาสต์แต่จะเป็นเซลล์ออสติโอบลาสต์และเซลล์ออสติโอคลาสต์แทน<sup>(38)</sup> เซลล์ออสติโอบลาสต์นั้นเป็นเซลล์ที่มีหน้าที่ในการสะสมแร่ธาตุบนเนื้อเยื่อกระดูก โดยการสร้างออสติอยด์ (Osteoid) ซึ่งหากอยู่นิ่งโดยไม่มีกระบวนการบวมนในภายหลังจะถูกสะสมแร่ธาตุลงไปเป็นเนื้อเยื่อแข็ง เซลล์ออสติโอบลาสต์นั้นจะได้มาจาก 3 แหล่งคือ เยื่อหุ้มกระดูกด้านนอก (Periosteum) เยื่อหุ้มกระดูกด้านใน (Endosteum) และเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ที่อยู่ภายในกระแสเลือด ส่วนเซลล์ออสติโอคลาสต์นั้นทำหน้าที่ในการละลายเนื้อเยื่อกระดูกที่ตายแล้วหรือเนื้อเยื่อกระดูกเดิมในบริเวณที่ต้องมีการสร้างใหม่ เซลล์ออสติโอคลาสต์เกิดจากการรวมตัวของเซลล์เม็ดเลือดขาวในกลุ่มที่จะพัฒนาไปเป็นโมโนไซต์ (Monocyte precursor cell) ที่อยู่ในกระแสเลือด<sup>(39)</sup>

ในการหายของบาดแผลแบบทุติยภูมิของกระดูกนั้น จะเกิดในกระดูกที่มีบาดแผล ระยะห่างตั้งแต่ 1 มิลลิเมตรขึ้นไป ในระยะการเพิ่มจำนวน เซลล์ไฟโบรบลาสต์และเซลล์ ออสติโอบลาสต์จะสร้างแมทริกซ์ที่มีเส้นใยคอลลาเจนหนาแน่นเป็นจำนวนมากเพื่อเชื่อมกระดูก ทั้งสองฝั่งเข้าด้วยกัน ซึ่งในการสร้างมักสร้างเกินขอบเขตของบาดแผลออกมาเรียกบริเวณนี้ว่า แคลลัส (Callus) ซึ่งหากไม่มีการยับยั้งของแผลแคลลัสจะถูกสะสมแร่ธาตุต่อไป ในระยะการ สร้างใหม่เซลล์ออสติโอคลาสต์จะละลายแคลลัสที่สะสมแร่ธาตุแล้วออกไป และเซลล์ ออสติโอบลาสต์จะค่อยๆสร้างกระดูกใหม่ในแนวที่ตั้งฉากกับแรงดึงที่กระทำกับกระดูก หากว่า บาดแผลมีขนาดที่น้อยกว่า 1 มิลลิเมตร การหายของแผลจะเป็นแบบปฐมภูมิซึ่งจะมีการสร้าง แมทริกซ์หรือแคลลัสในปริมาณที่น้อย ทำให้เกิดการสะสมแร่ธาตุตามมาในเวลาไม่นาน<sup>(40)</sup>

การหายของบาดแผลในกระดูกนั้นมีปัจจัยที่สำคัญ 2 อย่าง คือ การที่มีเลือดมาเลี้ยง บริเวณบาดแผล (Vascularity) และไม่มีการยับยั้งของบาดแผล (Immobility) ในการที่จะสะสมแร่ ธาตุในแมทริกซ์นั้นจำเป็นต้องได้รับออกซิเจนและสารต่างๆผ่านทางเลือด หากว่ามีเลือดมาเลี้ยง ในบริเวณบาดแผลน้อยไม่เกิดการสะสมแร่ธาตุเป็นกระดูก แต่จะเกิดการสร้างเป็นกระดูกอ่อนแทน และหากเลือดมาเลี้ยงน้อยมากนั้นอาจไม่เกิดการสะสมแร่ธาตุเลยและยังคงเป็นแมทริกซ์เส้นใย คอลลาเจนดั้งเดิม ระหว่างการหายของบาดแผลหากมีแรงดึงอ่อนๆกระทำบนกระดูกจะช่วย กระตุ้นให้เกิดการสร้างกระดูกโดยออสติโอบลาสต์เร็วขึ้นได้ แต่หากแรงที่กระทำมีปริมาณมากจน มีการยับยั้งของบาดแผลจะทำให้เลือดมาเลี้ยงยังบริเวณบาดแผลได้น้อยลงและส่งผลต่อการสะสม แร่ธาตุได้<sup>(41)</sup>

### บทบาทของโกรทแฟคเตอร์ (The role of growth factors)

โกรทแฟคเตอร์เป็นโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (Low molecular weight protein) ที่สามารถกระตุ้นการอพยพ การเพิ่มจำนวน การเปลี่ยนแปลงรูปร่าง หรือการทำงานของเซลล์ที่ เฉพาะเจาะจงได้ โกรทแฟคเตอร์สามารถเคลื่อนที่ผ่านช่องว่างระหว่างเซลล์เพื่อไปยังพื้นที่ต่างๆ ของเนื้อเยื่อได้ และสามารถกระตุ้นเซลล์ได้แม้ปริมาณความเข้มข้นของโกรทแฟคเตอร์ในบริเวณ นั้นจะมีน้อยก็ตาม โกรทแฟคเตอร์อาจถือเป็นสารที่ใช้สื่อสารระหว่างเซลล์ในจำพวกสารที่กระตุ้น เซลล์ตัวเอง (Autocrine) สารที่กระตุ้นเซลล์ข้างเคียง (Paracrine) หรือสารที่กระตุ้นเซลล์ที่ไกล ออกไปโดยอาศัยการเคลื่อนที่ผ่านระบบหมุนเวียนเลือด (Endocrine) โกรทแฟคเตอร์มักตั้งชื่อตาม เซลล์ที่เป็นต้นกำเนิดในการหลั่งหรือเซลล์เป้าหมายในการกระตุ้น<sup>(42)</sup> ตัวอย่างโกรทแฟคเตอร์ที่พบ ในการหายของบาดแผลมีดังตารางที่ 1

ตาราง 1 โกรทแฟคเตอร์ที่เกี่ยวข้องกับการหายของบาดแผล

โกรทแฟคเตอร์	เซลล์ที่ทำหน้าที่ผลิต	หน้าที่
Keratinocyte growth factor (KGF)	เซลล์ไฟโบรบลาสต์	กระตุ้นการทำงานและการเพิ่มจำนวนของเซลล์สร้างเคอราติน (Keratinocyte) <sup>(43)</sup>
Epidermal growth factor	เกล็ดเลือด แมคโครฟาจ โมโนไซต์ (Monocyte)	กระตุ้นการอพยพและการเพิ่มจำนวนของเซลล์เยื่อผิวหนัง <sup>(20, 44)</sup>
Platelet-derived growth factor (PDGF)	เกล็ดเลือด แมคโครฟาจ โมโนไซต์ เซลล์กล้ามเนื้อเรียบ เซลล์เอนโดทีเลียม (Endothelial cell)	ดึงดูดเซลล์ไฟโบรบลาสต์ เซลล์กล้ามเนื้อเรียบ เซลล์เม็ดเลือดขาว กระตุ้นการแบ่งเซลล์ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ เซลล์กล้ามเนื้อเรียบ กระตุ้นการสร้างหลอดเลือดใหม่และเส้นใยคอลลาเจน <sup>(45)</sup>
Fibroblast growth factor (FGF)	เซลล์ไฟโบรบลาสต์ เซลล์กล้ามเนื้อเรียบ เซลล์เอนโดทีเลียม	กระตุ้นการสร้างเส้นเลือดใหม่ กระตุ้นการทำงานของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ เซลล์สร้างเคอราติน เซลล์กระดูกอ่อน และเซลล์กล้ามเนื้อ <sup>(20)</sup>
Insulin-like growth factors (IGF-1, IGF-2)	เกล็ดเลือด	กระตุ้นการสร้างโปรตีนในแมทริกซ์ระหว่างเซลล์ เพิ่มการเคลื่อนที่ของกลูโคส (Glucose) ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ <sup>(46)</sup>
Transforming growth factor alpha (TGF-α)	เซลล์สร้างเคอราติน เกล็ดเลือด แมคโครฟาจ	กระตุ้นการแบ่งเซลล์และดึงดูดเซลล์ผิวหนังและเซลล์เอนโดทีเลียม <sup>(47)</sup>
Transforming growth factor beta (TGF-β)	เกล็ดเลือด แมคโครฟาจ นิวโทรฟิล โมโนไซต์ ทีลิมโฟไซต์ (T-lymphocyte)	กระตุ้นการสร้างหลอดเลือดใหม่ กระตุ้นการสร้างไฟโบรเนกติน (Fibronectin) ไกลโคสะมิโนไกลแคน ยับยั้งการสร้างแผลเป็น <sup>(20)</sup>
Vascular endothelial growth factor (VEGF)	แมคโครฟาจ ไฟโบรบลาสต์ เซลล์สร้างเคอราติน	กระตุ้นการแบ่งเซลล์ของเซลล์เอนโดทีเลียม กระตุ้นการสร้างหลอดเลือดใหม่ <sup>(20)</sup>

### เซลล์ไฟโบรบลาสต์ (Fibroblast cell)

#### ลักษณะทั่วไปของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (General appearance of fibroblast cell)

เซลล์ไฟโบรบลาสต์เป็นหนึ่งในเซลล์ที่พบได้มากที่สุดในร่างกาย มีหน้าที่สร้างเส้นใยโปรตีนอันเป็นส่วนประกอบหลักของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันภายในอวัยวะต่างๆ ของร่างกาย ตัวอย่าง

เส้นใยที่เซลล์ไฟโบรบลาสต์สร้าง ได้แก่ เส้นใยคอลลาเจนซึ่งช่วยเพิ่มความแข็งแรง ด้านแรงที่กระทำจากทั้งภายในและภายนอกที่มีต่อเนื้อเยื่อ เส้นใยอีลาสติก (Elastic fiber) เพิ่มความยืดหยุ่นให้แก่เนื้อเยื่อและเส้นใยร่างแห (Reticular fiber) ที่ช่วยในการเชื่อมโยงเนื้อเยื่อแต่ละประเภทเข้าด้วยกัน<sup>(48)</sup>

เซลล์ไฟโบรบลาสต์เป็นเซลล์ที่มีไซโตพลาสซึม (Cytoplasm) ที่ยื่นเป็นแขนงกิ่งก้าน และมักเห็นนิวเคลียส (Nucleus) เป็นรูปร่างวงรีเมื่อส่องภายในกล้องจุลทรรศน์ อาจพบนิวคลีโอไล (Nucleoli) 2 หรือมากกว่าภายในนิวเคลียส เซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ตื่นตัว (Active fibroblast) จะพบร่างแหเอนโดพลาสมิกชนิดหยาบ (Rough endoplasmic reticulum) ปรากฏจำนวนมากภายในเซลล์ แสดงให้เห็นว่าเซลล์ไฟโบรบลาสต์นี้มีการสร้างโปรตีนเพื่อส่งออกนอกเซลล์ในปริมาณที่มาก เซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ไม่ตื่นตัว (Inactive fibroblast) จะพบว่ามีความหนาแน่นของไซโตพลาสซึมไม่แตกแขนงมากลักษณะคล้ายกระสวย และพบร่างแหเอนโดพลาสมิกชนิดหยาบภายในเซลล์ลดลง บางครั้งอาจเรียกเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ไม่ตื่นตัวว่าไฟโบรไซต์ (Fibrocyte) เซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่พบภายในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันมักจะเรียงตัวเป็นระเบียบในลักษณะที่ขนานกัน แต่ในบางเนื้อเยื่อที่เซลล์อยู่กันอย่างหลวมๆ อาจพบเซลล์เรียงตัวในทิศทางที่แตกต่างกันได้ เช่น บริเวณลามินาโพรเพรีย (Lamina propria) ซึ่งเป็นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันชนิดโปร่ง (Loose connective tissue)<sup>(49)</sup>

เซลล์ไฟโบรบลาสต์มักไม่ได้เรียงตัวเป็นชั้นเดียวหรืออยู่ติดกับช่องว่างเหมือนกับเซลล์เยื่อบุผิว เซลล์ไฟโบรบลาสต์มักถูกห้อมล้อมด้วยสารเมทริกซ์นอกเซลล์ (Extracellular matrix) ทำให้ไม่มีผลของสภาพขั้ว (Polarity) เหมือนกับเซลล์เยื่อบุผิวที่เกาะอยู่บนเนื้อเยื่อรองรับ (Basement membrane) ยกเว้นในบางกรณี เช่น เซลล์ไมโอไฟโบรบลาสต์ (Myofibroblast) ในลำไส้ซึ่งหลังสารที่มีส่วนประกอบคล้ายกับเนื้อเยื่อรองรับออกมารอบเซลล์ เซลล์ไฟโบรบลาสต์สามารถเคลื่อนย้ายตำแหน่งอย่างช้าๆ ผ่านการอพยพ (Migration) ไปยังบริเวณข้างเคียงได้ เช่น ในกรณีเกิดแผล อายุขัยของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ศึกษาในตัวอ่อนของไก่พบว่ามีความยาว 57±3 วัน<sup>(50)</sup>

#### การจดจำของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (Memory of fibroblast cell)

เซลล์ไฟโบรบลาสต์ในเนื้อเยื่อแต่ละชนิดมีลักษณะที่แตกต่างกันเล็กน้อย แต่หน้าที่หลักนั้นเหมือนกันคือการคงไว้ซึ่งความสมบูรณ์ต่อเนื้อของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน โดยการสร้างเส้นใยโปรตีนรวมถึงสารพื้น (Ground substance) เช่น โกลโคสะมิโนไกลแคน ที่เป็นส่วนประกอบหลักของเมทริกซ์นอกเซลล์ ปริมาณและประเภทของเส้นใยและสารพื้นๆ ที่เซลล์ไฟโบรบลาสต์สร้างจะแตกต่างกันไปในแต่ละเนื้อเยื่อ พบว่าหากทำการปลูกถ่ายเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากบริเวณหนึ่งไป

ยังอีกบริเวณหนึ่ง เซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ถูกปลูกถ่ายจะยังคงมีความทรงจำ (Memory) ของเนื้อเยื่อในบริเวณเก่าและแสดงลักษณะการสร้างเส้นใยและสารพื้นเหมือนเดิมอยู่ ซึ่งลักษณะนี้จะคงอยู่ต่อไปอีก 2-3 รุ่น การศึกษาในปี 2011 พบว่าเมื่อนำเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่เก็บจากปอดของหนูมาเลี้ยงบนพื้นผิว (Substrate) ซิลิโคนที่มีความแข็ง (Stiffness) ไม่เท่ากัน เซลล์ไฟโบรบลาสต์จะมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างไม่เหมือนกัน เซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่เลี้ยงบนพื้นผิวซิลิโคนที่มีความแข็งใกล้เคียงกับเนื้อเยื่อปอดปกติ ( $\leq 5$  kPa) เมื่อนำมาตรวจหาปริมาณการทำงานของไมโอไฟโบรบลาสต์ซึ่งพบในเนื้อเยื่อปอดที่เป็นพังผืด (Fibrosis) ซึ่งมีการสร้างสารออกมามากกว่าเซลล์ไฟโบรบลาสต์ปกติ พบว่ามีปริมาณการทำงานของไมโอไฟโบรบลาสต์ในระดับต่ำ แต่ในกลุ่มที่นำไปเลี้ยงบนซิลิโคนที่มีความแข็งใกล้เคียงกับเนื้อเยื่อปอดที่เป็นพังผืดเป็นเวลา 3 สัปดาห์ (25-100 kPa) ตรวจพบระดับการทำงานของไมโอไฟโบรบลาสต์เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งเมื่อนำเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในกลุ่มนี้กลับไปเลี้ยงในซิลิโคนที่มีความแข็งใกล้เคียงปอดปกติต่อเป็นเวลา 2 สัปดาห์ พบว่ายังคงมีระดับการทำงานของไมโอไฟโบรบลาสต์ไม่แตกต่างกับเซลล์ที่เลี้ยงแต่ในซิลิโคนที่มีความแข็งใกล้เคียงเนื้อเยื่อปอดที่มีพังผืด กลับกันเมื่อนำเซลล์ไฟโบรบลาสต์เลี้ยงในซิลิโคนที่มีความแข็งใกล้เคียงกับเนื้อเยื่อปอดปกติไปเลี้ยงในซิลิโคนที่มีความแข็งใกล้เคียงกับปอดที่เป็นพังผืด พบว่าสามารถป้องกันการเพิ่มขึ้นของระดับการทำงานของไมโอไฟโบรบลาสต์ได้ จึงอาจสรุปได้ว่าข้อมูลทางแรงกลจากพื้นผิวที่เซลล์ไฟโบรบลาสต์สัมผัสสามารถส่งผลกระทบต่อพฤติกรรมของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ได้ และพฤติกรรมนั้นมีการจดจำและคงอยู่แม้จะมีการเปลี่ยนแปลงแรงกลจากพื้นผิวก็ตาม<sup>(51)</sup>

#### การเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (Fibroblast cell differentiation)

เนื่องจากเนื้อเยื่อเกี่ยวพันเป็นเนื้อเยื่อที่มีจุดกำเนิดมาจากโครงสร้างที่เรียกว่ามีเซนไคม์ (Mesenchyme) ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของโครงสร้างชั้นกลางของเนื้อเยื่อตัวอ่อน (Mesoderm) เซลล์ไฟโบรบลาสต์จึงมีต้นกำเนิดมาจากเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ (Mesenchymal stem cell) โดยลักษณะเด่นที่พบในเซลล์กลุ่มนี้คือมีไวเมนติน (Vimentin)<sup>(52)</sup> เป็นส่วนประกอบของโครงร่างของเซลล์ขนาดกลาง (Intermediate filament) ซึ่งเป็นหนึ่งในโปรตีนที่ใช้บ่งบอกถึงถิ่นกำเนิดจากโครงสร้างชั้นกลางของเนื้อเยื่ออ่อน

ในช่วงหลายปีที่ผ่านมา พบว่าเซลล์ไฟโบรบลาสต์ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างไปทำหน้าที่เฉพาะในการสร้างเส้นใยโปรตีนและสารพื้น กลับมีศักยภาพที่จะเปลี่ยนแปลงรูปร่างไปเป็นเซลล์อื่นได้ เช่น การเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ไมโอไฟโบรบลาสต์ในขั้นตอนการหายของแผล ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับการหดตัวของแผล (Wound contraction) หรือสามารถ

เปลี่ยนแปลงรูปร่างไปเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่ในการสร้างกระดูก (Osteogenic differentiation หรือ Transdifferentiation) ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีความเฉพาะเจาะจงมากขึ้นและเป็นส่วนประกอบของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันอีกประเภทหนึ่งซึ่งแตกต่างจากเดิม คนที่เสนอแนวคิดนี้เป็นคนแรกคือ Urist<sup>(53)</sup> Reddi และ Huggins ได้ทำการศึกษาต่อแล้วพบว่าเซลล์ไฟโบรบลาสต์สามารถถูกกระตุ้นให้เปลี่ยนแปลงรูปร่างผ่านการติดต่อกับกระดูกหรือฟันได้<sup>(54, 55)</sup> และยังพบว่าเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่มาจากเหงือกหรือผิวหนังนั้นมีความสามารถที่จะแสดงลักษณะเฉพาะที่พบในเซลล์ออสติโอเบลาสต์หรือเซลล์กระดูกได้ (Osteoblast marker) อีกด้วย<sup>(56)</sup> จึงเป็นจุดเริ่มต้นของการศึกษาถึงผลกระทบขององค์ประกอบของกระดูกหรือฟันที่มีต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์

ในปี 2014 มีการศึกษาถึงผลของทีจีเอฟเบต้าวัน (Transforming growth factor beta 1; TGF- $\beta$ 1) ต่อการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากผิวหนังมนุษย์ โดยทีจีเอฟเบต้าวันเป็นโกรทแฟคเตอร์ที่พบในเนื้อเยื่อกระดูก และควบคุมการเพิ่มจำนวน การอพยพ และการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์หลายประเภทและรวมไปถึงควบคุมการเจริญเติบโตของเซลล์กระดูกด้วย<sup>(57)</sup> ในการศึกษาครั้งนี้นำเซลล์ไฟโบรบลาสต์มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ 4 กลุ่ม คือ อาหารเลี้ยงเซลล์ปกติ (Dulbecco's modified Eagle medium; DMEM) อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ใส่ทีจีเอฟเบต้าวัน อาหารเลี้ยงเซลล์กระดูก (Standard culture medium supplemented with 50  $\mu$ g/ml ascorbic acid, 10 mmol  $\beta$ -glycerophosphate, 10 mmol dexamethasone) และอาหารเลี้ยงเซลล์กระดูกที่ใส่ทีจีเอฟเบต้าวัน ผลที่ได้คือการเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในอาหารเลี้ยงเซลล์กระดูกจะพบการสะสมแคลเซียมฟอสเฟตขึ้น (Calcium phosphate) หากในอาหารเลี้ยงเซลล์มีทีจีเอฟเบต้าวันจะพบการเพิ่มขึ้นของระดับแอลคาไลน์ฟอสฟาเตส (Alkaline phosphatase) และออสติโอแคลซิน (Osteocalcin) ซึ่งเป็นตัวชี้วัดการทำงานของเซลล์กระดูก<sup>(58)</sup>

ต่อมาในปี 2017 ได้มีการนำเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากเหงือกมนุษย์มาทำการปรับปรุงด้วยกระบวนการเหนือพันธุกรรม (Epigenetics) โดยการใช้ดีออกซีไซโทซีน (5-aza-2'-deoxycytidine) ชักนำให้เกิดการดึงหมู่เมทิล (Demethylation) ออกจากบริเวณที่มีเบสไซโตซีน และกวานิดีนนาแน่น (CpG islands) ยีน RUNX2 และเอแอลพี (ALP) ซึ่งปกติจะถูกเติมหมู่เมทิลในปริมาณมากในกลุ่มของเซลล์ไฟโบรบลาสต์และไม่มีการเติมหมู่เมทิลในกลุ่มของเซลล์กระดูก เป็นเหตุผลให้เซลล์ 2 กลุ่มนี้มีการแสดงออกของยีนไม่เหมือนกัน<sup>(59)</sup> จากนั้นนำเซลล์ที่ทำการปรับปรุงด้วยกระบวนการเหนือพันธุกรรมแล้วมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีบีเอ็มพีทู (Bone morphogenetic protein 2; BMP2) ซึ่งเป็นหนึ่งในโกรทแฟคเตอร์ที่มีศักยภาพสูงในการกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ออสติโอเบลาสต์<sup>(60)</sup> ผลที่ได้คือเซลล์ไฟโบรบลาสต์ถูกชักนำ

ให้เปลี่ยนแปลงรูปร่างไปเป็นเซลล์ในกลุ่มของออสติโอบลาสต์ที่มีการแสดงออกของยีนเอแอลพีมากกว่าเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีบีเอ็มพีทูเพียงอย่างเดียว และเมื่อนำเซลล์ที่ได้นี้ไปปลูกถ่ายลงในชั้นใต้ผิวหนังของสัตว์ทดลองร่วมกับการใส่แคลเซียมอะพาไทต์จากวัว (Anorganic bovine bone mineral) พบว่ามีการสร้างกระดูกใหม่ขึ้นอย่างมีนัยยะสำคัญในบริเวณที่ทำการปลูกถ่าย<sup>(61)</sup>

การที่มีองค์ความรู้ในส่วนนี้ทำให้การรักษาโรคที่เกิดขึ้นภายในเนื้อเยื่อแข็งหรือกระดูก ซึ่งแต่เดิมต้องอาศัยการปลูกกระดูกโดยใช้กระดูกของคนไข้เอง (Autograft) กระดูกของมนุษย์ (Allograft) กระดูกของสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น (Xenograft) หรือกระดูกที่สร้างขึ้นมา (Alloplast) เพื่อใช้ชักนำการสร้างกระดูกบริเวณรอยโรค<sup>(62)</sup> แต่ก็ยังมีข้อจำกัดหลายอย่างทั้งในเรื่องของระยะเวลาในการละลายตัวของวัสดุ ปริมาณกระดูกที่สร้างได้ รวมถึงความเสี่ยงที่จะต้องทำการรักษาซ้ำ จึงได้มีความพยายามในการใช้ความรู้ทางด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อมาใช้ในการรักษา โดยการนำเซลล์กระดูกของคนไข้ในตำแหน่งที่ปกติมาทำการเลี้ยงและเพิ่มจำนวนให้มากพอ แล้วนำกลับไปปลูกยังบริเวณที่เป็นรอยโรค แต่การที่จะแยกเฉพาะเซลล์กระดูกที่ต้องการโดยไม่ปะปนกับเซลล์ชนิดอื่น หรือการเลี้ยงเซลล์กระดูกให้มีจำนวนมากพอภายในห้องปฏิบัติการนั้นเป็นเรื่องที่ยาก การที่เราสามารถหาเซลล์ชนิดอื่นที่เป็นเซลล์ของคนไข้แล้วสามารถชักนำให้เกิดการสร้างกระดูกได้ ความรู้ในส่วนนี้อาจพัฒนาเป็นทางเลือกในการรักษาคนไข้ที่เจ็บป่วยจากรอยโรคบริเวณเนื้อเยื่อแข็งต่อไป

ในบางสถานการณ์เซลล์เยื่อบุผิวอาจมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างจากเป็นเซลล์ที่เรียงตัวเป็นชั้น อยู่ชิดกับเซลล์ข้างเคียง มีสภาพขั้วและมีโครงร่างภายในเซลล์ที่จำเพาะไปเป็นเซลล์ที่เป็นเซลล์เรียงเดี่ยวมากขึ้น อพยพตัวเองได้มากขึ้น รูปร่างคล้ายกับเซลล์มีเซนไคม์ (Mesenchymal cell) เรียงกระบวนการนี้ว่าอีเอ็มที (Epithelial to mesenchymal transition)<sup>(63)</sup> ซึ่งเป็นหนึ่งในลักษณะที่พบได้ในเซลล์มะเร็ง ในทางกลับกันเซลล์มีเซนไคม์ก็สามารถเปลี่ยนแปลงรูปร่างไปเป็นเซลล์เยื่อบุผิวได้เช่นกัน โดยมีการเปลี่ยนแปลงสภาพขั้วภายในเซลล์ และมีการติดต่อกันระหว่างเซลล์ข้างเคียงและมีการเรียงตัวใหม่ เรียกกระบวนการนี้ว่าเอ็มอีที (Mesenchymal to epithelial transition)<sup>(64)</sup> พบได้ในขั้นตอนการสร้างหน่วยไต

### ไฟโบรบลาสต์ 929 (Fibroblast L929 cell)

ลักษณะของไฟโบรบลาสต์แอล 929

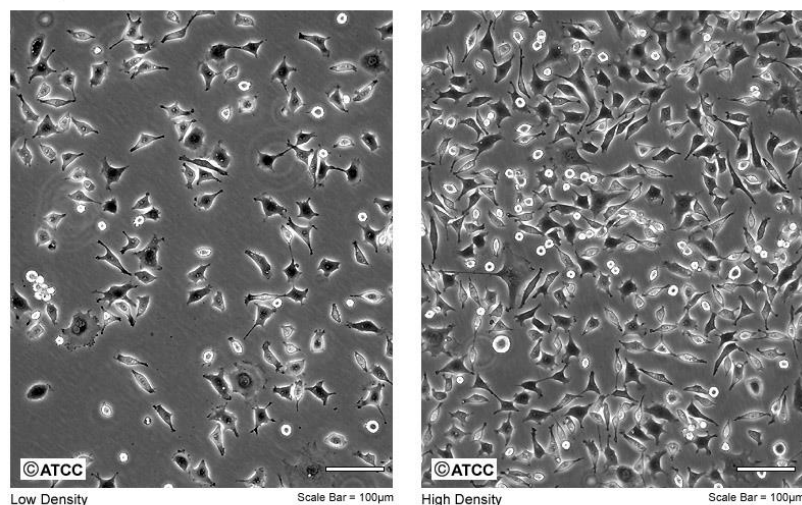
ไฟโบรบลาสต์แอล 929 เป็นเซลล์ไลน์ที่ได้จากเซลล์สายพันธุ์แอล (L strain) ที่มีการเลี้ยงอย่างต่อเนื่อง มีต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อเกี่ยวพันชนิดเนื้อเยื่อไขมันบริเวณ

ได้ผิวหนังของหนูเพศผู้ สปีชีส์ *Mus musculus* C3H/An อายุ 100 วัน ในช่วงมีนาคม ค.ศ.1948 โดยโคลน 929 เกิดจากการใช้วิธีการแยกเซลล์เทคนิคแคพพิลลารี (Capillary technique for single cell isolation) ในเซลล์ไลน์รุ่นที่ 95 (95<sup>th</sup> subculture generation) ไฟโบรบลาสต์แอล 929 มีโครโมโซม 66 แท่ง ในระยะเมตาเฟส (Metaphase) จะพบโครโมโซมที่มักใช้เป็นตัวชี้วัด (Marker chromosome) ประมาณ 20-30 โครโมโซม และพบเมตาเซนทริกโครโมโซม (Metacentric chromosome) ขนาดยาวที่มีรอยคอด (Secondary constriction) ได้ 77 เซลล์ ต่อ 100 เซลล์ ไฟโบรบลาสต์แอล 929 สามารถถูกชักนำก่อให้เกิดเนื้องอกได้ และไวต่อไวรัสที่ก่อให้เกิดโรคปากเปื่อยพุพอง (Vesicular stomatitis) ไวรัสไข้สมองอักเสบ (Encephalomyocarditis virus) แต่พบว่าไฟโบรบลาสต์แอล 929 ให้ผลเป็นลบต่อไวรัสฝีดาษในหนู (Ectromelia virus)

ไฟโบรบลาสต์แอล 929 มีจุดประสงค์สำหรับใช้วิจัยในห้องปฏิบัติการ เหมาะสมสำหรับการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ ความเข้ากันได้ของวัสดุต่อเซลล์ หรือทดสอบการติดเชื้อรหัสทางการค้าของไฟโบรบลาสต์แอล 929 คือ เอ็นซีทีซี โคลน 929 (NCTC clone 929 (L cell, L-929, derivative of Strain L) ATCC CCL-1) เซลล์จะถูกจัดเก็บในรูปแบบแช่แข็งในไอของไนโตรเจนเหลวซึ่งได้มาตรฐานการเก็บรักษาจากเอทีซีซี (The American type culture collection; ATCC) เซลล์ไฟโบรบลาสต์แอล 929 จะถูกบรรจุในหลอดเก็บและแช่แข็งไว้เมื่อถึงเวลานำส่ง โดยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่บรรจุในหลอดจะเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์หมายเลข 30-2003 ของเอทีซีซี (ATCC-formulated Eagle's Minimum Essential Medium, Catalog No. 30-2003) ซึ่งสามารถเติมซีรัมจากม้า (Horse serum) ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายที่ 10% เพื่อให้ได้อาหารเลี้ยงเซลล์ที่สมบูรณ์ ไฟโบรบลาสต์แอล 929 เป็นเซลล์ไฟโบรบลาสต์มาตรฐานที่นิยมนำมาทดสอบในห้องปฏิบัติการก่อนทดสอบในสัตว์ทดลอง ปัจจุบันมีงานวิจัยที่ใช้ไฟโบรบลาสต์แอล 929 ในการทดสอบแล้ว 559 งานวิจัย



ATCC Number: **CCL-1**  
Designation: **NCTC clone 929**



ภาพประกอบ 7 แสดงภาพไฟโบรบลาสต์แอล 929  
ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ

ที่มา NCTC clone 929 [L cell, L-929, derivative of Strain L] | ATCC

### วิศวกรรมเนื้อเยื่อ (Tissue engineering)

วิศวกรรมเนื้อเยื่อนั้นเป็นวิชาที่นำหลักการและวิธีการของวิศวกรรมและวิทยาศาสตร์ชีวภาพมาประยุกต์ใช้เพื่อเสริมสร้างความเข้าใจในความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและการทำงานในภาวะปกติและภาวะที่เป็นโรคของเนื้อเยื่อ รวมไปถึงการพัฒนาสิ่งทดแทนเพื่อนำมาซ่อมแซมหรือปรับปรุงการทำงานของเนื้อเยื่อให้ดียิ่งขึ้น<sup>(2)</sup> การทำงานในสายวิศวกรรมเนื้อเยื่อนั้นใช้ความรู้หลากหลายสาขาที่เกี่ยวข้องกับการใช้เซลล์ วัสดุชีวภาพ (Biomaterials) หรือสแคฟโฟลด์ (Scaffolds) ปัจจัยทางเคมี (Chemical factors) และกระบวนการทางวิศวกรรม (Engineering methodology)

#### การทำงานกับเซลล์

การทำงานด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อส่วนใหญ่เป็นงานที่จำเป็นต้องอาศัยเทคนิคปลอดเชื้อ เพื่อให้ได้ผลการทดสอบที่เที่ยงตรงและสามารถทำซ้ำได้ โดยเฉพาะการเลี้ยงเซลล์หรือการย้ายเซลล์จากจานเลี้ยงเซลล์หนึ่งไปยังอีกจานเลี้ยงเซลล์หนึ่งซึ่งหากเกิดการปนเปื้อนขึ้น อาจทำให้เซลล์ที่เลี้ยงไว้เกิดการติดเชื้อและตายลงได้ หนึ่งในอุปกรณ์ที่สำคัญที่ใช้ในการทำงานคือ ตู้ปลอดเชื้อประเภทที่สอง (Class II biosafety cabinet; BSC) ซึ่งเป็นตู้ปลอดเชื้อที่สร้างพื้นที่ที่

สะอาดในการทำงาน ในขณะที่เดียวกันก็ป้องกันผู้ทำการทดลองจากอันตรายที่อาจเกิดจากสารตัวอย่างด้วย แตกต่างจากตู้ปลอดเชื้อประเภทที่หนึ่ง (Class I biosafety cabinet) ที่ปกป้องผู้ทดลองแต่ไม่ทำให้เกิดพื้นที่ปลอดเชื้อในการทำงาน ส่วนตู้ปลอดเชื้อประเภทที่สาม (Class III biosafety cabinet) จะใช้สำหรับงานที่มีความเสี่ยงสูงเท่านั้น หลักการทำงานของตู้ปลอดเชื้อคือการใช้แผ่นกรองอนุภาคอากาศประสิทธิภาพสูง (High-efficiency particulate air filter; HEPA filter) เพื่อกรองเอาอนุภาคหรือละอองในอากาศที่มีขนาดใหญ่กว่า 0.3 ไมครอนเมตร หมายความว่าเชื้อส่วนใหญ่ที่อยู่ในอากาศจะถูกกรองออกไป ทำให้เกิดสภาวะเสมือนปลอดเชื้อขึ้นภายในพื้นที่ทำงานของตู้ปลอดเชื้อ เมื่อใช้งานตู้ปลอดเชื้อเสร็จจำเป็นต้องทำการฆ่าเชื้อด้วยแอลกอฮอล์และเปิดหลอดไฟยูวีเพื่อฆ่าเชื้อภายในตู้ปลอดเชื้อทุกครั้ง

รูปแบบของจานเลี้ยงเซลล์นั้นมีหลากหลายตั้งแต่เป็นจานกลม ขวดวัดปริมาตร หรือเป็นถาดเลี้ยงชนิดหลายหลุม (Multiwell plates) จานเลี้ยงเซลล์นั้นจะแตกต่างจากจานเลี้ยงเชื้อทั่วไป บริเวณพื้นผิวของจานเลี้ยงเซลล์จะถูกเตรียมด้วยออกซิเจนพลาสมา (Oxygen plasma) เพื่อเพิ่มการเกาะติดของเซลล์ (Cell attachment) วัสดุที่นิยมใช้ในการทำจานเลี้ยงเซลล์คือโพลีสไตรีน (Polystyrene) การฆ่าเชื้อที่ใช้สำหรับจานเลี้ยงเซลล์คือการใช้รังสีแกมมา (Gamma radiation)

### ตัวอย่างการใช้วิศวกรรมเนื้อเยื่อในการรักษา

ตัวอย่างการใช้หลักการของวิศวกรรมเนื้อเยื่อในการรักษารอยโรคภายในกระดูกอ่อนบริเวณหน้าแข้งสามารถเห็นได้จากผลิตภัณฑ์ Carticel ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์นำออกมาขายโดยใช้หลักการคือการฉีดเซลล์กระดูกอ่อนของตัวคนไข้เองไปยังตำแหน่งที่มีรอยโรค ผลิตภัณฑ์นี้เป็นผลิตภัณฑ์จากบริษัท Genzyme Corporation ซึ่งในปี ค.ศ.1997 ได้รับการรับรองโดยองค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกา (Food and Drug Administration; FDA) ให้เป็นการรักษาโดยใช้เซลล์ที่ผ่านการรับรองวิธีแรก ในการรักษาจำเป็นต้องมีการผ่าตัด 2 ครั้ง ห่างกันอย่างน้อย 2 สัปดาห์<sup>(1)</sup> การผ่าตัดครั้งแรกจะเป็นการเก็บเซลล์กระดูกอ่อนจากบริเวณที่ไม่ได้ใช้ในการรับน้ำหนักตัวของเข่าของคนไข้ จากนั้นเซลล์กระดูกอ่อนจะถูกส่งไปยังบริษัทผู้ผลิต ซึ่งจะทำให้การแยกเซลล์กระดูกอ่อนออกมาจากชิ้นเนื้อของคนไข้ และทำการเพาะเลี้ยงเป็นการเลี้ยงเซลล์ปฐมภูมิ (Primary culture) หลังจากการเลี้ยงเซลล์ปฐมภูมิ เซลล์ของคนไข้จะถูกเก็บด้วยการแช่แข็ง และนำออกมาเพิ่มจำนวนในเวลาที่ต้องการ หลังจากได้จำนวนเซลล์กระดูกอ่อนที่เพียงพอ จะเริ่มการผ่าตัดครั้งที่ 2 เพื่อทำการฉีดเซลล์กระดูกอ่อนไปยังบริเวณที่เป็นรอยโรคและใช้เนื้อเยื่อเกี่ยวพันของคนไข้ในการเย็บปิดเพื่อให้เซลล์คงอยู่ในบริเวณรอยโรค หลังการรักษาด้วย

วิธีนี้คนใช้ส่วนใหญ่มีอาการเจ็บข้อที่น้อยลงและกลับมาใช้ชีวิตได้ตามปกติ แต่ก็มีการศึกษาที่พบว่ามีความหลายรายต้องทำการรักษาซ้ำหรือมีผลข้างเคียงจากการรักษา<sup>(65)</sup>

ก่อนการนำส่งเซลล์ให้กับคนไข้จะต้องมีการตรวจเช็คปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตก่อนว่ามีเพียงพอหรือไม่ ซึ่งวิธีการทดสอบที่ใช้กันแพร่หลายคือการใช้ชุดตรวจความมีชีวิตและความเป็นพิษต่อเซลล์ (Molecular Probe's LIVE/DEAD viability/cytotoxicity assay) ซึ่งเป็นการใช้สีย้อมฟลูออเรสเซนต์ 2 สีพร้อมกันในการย้อมเซลล์ที่มีชีวิตและเซลล์ที่ตายภายในเนื้อเยื่อ สีย้อมที่ใช้คือแคลซินเอเอ็ม (Calcein AM) และอีธิเดียมโฮโมไดเมอร์ (Ethidium homodimer; EthD-1) แคลซินเอเอ็มเป็นสีย้อมที่สามารถผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้ และเกิดการย้อมที่บริเวณไซโตพลาสซึม (Cytoplasm) ของเซลล์ที่มีชีวิตเกิดเป็นสีฟลูออเรสเซนต์สีเขียว ส่วนการเกิดฟลูออเรสเซนต์ของอีธิเดียมโฮโมไดเมอร์เกิดจากการที่สีย้อมเข้าไปในเซลล์ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ที่ไม่สมบูรณ์ของเซลล์ที่ตายและจับกับดีเอ็นเอ (Deoxyribonucleic acid; DNA) และเกิดเป็นสีฟลูออเรสเซนต์สีแดงขึ้น

### ไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิก (Hyaluronic acid based hydrogel)

ไฮโดรเจลคือสารประกอบโพลิเมอร์ที่มีการครอสลิงค์กันระหว่างสายโซ่โมเลกุลเกิดเป็นร่างแหในลักษณะสามมิติ มีคุณสมบัติในการเก็บกักน้ำได้ในปริมาณมากเนื่องจากไฮโดรเจลเป็นสารประกอบที่มีสภาพขั้วและมีรูพรุนภายในโครงสร้าง ซึ่งลักษณะคล้ายกับเนื้อเยื่อเกี่ยวพันของร่างกายที่มีเส้นใยพอลิเมอร์และมีน้ำเป็นส่วนประกอบหลัก รวมถึงมีช่องว่างหรือรูพรุนซึ่งจะเป็นที่อยู่ของเซลล์ต่อไป ไฮโดรเจลสามารถเตรียมได้จากสารหลายประเภท เช่น โพลีเอทิลีนไกลคอล (Polyethylene glycol) ซิลิคอน (Silicon) ฮีมา (2-Hydroxyethyl methacrylate) โพลีอะคริลามิด์ (Polyacrylamide) หรือกรดไฮยาลูโรนิก ด้วยคุณสมบัติในการกักเก็บน้ำที่ดีจึงมีการนำไฮโดรเจลที่เตรียมจากโพลิเมอร์ที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์และสามารถย่อยสลายได้ภายในร่างกายมาใช้เป็นระบบนำส่งยา เช่น กรดไฮยาลูโรนิกซึ่งเป็นส่วนประกอบหนึ่งที่พบได้ในแมทริกซ์นอกเซลล์ตามธรรมชาติ จึงนิยมนำมาปรับปรุงโครงสร้างเพื่อให้มีคุณสมบัติทางกายภาพที่ดีขึ้นเหมาะสมสำหรับการใช้เป็นระบบนำส่งยา<sup>(66)</sup>

ในปี 2017 Pereira<sup>(67)</sup> และคณะได้พัฒนาระบบนำส่งยาในรูปแบบฉีดชนิดไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกที่มีการปรับปรุงโครงสร้างด้วยไฮดราโซน (Injectable modified hyaluronic acid from hydrazone-crosslinked hydrogel) เพื่อ นำ ส่ง โกรท แฟคเตอร์ บี เอ็ม พี ทู (Bone-morphogenic protein-2; BMP-2) ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีความสำคัญต่อการสร้างกระดูก ผลการศึกษาพบว่าไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกที่ปรับปรุงโครงสร้างด้วยไฮดราโซนนี้ไม่มีความเป็น

พืชต่อเซลล์และมีการปลดปล่อยบีเอ็มพีทูออกมาได้อย่างต่อเนื่องถึง 28 วัน โดยในวันที่ 28 ยังพบระดับบีเอ็มพีทูสูงถึง 86% นอกจากนี้ Pereira (2017) ยังได้นำไฮโดรเจลชนิดนี้ไปใช้ศึกษาต่อโดยการฉีดเข้าไปในกะโหลกของหนูพบว่ามีการสร้างกระดูกเกิดขึ้นใน 8 สัปดาห์ แสดงให้เห็นว่าสามารถใช้ไฮโดรเจลนี้เป็นตัวนำพาบีเอ็มพีทูเข้าสู่เซลล์และกระตุ้นการแสดงออกของเซลล์กระดูกได้โดยไม่เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์<sup>(67)</sup>

การพัฒนาไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกยังคงมีมาอย่างต่อเนื่องเพื่อหาสูตรสำเร็จที่ทำให้ระบบนำส่งยานี้มีประสิทธิภาพที่ดีขึ้น โดยมีการปรับปรุงสายพอลิเมอร์ของไฮยาลูโรนิกหรือมีการหาสารที่นำไปใช้ในการครอสลิงค์ตัวใหม่ จนกระทั่งในปี 2015 Maturavongsadit<sup>(68)</sup> และคณะได้ทำการศึกษาโครงสร้างชีวภาพที่ได้จากไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกในรูปแบบฉีด<sup>(68)</sup> ซึ่งกรดไฮยาลูโรนิกที่ใช้ในการศึกษานี้ได้มีการปรับปรุงโครงสร้างโดยการเติมเมทาคริลิคแอนไฮไดรด์ (Methacrylic anhydride) เกิดเป็นเมทาคริลิคไฮยาลูโรนิกแอซิดและใช้ครอสลิงค์เกอร์เป็นทีเอ็มวีวันซิส (Cysteine-inserted Tobacco mosaic virus (TMV) mutants; TMV1cys)) ร่วมกับดีทีที (Dithiotreitol; DTT) โดยทำการเปรียบเทียบกับไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกที่ปรับปรุงโครงสร้างด้วยเมทาคริลิคแอนไฮไดรด์และครอสลิงค์ด้วยดีทีทีเพียงอย่างเดียว โดยการครอสลิงค์ของไฮโดรเจลทั้ง 2 แบบนั้นใช้ปฏิกิริยาไทออล-อินคลิก (Thiol-ene click reaction) ซึ่งเป็นปฏิกิริยาที่ไม่มีผลข้างเคียงที่มีนัยสำคัญต่อโปรตีนที่มีส่วนประกอบของหมู่เอไมด์ทำให้สามารถเกิดปฏิกิริยาได้โดยไม่ทำให้โปรตีนที่เป็นส่วนประกอบของสารตั้งต้นเปลี่ยนแปลง จึงมักจะนำปฏิกิริยานี้มาใช้ในการเตรียมไฮโดรเจล เนื่องจากไทออลอินคลิกนั้นเป็นสารตั้งต้นที่สามารถควบคุมเวลาการก่อตัวเป็นเจลได้ดีและเป็นปฏิกิริยาที่ง่ายและมีความปลอดภัยสูง ซึ่งผลการศึกษพบว่ากรดไฮยาลูโรนิกน้ำหนักโมเลกุล 47 กิโลดาลตัน เป็นขนาดที่เหมาะสมที่จะทำให้เกิดความหนืดและความถ่วงจำเพาะที่ดีต่อการเกิดปฏิกิริยาการเติมหมู่เมทาคริลิคเพื่อใช้ในการปรับปรุงโครงสร้างของกรดไฮยาลูโรนิก โดยทั้งไฮโดรเจลที่ครอสลิงค์ด้วยทีเอ็มวีวันซิสและดีทีทีที่มีขนาดของรูพรุนภายในเจล 20-100 ไมโครเมตร ซึ่งเป็นขนาดของรูพรุนที่เหมาะสมต่อการเป็นที่อยู่ของเซลล์สำหรับวิศวกรรมเนื้อเยื่อและเป็นขนาดที่เหมาะสมต่อการซึมผ่านของยาเพื่อนำไปใช้ในระบบนำส่งยา นอกจากนี้ยังพบว่าไฮโดรเจลที่ครอสลิงค์ด้วยทีเอ็มวีวันซิสและดีทีทีมีการบวมเมื่อสัมผัสกับน้ำที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญและสามารถกักเก็บน้ำไว้ในตัวได้โดยไม่เกิดการสูญเสียออกไปเป็นเวลา 21 วันและสามารถดูดซึมน้ำจมน้ำหนักเพิ่มขึ้น 3.5 เท่าจากน้ำหนักแรกเริ่ม สิ่งที่แตกต่างกันของไฮโดรเจลทั้ง 2 แบบคือระยะเวลาการก่อตัวเป็นเจลหรือการครอสลิงค์ซึ่งพบว่าในกลุ่มทีเอ็มวีวันซิสใช้เวลาน้อยกว่า<sup>(68)</sup> ต่อมาในปี 2016 Maturavongsadit<sup>(69)</sup>

และคณะได้นำไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกที่ปรับปรุงโครงสร้างด้วยเมทาคริลิกแอนไฮไดรด์มาพัฒนาต่อ โดยการผสมกับดีทีทีและสารที่ก่อให้เกิดการครอสลิงค์ชนิดอื่นๆ เช่น พีอีจี (4-arm polyethylene glycol; PEG) และพีเอเอ็มเอเอ็ม (Multi-arm polyamidoamine; PAMAM) เพื่อใช้เป็นไฮโดรเจลสำหรับนำส่งเซลล์ต้นกำเนิด ผลการศึกษาพบว่า การครอสลิงค์นั้นเกิดจากปฏิกิริยาไรออล-อินคลิกตามเดิม โดยปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นได้อย่างสมบูรณ์ที่อุณหภูมิห้องและมีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 8 อีกทั้งพบว่าไฮโดรเจลที่ครอสลิงค์ด้วยดีทีทีเพียงอย่างเดียวใช้เวลาในการก่อตัวเป็นเจลน้อยที่สุดคือ 60 นาที<sup>(69)</sup>

ต่อมาในปี 2018 Trakiattikul<sup>(5)</sup> และคณะได้ศึกษาไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกในรูปแบบชนิดที่ปรับปรุงโครงสร้างเมทาคริลิกแอนไฮไดรด์ (Methacrylic anhydride) และครอสลิงค์ด้วยดีทีทีโดยมีแมนนิทอล (Mannitol) เป็นสารเพิ่มปริมาณยาและใช้บีเอสเอ (Bovine serum albumin; BSA) เป็นตัวแทนโปรตีน พบว่าไฮโดรเจลที่ได้มีสมบัติทางกายภาพที่ดี สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการขนส่งยาได้ แต่ยังมีระยะเวลาในการก่อตัวเป็นเจลอยู่ในช่วงระยะเวลาไม่ต่ำกว่า 30 นาทีซึ่งยังคงค่อนข้างนานหากพิจารณาสำหรับนำมาใช้ในทางคลินิก<sup>(5)</sup> เช่นเดียวกับการศึกษาของ Areevijit<sup>(6)</sup> และคณะในปี 2021 ที่ศึกษาความเข้ากันได้ทางชีวภาพของเมทาคริลเลตไฮยาลูโรนิกแอซิดไฮโดรเจล (Methacrylate hyaluronic acid hydrogel) ที่ครอสลิงค์ด้วยดีทีทีกับเซลล์กระดูกเบ้าฟันมนุษย์ พบว่าเมทาคริลเลตไฮยาลูโรนิกแอซิดไฮโดรเจลที่มีการครอสลิงค์ด้วยดีทีที มีความเข้ากันได้กับเซลล์กระดูกเบ้าฟันมนุษย์และมีสมบัติทางกายภาพทั่วไปที่ดีแต่ยังมีข้อด้อยสำคัญเช่นเดียวกันคือ ระยะเวลาในการก่อตัวเป็นเจลที่ยังค่อนข้างนานอยู่ในช่วงระยะเวลา 15-30 นาที ซึ่งอาจยังไม่เหมาะสมในการนำไปประยุกต์ใช้ในการทดสอบทางคลินิกได้<sup>(6)</sup>

### การครอสลิงค์จากการบ่มตัวด้วยแสง (Photo-cross link)

เนื่องด้วยไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกเป็นสารที่นิยมนำมาใช้ในการศึกษาในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อ เนื่องจากมีส่วนประกอบที่คล้ายคลึงกับแมทริกซ์ระหว่างเซลล์ ทำให้มีการพัฒนาสูตรโครงสร้างของไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกอย่างต่อเนื่องเพื่อให้ได้ไฮโดรเจลที่มีสมบัติเหมาะสมที่จะนำไปใช้ในทางคลินิก โดยวิธีการปรับปรุงโครงสร้างมักทำด้วยการเติมครอสลิงค์เกอร์เพื่อเชื่อมโยงสายโซ่โมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกเข้าด้วยกันเพื่อให้เกิดเป็นโครงสร้างสามมิติ หนึ่งในวิธีที่นิยมคือการใช้ครอสลิงค์เกอร์ที่ถูกกระตุ้นด้วยแสง (Photo-cross linker) หรือตัวเริ่มต้นที่ถูกกระตุ้นด้วยแสง (Photo-initiator) เนื่องจากสามารถควบคุมเวลาในการเกิดการก่อตัวเป็นเจลได้ง่าย รวมถึงเป็นวิธีที่ลดความเสี่ยงที่จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของโปรตีนหรือไฮโดรเจลอันเนื่องมาจากการเติมสารเคมีหลายชนิดในการครอสลิงค์<sup>(70)</sup> โดย

ปฏิกิริยาจะการครอสลิงค์จะเกิดเมื่อครอสลิงค์เกอร์หรือตัวเริ่มต้นได้รับแสงที่มีความยาวคลื่นที่เหมาะสมและเกิดการแตกตัวให้สารอนุมูลอิสระขึ้น (Free radical) สารอนุมูลอิสระจะให้อิเล็กทรอนิกส์แก่คาร์บอนอะตอมบริเวณพันธะคู่ภายในสายโซ่โมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกทำให้เกิดการเชื่อมต่อกับสายโซ่โมเลกุลอื่นต่อไป<sup>(71)</sup>

ในปี 2009 Fairbanks B.<sup>(72)</sup> และคณะได้ทำการศึกษาการครอสลิงค์ไฮโดรเจลโดยใช้แอลเอพี (Lithium phenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphinate ; LAP) เป็นตัวเริ่มต้นที่ถูกกระตุ้นด้วยแสงในความยาวคลื่นใกล้เคียงกับแสงสีฟ้า ในการครอสลิงค์ไดอะคริเลตพอลิเอทิลีนไกลคอลไฮโดรเจล (Diacrylated polyethyleneglycol; PEGDA) พบว่าการก่อตัวเป็นเจลจะเกิดขึ้นดีที่สุดที่ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร และพบว่าไฮโดรเจลจากพีอีจีดีเอที่ครอสลิงค์ด้วยแอลเอพีมีความเข้ากันได้กับเซลล์ไฟโบรบลาสต์เมื่อทำการทดสอบด้วยวิธีการห่อหุ้มเซลล์ด้วยไฮโดรเจล โดยมีอัตราการมีชีวิตของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ถึง 95%<sup>(72)</sup> ต่อมาในปี 2018 Wang G.<sup>(73)</sup> และคณะได้ศึกษาไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกและพีอีจีดีเอในรูปแบบชนิดโดยใช้แอลเอพีเป็นตัวเริ่มต้นที่ถูกกระตุ้นด้วยแสงร่วมกับปฏิกิริยาการเชื่อมต่อกับโมเลกุลไฮโดรคาร์บอนจากการเหนี่ยวนำด้วยความร้อน (Thermal-induced Diels-Alder reaction) พบว่าการก่อตัวเป็นเจลที่มีความยาวคลื่น 365 นาโนเมตรเกิดขึ้นโดยใช้เวลาเพียง 30 วินาที และคุณสมบัติของไฮโดรเจลที่ได้มีความสามารถในการพองตัวเมื่อเจอน้ำและมีลักษณะการคงตัวที่ดี ความแข็งแรงของไฮโดรเจลจะเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆตามระยะเวลาที่นำไปบ่มในอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แสดงให้เห็นว่ามีความเข้ากันได้ของการครอสลิงค์ไฮโดรเจลด้วยวิธีทั้งสองและเมื่อนำไฮโดรเจลมาทดสอบกับเซลล์กระดูกอ่อนพบว่าการแสดงออกของเซลล์กระดูกอ่อนที่ปกติ<sup>(73)</sup>

ในปี 2021 Chaopanitcharoen<sup>(7)</sup> และคณะได้พัฒนาไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกชนิดที่มีการพอลิเมอไรเซชันจากการบ่มด้วยแสงสีฟ้า โดยการใช้แอลเอพีเป็นตัวเริ่มต้นในการเกิดพอลิเมอไรเซชันด้วยแสง ซึ่งผลการวิจัยแสดงให้เห็นถึงคุณสมบัติทางกายภาพที่เหมาะสมต่อการนำมาใช้ในวิศวกรรมเนื้อเยื่อ อาทิ มีการพองตัวเมื่อสัมผัสกับน้ำ มีรูพรุนที่มีขนาดเท่าๆกันทั่วทั้งไฮโดรเจล สามารถย่อยสลายได้ด้วยเอนไซม์ไฮยาลูโรนเดส คาดว่าสมบัติเหล่านี้เป็นสมบัติที่เอื้อให้เซลล์สามารถเจริญเติบโตได้เมื่อนำมาเลี้ยงร่วมกับไฮโดรเจล นอกจากนี้ไฮโดรเจลตามสูตรของงานวิจัยนี้ยังสามารถเตรียมได้โดยง่ายและใช้ระยะเวลาในการก่อตัวเป็นเจลที่รวดเร็ว มีความปลอดภัยและต้นทุนต่ำเมื่อเทียบกับปฏิกิริยาที่ใช้สารเคมีในการครอสลิงค์ ทางผู้วิจัยจึงมีความตั้งใจนำไฮโดรเจลชนิดดังกล่าวมาทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพกับเซลล์ไฟโบรบลาสต์เพื่อ

เป็นแนวทางในการพัฒนาไฮโดรเจลสำหรับวิศวกรรมเนื้อเยื่ออ่อนและ/หรือเนื้อเยื่อแข็งที่มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพกับเซลล์ที่ดีในทางคลินิกต่อไป

### การทดสอบความเข้ากันได้ของเซลล์กับวัสดุสแคฟโฟลด์ (Compatibility test)

ในการศึกษาความเข้ากันได้ของวัสดุทางชีวภาพหรือสแคฟโฟลด์จะใช้การทดสอบความมีชีวิตต่อเซลล์ (Cell viability assay) ในการทดสอบ ซึ่งวิธีที่นิยมใช้ในการทดสอบคือวิธีวิเคราะห์เอ็มทีที (MTT assay) และวิธีวิเคราะห์รีซาซูลินรีดักชัน (Resazurin reduction assay) ซึ่งทั้ง 2 วิธีเป็นวิธีการทดสอบที่มีขั้นตอนไม่ยุ่งยาก สามารถใช้ได้กับทั้งเซลล์ที่เกาะบนพื้นผิวและเซลล์ที่ลอยอยู่ในสารละลายและมีค่าใช้จ่ายสำหรับชุดทดสอบที่สมเหตุสมผล หลักการของเอ็มทีทีและรีซาซูลินเป็นการวัดตัวบ่งบอกทางชีวเคมี (Biochemical markers) เพื่อประเมินระดับการทำงานของเซลล์ ในที่นี้คือตัวให้อิเล็กตรอน 2 ตัว (NADH and NADPH) ซึ่งเป็นตัวให้อิเล็กตรอนที่เป็นส่วนหนึ่งของปฏิกิริยาเคมีภายในเซลล์ หากมีอัตราการเปลี่ยนแปลงของตัวให้อิเล็กตรอนมาก (Turnover rate) ก็แสดงให้เห็นว่าเซลล์นั้นๆมีปฏิกิริยาเคมีภายในเซลล์เกิดขึ้นมาก โดยสามารถวัดอัตราการเปลี่ยนแปลงของตัวให้อิเล็กตรอนที่เกิดขึ้นได้โดยการเกิดปฏิกิริยารับอิเล็กตรอน (Reduction reaction) ในสารประกอบจำพวกเตตระโซเลียม (Tetrazolium) เช่น เอ็มทีที (MTT) เอ็มทีเอส (MTS) เอ็กซ์ทีที (XTT) หรือ ดับเบิลยูเอสที (WST) หรือการเกิดปฏิกิริยารับอิเล็กตรอนด้วยดีไฮโดรจีเนส (Dehydrogenase) โดยใช้ตัวให้อิเล็กตรอนทั้งสองเป็นสารตั้งต้นสารที่ใช้ในการทดสอบที่กล่าวมา เมื่อได้รับอิเล็กตรอน (Reduced form) จะเกิดเป็นสารประกอบที่มีฟลูออเรสเซนส์ขึ้นและสามารถวัดค่าได้โดยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) ถ้าเซลล์มีการแบ่งเซลล์เป็นปกติระหว่างเลี้ยงเซลล์ ความหนาแน่นของเซลล์ภายในภาชนะเลี้ยงเซลล์จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับค่าฟลูออเรสเซนส์ที่เกิดจากการทดสอบความมีชีวิตของเซลล์<sup>(74)</sup>

วิธีวิเคราะห์เอ็มทีทีเป็นการใช้เกลือเตตระโซเลียมที่เปลี่ยนเป็นฟอร์มาซานที่ไม่ละลายน้ำ (Water-insoluble formazan) ซึ่งจะเกิดเป็นผลึกขึ้นภายในเซลล์ ผลึกที่เกิดขึ้นจะทำให้เยื่อหุ้มเซลล์แตกและทำให้เซลล์ตายลงที่สุดในที่สุด ผลที่ตามมาคือการสร้างฟอร์มาซานจะหยุดลงและเป็นจุดสิ้นสุดของปฏิกิริยา ข้อเสียที่ชัดเจนของวิธีนี้คือการที่ท้ายที่สุดเซลล์ที่ทดสอบจะต้องตายอย่างหลีกเลี่ยงไม่ได้และต้องมีขั้นตอนเพิ่มเติมก่อนการวัดฟลูออเรสเซนส์ที่เกิดขึ้น

วิธีวิเคราะห์รีซาซูลินหรืออลามาร์บลู (Alamar blue) เป็นวิธีที่เกิดจลนศาสตร์ปฏิกิริยาอันดับหนึ่งเทียม (Pseudo first-order reaction kinetic) แต่ผลิตภัณฑ์ฟลูออเรสเซนส์ที่เกิดขึ้นให้ความไวต่อการทดสอบที่มากขึ้น โดยเฉพาะในกรณีที่มีปริมาณเซลล์ไม่มากแต่อย่างไรก็ตามวิธีนี้ยังมีข้อควรระวังหลายอย่าง

### วิธีวิเคราะห์เอ็มทีที

สารละลายเกลือเตตระโซเลียมเป็นสารละลายที่ไม่มีฟลูออเรสเซนต์แต่เมื่อเปลี่ยนเป็นฟอร์มาซานจะเกิดฟลูออเรสเซนต์ขึ้น ในการทดสอบด้วยวิธีวิเคราะห์เอ็มทีทีจะใช้เกลือเตตระโซเลียมชนิดไดเมทิลโทอะโซลไดฟีนิลเตตระโซเลียมโบรไมด์ (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) หรือเรียกว่าเอ็มทีที ซึ่งถูกแนะนำโดย Mosmann เพื่อวัดการเพิ่มจำนวนและความเป็นพิษต่อเซลล์ในภาดเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม<sup>(75)</sup> เอ็มทีทีมีฟังก์ชันละลายในไขมันได้ในโมเลกุลและมีประจุบวกทำให้สามารถผ่านเยื่อหุ้มเซลล์และรับอิเล็กตรอนจากเอนไซม์ต่างๆในเซลล์ที่มีชีวิต เช่น ออกซิโดรีดักเตส (Oxidoreductase) ดีไฮโดรจีเนส (Dehydrogenase) ออกซิเดส (Oxidase) และเพอรอกซิเดส (Peroxidase) โดยใช้ตัวให้อิเล็กตรอนภายในเซลล์ (NADH, NADPH, succinate หรือ pyruvate) เป็นสารตั้งต้น ผลก็คือเอ็มทีทีจะถูกเปลี่ยนเป็นฟอร์มาซานที่ไม่ละลายน้ำ<sup>(74)</sup> นอกจากนี้ยังมีปฏิกิริยาที่ไม่อาศัยเอนไซม์ในการให้อิเล็กตรอนแก่เอ็มทีทีอีกด้วย เช่น จากโมเลกุลของกรดแอสคอร์บิก (Ascorbic acid) กลูตาไธโอน (Glutathione) หรือโคเอนไซม์เอ (Coenzyme A)

ฟอร์มาซานที่เกิดขึ้นภายในเซลล์จะเป็นผลิตภัณฑ์ที่แหลมคมและทำให้เซลล์ตายลงเร็วที่สุด ทำให้หยุดปฏิกิริยาเคมีภายในเซลล์และหยุดการเปลี่ยนเอ็มทีทีเป็นฟอร์มาซานอย่างรวดเร็ว เกิดเป็นจุดสิ้นสุดขึ้นเนื่องจากผลิตภัณฑ์ฟอร์มาซานเกิดขึ้นภายในเซลล์ การทำการทดสอบด้วยเอ็มทีทีจึงมักมีขั้นตอนการทำลายเซลล์และขั้นตอนการละลายฟอร์มาซานก่อนการวัดค่าผลการทดสอบ ทำให้ถึงแม้เอ็มทีทีจะเป็นวิธีการทดสอบที่ใช้ระยะเวลาไม่นานแต่ด้วยการที่มีขั้นตอนเพิ่มเติมทำให้วิธีนี้ไม่ถือว่าเป็นวิธีที่ได้ผลทดสอบตามเวลาที่เกิดขึ้นจริง<sup>(74)</sup>

### วิธีซาซุรินรีดักชัน

วิธีซาซุรินถูกค้นพบโดย Weselsky และเริ่มใช้มาตั้งแต่ช่วงท้ายของยุค 1920s ซึ่งในขณะนั้นใช้ในการประเมินการติดเชื้อของแบคทีเรียในนม หลังจากนั้นวิธีซาซุรินก็ถูกนำมาใช้เป็นตัววัดระดับปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ในหลากหลายแง่มุม ทั้งการทดสอบความมีชีวิตของเซลล์<sup>(76)</sup> การเพิ่มจำนวนของเซลล์ และความเป็นพิษต่อเซลล์<sup>(77)</sup> หลักการทำงานของวิธีซาซุรินคือการให้อิเล็กตรอนภายในเซลล์ที่มีชีวิตแล้วเปลี่ยนเป็นรีโซรูฟิน (Resorufin)<sup>(78)</sup> กลไกการให้อิเล็กตรอนของวิธีซาซุรินนั้นมีหลากหลายทั้งได้รับจากตัวให้อิเล็กตรอน (NADH, NADPH) การรับอิเล็กตรอนจากเอนไซม์ของไมโทคอนเดรีย (Mitochondrial enzyme)<sup>(79)</sup> เอนไซม์จากไมโครโซม (Microsomal enzyme)<sup>(80)</sup> หรือเอนไซม์จากการหายใจระดับเซลล์<sup>(81)</sup> หรือจากสารที่ทำหน้าที่ส่งต่ออิเล็กตรอนโดยเฉพาะ เช่น พีเอ็มเอส (N-methylphenazinium methosulfate; PMS) แต่ไม่พบการให้อิเล็กตรอนจากเอ็นเอดีเอชโดยตรง<sup>(82)</sup>



ริซาซุรินสามารถละลายในบัฟเฟอร์ได้ทำให้สามารถเข้าร่วมกับงานเลี้ยงเซลล์ได้โดยตรง สีของสารละลายริซาซุรินเป็นสีน้ำเงินเข้มโดยพบฟลูออเรสเซนซ์ในปริมาณน้อย แต่เมื่อริซาซุรินเคลื่อนที่เข้าไปในเซลล์ที่มีชีวิตและได้รับอิเล็กตรอน ริซาซุรินจะเปลี่ยนเป็นริโซรูฟินที่มีสีชมพูและมีฟลูออเรสเซนซ์ เมื่อถูกกระตุ้นด้วยความยาวคลื่น 579 นาโนเมตร ริโซรูฟินจะปล่อยฟลูออเรสเซนซ์ที่มีความยาวคลื่น 584 นาโนเมตรออกมา คุณสมบัติทางสเปกตรัมของริซาซุรินและริโซรูฟินมีความแตกต่างกัน โดยริซาซุรินจะดูดกลืนแสงได้ดีที่มีความยาวคลื่น 605 นาโนเมตร ส่วนริโซรูฟินจะดูดกลืนได้ดีที่มีความยาวคลื่น 573 นาโนเมตร เมื่อริซาซุรินเปลี่ยนเป็นริโซรูฟินแล้วจะยังคงคุณสมบัติในการละลายน้ำไว้อยู่ ทำให้เซลล์ไม่ตายหลังทดสอบด้วยริซาซุรินและสามารถใช้เซลล์ในการทดสอบอื่นต่อไปได้

ข้อดีของริซาซุรินคือมีค่าใช้จ่ายในการทดสอบต่ำและสามารถทำร่วมกับการทดสอบอย่างอื่นได้ เช่น การวิเคราะห์แคสเปส (Caspase) เพื่อหาการตายของเซลล์แบบเป็นระบบ (Apoptosis) ในการเลี้ยงเซลล์<sup>(83)</sup> การวิเคราะห์ด้วยริซาซุรินมีความไวและน่าเชื่อถือมากกว่าการใช้สีย้อมในกลุ่มเตตระโซเลียม

### บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย

การศึกษาวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยวางแผนเพื่อวิจัย โดยมีลำดับขั้นตอนดังต่อไปนี้

การกำหนดกลุ่มตัวอย่าง

ขั้นตอนการทดลอง

การเก็บรวบรวมข้อมูล

สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

#### การกำหนดกลุ่มตัวอย่าง

##### เซลล์ที่ใช้ในการทดสอบ

ไฟโบรบลาสต์แอล 929 จากบริษัทไบโอมีเดียไทยแลนด์

##### ไฮโดรเจลจากกรดไฮยาโลโรนิกที่มีการพอลิเมอไรเซชันจากการบ่มด้วยแสงสีฟ้า

ในการศึกษานี้จะใช้ไฮโดรเจลจากกรดไฮยาโลโรนิกที่มีการพอลิเมอไรเซชันจากการบ่มด้วยแสงสีฟ้าที่ดัดแปลงมาจากสูตรของ Chaopanitcharoen และคณะ (2021) ซึ่งได้ทำการศึกษาระยะเวลาในการบ่มด้วยแสงสีฟ้าที่แตกต่างกันของสารละลายเมทาคริลेटไฮยาโลโรนิกแอซิด ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ผสมกับสารละลายลิเทียมฟีนิลไตรเมทิลเบนโซอิลฟอสฟิเนต (Lithium phenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphinate: LAP) ความเข้มข้น 15 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งในการทดสอบการเจริญเติบโตของเซลล์จะเปรียบเทียบผลของการบ่มไฮโดรเจลด้วยการฉายแสงสีฟ้าเป็นเวลา 60 วินาทีและ 90 วินาทีเพื่อดูความแตกต่างของการเจริญเติบโตเมื่อนำเซลล์มาเลี้ยงร่วมกับไฮโดรเจล ขั้นตอนการเตรียมไฮโดรเจลจากกรดไฮยาโลโรนิกที่มีการพอลิเมอไรเซชันจากการบ่มด้วยแสงสีฟ้าจะกล่าวถึงในส่วนต่อไป การกำหนดกลุ่มตัวอย่างในงานวิจัยครั้งนี้แสดงในภาพประกอบ 8

- *Mus musculus* C3H/An
- Thawed at P.30
- Experiment >> P.34 - P.36

**CELL : L929 FIBROBLAST**  
**HYDROGEL : HYALURONIC ACID BASED**  
**HYDROGEL POLYMERIZED BY**  
**BLUE LIGHT** (Chaopanitcharoen, 2021)

- 47 kDa HA
- 3% MeHA W/V
- LAP 15 mg/L : MeHA 100 mg/L
- 480 nm, 1800 mW, 1 cm

ภาพประกอบ 8 แสดงการกำหนดกลุ่มตัวอย่างในงานวิจัยครั้งนี้

### ขั้นตอนการทดลอง

1. การสังเคราะห์ไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกที่มีการพอลิเมอไรเซชันโดยแสงสีฟ้า

#### 1.1 การสังเคราะห์เมทาคริลเลตไฮยาลูโรนิกแอซิด

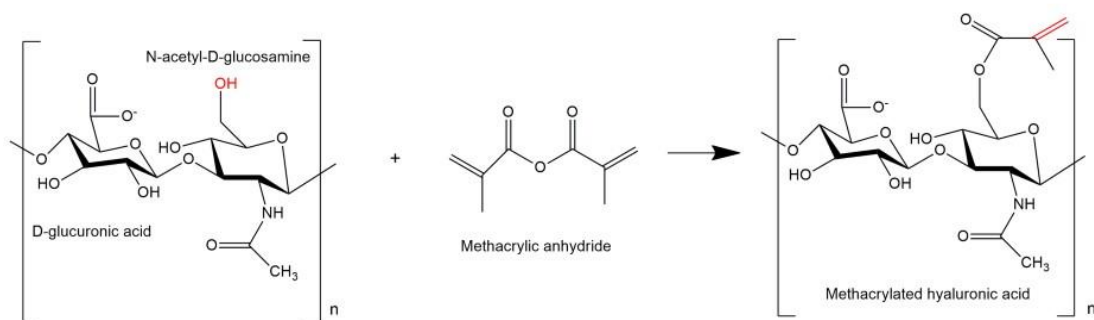
##### อุปกรณ์

- ไฮเดียมไฮยาลูโรเนตน้ำหนักโมเลกุล 47 กิโลดาลตันจากบริษัท Daliha
- สารละลายโพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์
- เมทาคริลิกแอนไฮไดรด์จากบริษัท Sigma-Aldrich
- สารละลายไฮเดียมไฮดรอกไซด์ 5 โมลาร์
- น้ำอัลตราเพียว
- เทอโมมิเตอร์
- น้ำแข็ง
- เครื่องผสมสารชนิดแม่เหล็ก (Magnetic stirrer) รุ่น MSH-300 จากบริษัท Biosan
- ถุงกรอง SnakeSkin Dialysis Tubing จากบริษัท Thermo scientific
- เครื่องปั่นเหวี่ยง รุ่น ROTINA 380 R จากบริษัท Hettich
- เครื่องฉายแสงรุ่น R Max Cure 9

### 1.1.1 การผสมเมทาคริเลตแอนไฮไดรด์กับไซเดียมไฮยาโลโรเนต

การเตรียมไฮโดรเจลจากกรดไฮยาโลโรนิกที่มีการพอลิเมอไรเซชันโดยแสงสีฟ้าในการศึกษาครั้งนี้จะใช้วิธีการเตรียมตามขั้นตอนในการศึกษาของ Chaopanitcharoen (2021)<sup>(7)</sup> กรดไฮยาโลโรนิกเป็นโพลีเมอร์ที่พบได้มากในแมทริกซ์ระหว่างเซลล์ ถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อ แต่ลำพังเพียงแค่อสายโพลีเมอร์ของกรดไฮยาโลโรนิกไม่สามารถเกิดการครอสลิงค์เป็นโครงร่างสามมิติเกิดเป็นไฮโดรเจลได้ จำเป็นต้องมีการปรับปรุงโครงสร้างเสียก่อน โดยวิธีที่จะใช้ในการปรับปรุงโครงสร้างในการศึกษานี้จะเป็นการเติมหมู่ไวนิลเข้าไปยังตำแหน่งหมู่ไฮดรอกซิลปฐมภูมิของกรดไฮยาโลโรนิกผ่านการเติมเมทาคริเลตแอนไฮไดรด์ จะเรียกกรดไฮยาโลโรนิกที่ผ่านการปรับปรุงโครงสร้างด้วยเมทาคริเลตแอนไฮไดรด์แล้วว่าเมทาคริเลตไฮยาโลโรนิกแอสิด

ขั้นตอนการสังเคราะห์เมทาคริเลตไฮยาโลโรนิกแอสิดเริ่มจากซิงไซด์เดียมไฮยาโลโรเนตมา 0.5 กรัม ใส่ในสารละลายโพแทสเซียมเพตบัพเฟออร์ 0.1 โมลาร์ปริมาตร 50 มิลลิลิตร นำไปผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสารชนิดแม่เหล็ก จะได้สารละลายโพแทสเซียมเพตบัพเฟออร์ที่มีไซเดียมไฮยาโลโรเนตละลายอยู่ในสัดส่วน 1% โดยน้ำหนัก นำไปใส่ในภาชนะที่บรรจุน้ำแข็งโดยยังคงให้เครื่องผสมสารชนิดแม่เหล็กทำงานอยู่ตลอดเวลา ติดตั้งเทอร์มิเตอร์ไว้เพื่อทำการวัดอุณหภูมิสารละลายตลอดการเกิดปฏิกิริยา โดยต้องคงให้อุณหภูมิอยู่ในช่วง 0-4 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการวัดและจดบันทึก pH ของสารละลาย ทำการปรับ pH ของสารละลายด้วยไซเดียมไฮดรอกไซด์ 5 โมลาร์ให้อยู่ในช่วง 8-10 ตลอดการเกิดปฏิกิริยา เมื่ออุณหภูมิและค่า pH เหมาะสมให้ค่อยๆหยดเมทาคริเลตแอนไฮไดรด์ลงไปในสารละลายจนครบปริมาตร 1,281 ไมโครลิตร ทำการวัดอุณหภูมิและค่า pH ทุก 10 นาที หากอุณหภูมิสูงเกิน 4 องศาเซลเซียสหรือค่า pH ต่ำกว่า 8 ให้ทำการปรับค่าทันที เมื่อครบ 8 ชั่วโมงให้เติมเมทาคริเลตแอนไฮไดรด์อีก 640 ไมโครลิตร ปรับอุณหภูมิและค่า pH ให้เหมาะสมทำการสังเกตอุณหภูมิและค่า pH ต่ออีก 2 ชั่วโมงจากนั้นนำไปใส่ตู้เย็นเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะได้สารละลายที่มีเมทาคริเลตแอนไฮไดรด์กับไซเดียมไฮยาโลโรเนตในสัดส่วนโดยโมล 10:1 ที่กำลังเกิดปฏิกิริยาเป็นเมทาคริเลตไฮยาโลโรนิกแอสิด โดยปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจะเป็นดังภาพประกอบ 9



Tsanaktsidou 2020

ภาพประกอบ 9 แสดงการเกิดปฏิกิริยาในขั้นตอนการปรับปรุงโครงสร้างกรดไฮยาลูโรนิกด้วย  
เมทาคริเลตแอนไฮไดรด์<sup>(84)</sup>

### 1.1.2 การกำจัดเมทาคริเลตแอนไฮไดรด์ส่วนเกิน

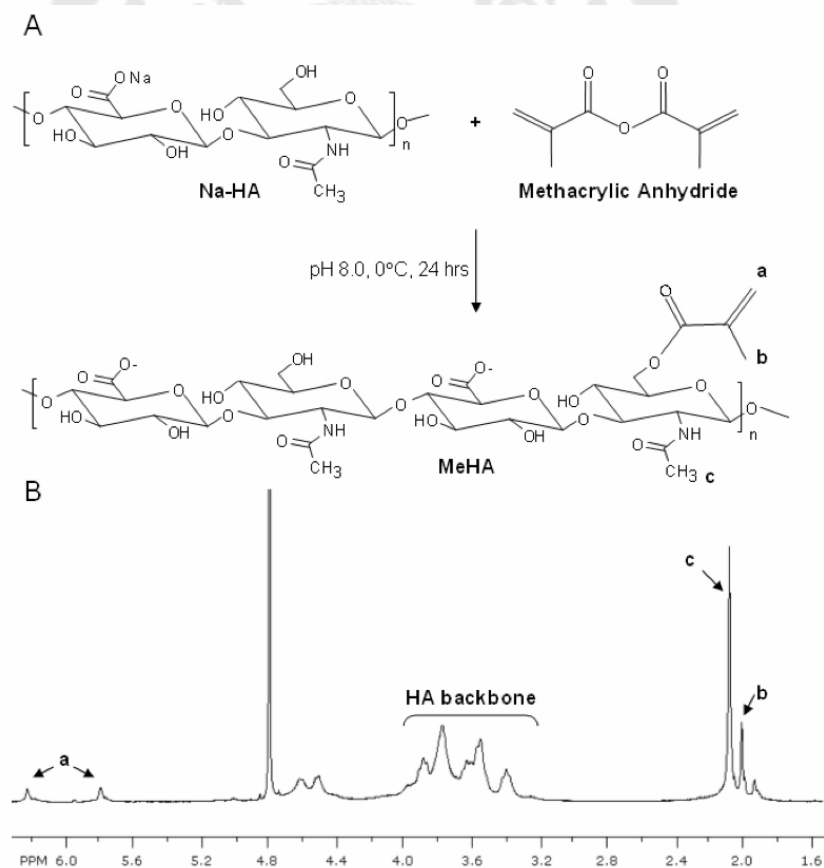
ทำการตัดถุงกรอง SnakeSkin Dialysis Tubing ที่มีความจุ 3.7 มล/ชม ยาว 30 ซม 1 ถุง นำไปแช่น้ำร้อนเป็นเวลา 2 นาทีในบีกเกอร์ขนาด 600 มล เพื่อกำจัดซัลเฟต จากนั้นนำมาแช่น้ำอุณหภูมิห้องอีก 10 นาที พับปลายถุง 2 ทบแล้วหนีบปลายไว้ไม่ให้มีรูรั่ว จากนั้นนำสารละลายเมทาคริเลตไฮยาลูโรนิกในตู้เย็นมาเทใส่ถุงกรองทั้งหมด พับปากถุงแล้วหนีบไม่ให้มีรูรั่วจับปลาย 2 ฝั่งเข้าหากันแล้วติดตั้งเครื่องมือลอยน้ำ (Floating device) นำไปแช่ในถังใส่น้ำอัลตราพิวขนาดปริมาตร 3 ลิตร แล้วนำไปติดตั้งบนเครื่องผสมสารแบบแม่เหล็กในตู้เย็น ทำการเปิดเครื่องไว้ตลอดขั้นตอนการกรอง ทำการเปลี่ยนน้ำอัลตราพิวทุกๆ 30 นาทีจนครบ 2 ชั่วโมง จากนั้นให้เปลี่ยนน้ำอัลตราพิวทุก 1 ชั่วโมงต่อจนครบ 2 ชั่วโมง จากนั้นให้ทำการเปลี่ยนน้ำอัลตราพิวทุกๆ 1-2 วันจนครบ 7 วัน

เมื่อครบ 7 วันให้นำสารละลายเมทาคริเลตไฮยาลูโรนิกภายในถุงกรองมาแบ่งใส่หลอดปั่นเหวี่ยง 4 หลอด นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จะพบตะกอนเกิดขึ้นเล็กน้อยซึ่งเป็นตะกอนของเมทาคริเลต-ไฮยาลูโรนิกแอสิดที่เกิดการย่อยสลาย ทำการเก็บเอาเฉพาะส่วนของเหลวด้านบนไว้ในหลอดใหม่ จะได้เมทาคริเลตไฮยาลูโรนิกแอสิดที่มีความบริสุทธิ์ ให้นำไปแช่แข็งในตู้ -20 องศาเซลเซียส

### 1.1.3 การตรวจปริมาณการเกิดการปรับปรุง (Degree of modification)

นำสารละลายเมทาคริเลตไฮยาลูโรนิกที่แช่แข็งแล้วไปทำให้แห้งด้วยวิธีแช่แข็งแบบเยือกแข็ง (Freeze dry, Lyophilization) ซึ่งจะใช้เวลาประมาณ 2 วัน น้ำที่อยู่ใน

สารละลายจะถูกทำให้ระเหิดออกไปหมดเหลือเป็นร่างแหของเมทาคริเลตไฮยาโลโรนิกที่มีลักษณะคล้ายฟองน้ำ ทำการแบ่งเมทาคริเลตไฮยาโลโรนิกมา 13 มิลลิกรัมทำการเติมดิวทีเลียม (Deuterium) ลงไป 0.5 มิลลิลิตร แล้วดูคมาใส่หลอด NMR ให้มีสารละลายสูงอย่างน้อย 4 เซนติเมตร ทำการปิดจุกให้แน่นแล้วเขียนระบุชื่อและวันที่ให้เรียบร้อย จากนั้นจึงนำส่งเพื่อทำโปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโคปี ( $^1\text{H}$ -NMR spectroscopy) ผลที่ได้จะเป็นกราฟดังภาพประกอบ 10 ซึ่งสามารถนำค่าจากกราฟมาคำนวณหาค่าปริมาณการเกิดการปรับปรุงได้จากสูตร Degree of modification =  $\frac{(a \times \frac{3}{2})}{c - (a \times \frac{3}{2})} \times 100$  โดยค่าปริมาณการเกิดการปรับปรุงของเมทาคริเลตไฮยาโลโรนิกแอสิดจะต้องมีค่าตั้งแต่ร้อยละ 60 ขึ้นไป จึงจะนำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้



ภาพประกอบ 10 แสดงกราฟผลการทำโปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโคปีของเมทาคริเลตไฮยาโลโรนิกแอสิด โดย a คือพีคของโปรตอนของเมทีนจากหมู่ไวนิล b คือพีคของโปรตอนของเมทิลจากหมู่ไวนิล c คือพีคของโปรตอนเมทิลจากกรดไฮยาโลโรนิก

#### 1.1.4 การฆ่าเชื้อเมทาคริลเลตไฮยาโลโรนิกแอซิด

เมื่อได้เมทาคริลเลตไฮยาโลโรนิกแอซิดที่มีค่าปริมาณการเกิดการปรับปรุงอยู่ในช่วงที่มากกว่าร้อยละ 60 จะนำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้ แต่ก่อนนำมาใช้จะต้องทำการฆ่าเชื้อก่อนด้วยการนำไปแช่ใน 99.99% เอทิลแอลกอฮอล์ (Ethyl alcohol) เป็นเวลา 10 นาทีจากนั้นนำไปอบรังสีอัลตราไวโอเล็ตภายในตู้ปลอดเชื้อต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมงจะได้เมทาคริลเลตไฮยาโลโรนิกแอซิดที่พร้อมนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

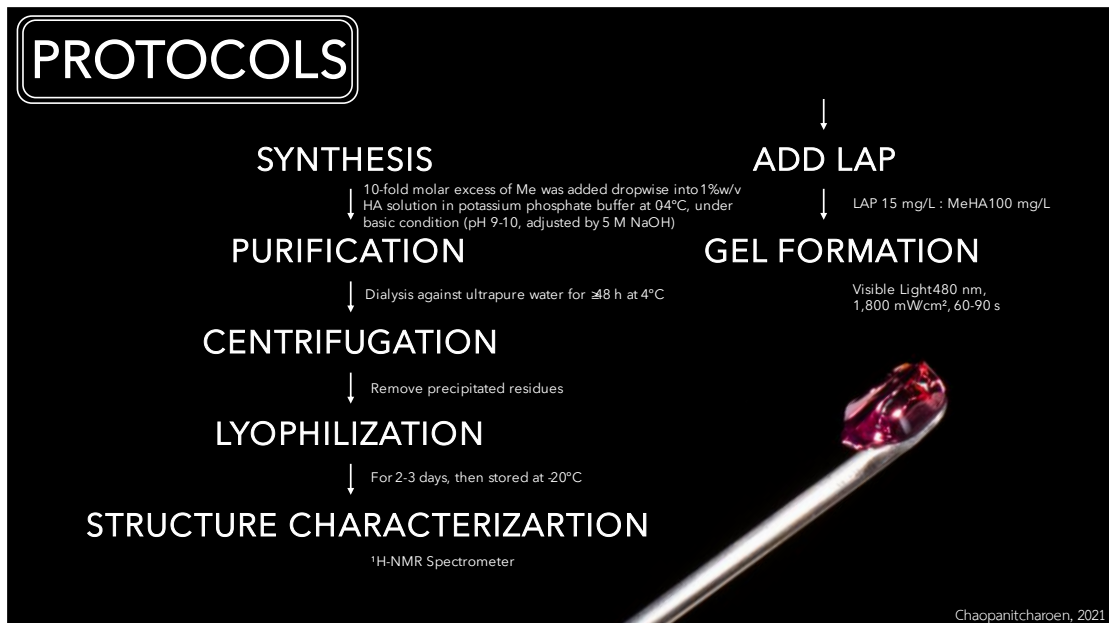
#### 1.2 การเตรียมสารละลายไฮโดรเจล

##### 1.2.1 การผสมเมทาคริลเลตไฮยาโลโรนิกกับแอลเอพี

ในการทำให้เมทาคริลเลตไฮยาโลโรนิกเกิดการก่อตัวเป็นไฮโดรเจลซึ่งเป็นโครงร่างสามมิติจำเป็นต้องใส่สารที่ทำหน้าที่เกิดการครอสลิงค์ลงไป ซึ่งในการทดลองนี้จะใช้สารที่ชื่อว่าลิเทียมฟีนิลไตรเมทิลเบนโซอิลฟอสฟิเนต (Lithium phenyl-2,4,6-trimethyl benzoylphosphinate :LAP)) ซึ่งเป็นสารที่จะถูกกระตุ้นให้เกิดอนุมูลอิสระขึ้นได้เมื่อได้รับแสงในความยาวคลื่น 450-500 นาโนเมตรหรือก็คือช่วงความยาวคลื่นของแสงสีฟ้า เมื่อเกิดอนุมูลอิสระจะทำให้เมทาคริลเลตไฮยาโลโรนิกแอซิดเกิดการสร้างพันธะเชื่อมกันระหว่างแต่ละสายโซ่โมเลกุลในบริเวณหมู่ไวนิลเกิดเป็นไฮโดรเจลขึ้น ในการผสมสารละลายไฮโดรเจลจะทำภายใต้ตู้ปลอดเชื้อโดยเริ่มจากนำเมทาคริลเลตไฮยาโลโรนิกที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วมาละลายในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดดีเอ็มอีเอ็ม จากนั้นทำการผสมแอลเอพีลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดดีเอ็มอีเอ็ม แล้วนำไปกรองเชื้อออกผ่านแผ่นกรองอาหารเลี้ยงเซลล์ จากนั้นนำมาผสมในเมทาคริลเลตไฮยาโลโรนิกที่ละลายในอาหารเลี้ยงเซลล์แล้วให้ได้ความเข้มข้นของเมทาคริลเลตไฮยาโลโรนิก 100 มิลลิกรัมต่อลิตรและแอลเอพี 15 มิลลิกรัมต่อลิตร จะได้เป็นสารละลายไฮโดรเจลที่มีปริมาณพอลิเมอร์เมทาคริลเลตไฮยาโลโรนิกแอซิด 3% ที่ปราศจากเชื้อและพร้อมนำไปทำการทดสอบต่อไป

##### 1.2.2 การก่อตัวเป็นไฮโดรเจล

ในการทดสอบเมื่อต้องการให้สารละลายไฮโดรเจลเกิดการก่อตัว สามารถทำได้โดยใช้เครื่องฉายแสงฉายแสงสีฟ้าลงบนสารละลายไฮโดรเจล ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้จะใช้เครื่องฉายแสงรุ่น R Max Cure 9 ซึ่งเป็นเครื่องที่ให้แสงความยาวคลื่น 480 นาโนเมตร ความเข้มแสง 1,800 มิลลิวัตต์ต่อตารางเซนติเมตร ฉายที่ระยะห่าง 1 เซนติเมตรกับพื้นผิวสารละลายไฮโดรเจล ขั้นตอนการสังเคราะห์เมทาคริลเลตไฮยาโลโรนิกแอซิดไฮโดรเจลเป็นดังภาพประกอบ 11



ภาพประกอบ 11 แสดงขั้นตอนการสังเคราะห์เมทาคริลเลตไฮยาลูโรนิกแอซิดไฮโดรเจล

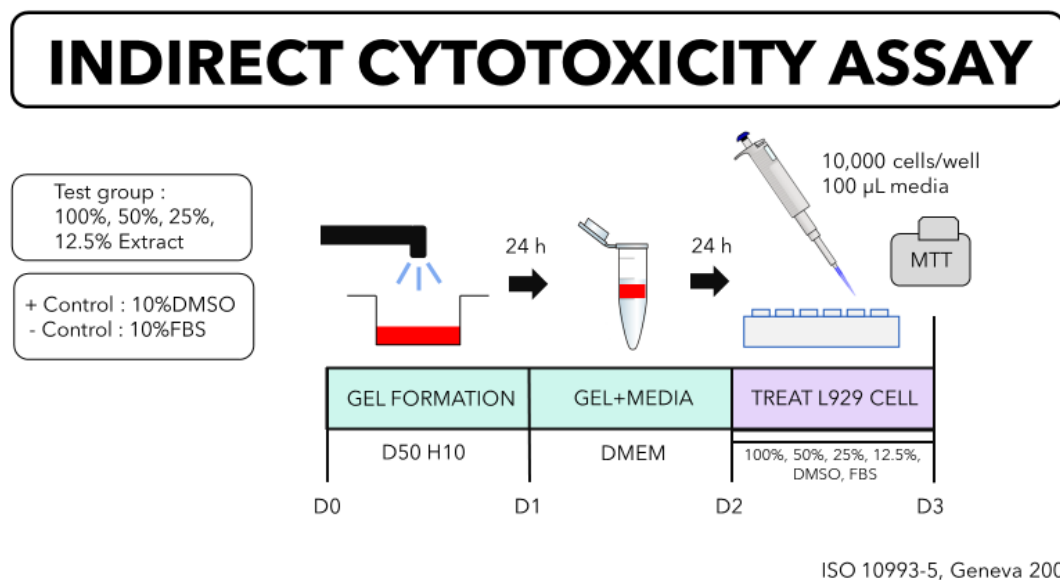
2. การทดสอบความเข้ากันได้ของไฟโบรบลาสต์แอล 929 กับไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกที่มีการพอลิเมอไรซันโดยแสงสีฟ้า

### 2.1 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์โดยอ้อม (Indirect cytotoxicity assay)

วิธีการทดสอบนี้อ้างอิงจาก ISO 10993-5 ซึ่งว่าด้วยการทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพของวัสดุทางการแพทย์กับเซลล์ เริ่มโดยเตรียมสารละลายเมทาคริลเลตไฮยาลูโรนิก-แอซิดที่ผสมกับแอลเอพีตามสัดส่วนที่ได้กล่าวมาแล้ว นำมาขึ้นรูปเป็นไฮโดรเจลในแท่นพิมพ์ให้ได้ลักษณะเป็นวงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 เซนติเมตร หน้า 1 เซนติเมตรโดยทำการฉายแสงสีฟ้าจนก่อตัวเป็นเจลที่สมบูรณ์ จากนั้นนำไปเจาะด้วยตัวเจาะให้ได้ไฮโดรเจลขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร หน้า 1 เซนติเมตรเพื่อนำมาแช่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดดีเอ็มอีเอ็มในหลอดปั่นเหวี่ยงแล้วจึงนำเข้าตู้เลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำเอาเฉพาะอาหารเลี้ยงเซลล์ที่สัมผัสกับไฮโดรเจลมาทดสอบกับไฟโบรบลาสต์แอล 929 ในจานเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม โดยค่อยๆลดความเข้มข้นลงจากความเข้มข้นของอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ 100% เป็น 50%, 25% และ 12.5% ตามลำดับ ในส่วนของกลุ่มควบคุมจะใช้ 10% Dimethyl Sulfoxide เป็นกลุ่มควบคุมลบและ 10%



Fetal bovine serum เป็นกลุ่มควบคุมบวก กำหนดให้ในแต่ละหลุมจะมีเซลล์จำนวน 10,000 เซลล์และได้รับสารทดสอบหลุมละ 100 ไมโครลิตร เมื่อได้รับสารทดสอบครบทุกหลุมจะนำเข้าบ่มในตู้เลี้ยงเซลล์ต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากครบเวลา 24 ชั่วโมงจะทำการวิเคราะห์ความมีชีวิตของเซลล์ด้วยวิธีวิเคราะห์เอ็มทีที ซึ่งค่าฟลูออเรสเซนส์ที่ได้จะบ่งบอกถึงระดับการทำงานของเซลล์ทั้งหมดภายในหลุมเลี้ยงเซลล์ การทดสอบนี้จะทำการทดสอบซ้ำทั้งหมด 9 ครั้ง การออกแบบการทดลองด้วยวิธีนี้เป็น การจำลองภาวะการใช้งานจริงในทางคลินิกที่ไฮโดรเจลจะสัมผัสและถูกแช่อยู่ในเลือดหรือสารน้ำระหว่างเซลล์ภายในร่างกายโดยตรง ซึ่งผลการทดลองจะสามารถบอกถึงความเป็นพิษของไฮโดรเจลได้ ขั้นตอนการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์โดยอ้อมแสดงในภาพประกอบ 12



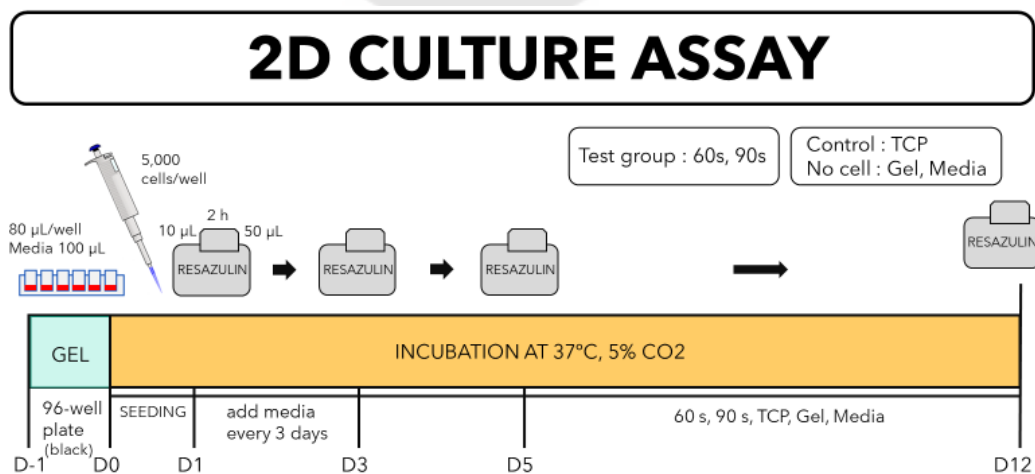
ภาพประกอบ 12 แสดงขั้นตอนการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์โดยอ้อม

## 2.2 การทดสอบการเจริญเติบโตของเซลล์

### 2.2.1 การทดสอบด้วยวิธีการเลี้ยงเซลล์แบบ 2 มิติ (2D culture assay)

ในการศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์เมื่อเลี้ยงร่วมกับไฮโดรเจลนั้นจะทำการศึกษาเปรียบเทียบระหว่างการเลี้ยงร่วมกับไฮโดรเจลที่ได้รับการฉายแสงสีฟ้าเป็นเวลา 60 วินาทีและ 90 วินาที ในการทดสอบโดยการนำเซลล์มาเลี้ยงบนพื้นผิวเซลล์ในลักษณะ 2 มิตินั้นเริ่มจากการเตรียมสารละลายเมทาคริลิตไฮยาโลโรนิกแอซิดที่ผสมกับแอลเอพีตามสัดส่วนที่กล่าวข้างต้น จากนั้นนำมาใส่ลงในจานเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุมสีดำหลุมละ 80 ไมโครลิตร ที่ใช้เป็น

งานเลี้ยงเซลล์สีดำเพื่อลดการรบกวนของแสงสีฟ้าขณะทำการฉายแสงไม่ให้ไปมีผลกับการก่อตัวเป็นเจลของสารละลายไฮโดรเจลในหลุมอื่นๆ ทำการฉายแสงสีฟ้าเพื่อให้สารละลายไฮโดรเจลเกิดการก่อตัวเป็นเจลโดยแบ่งออกเป็นกลุ่มที่ได้รับการฉายแสงสีฟ้า 60 วินาทีและกลุ่มที่ได้รับการฉายแสงสีฟ้า 90 วินาที ทำการเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดดีเอ็มอีเอ็มสมบูรณ์ลงในจานเลี้ยงเซลล์หลุมละ 100 ไมโครลิตรแล้วนำไปไว้ในตู้เลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการใส่ไฟโบรบลาสต์แอล 929 ลงบนพื้นผิวของไฮโดรเจลจำนวน 5,000 เซลล์ต่อหลุม แล้วนำไปบ่มในตู้เลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% แล้วจึงทำการวัดความมีชีวิตของเซลล์ด้วยวิธีวิเคราะห์หาซูรินในวันที่ 1, 3, 5 และ 12 ของการทดลอง โดยเตรียมสารรีซาลินตามคู่มือของผู้ผลิต จากนั้นเติมลงในกลุ่มทดลองในอัตราส่วน 1 ต่อ 10 เขย่างานเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นนำเข้าบ่มต่อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เซลล์ที่มีชีวิตจะเปลี่ยนรีซาลินเป็นรีซารูฟินซึ่งเป็นสารที่มีฟลูออเรสเซนส์ บันทึกผลโดยวัดปริมาณการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540/590 นาโนเมตร โดยใช้เครื่องอ่านค่าไมโครเพลต (Asys UVM340 Microplate reader) กลุ่มควบคุมในการทดลองนี้คือพื้นผิวของงานเลี้ยงเซลล์ กลุ่มควบคุมที่ไม่มีเซลล์คือไฮโดรเจลและอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดดีเอ็มอีเอ็มสมบูรณ์ ในการทดลองนี้จะทำการเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดดีเอ็มอีเอ็มสมบูรณ์ปริมาตร 50 ไมโครลิตรทุกๆ 3 วัน และทำการทดสอบซ้ำทั้งหมด 9 ครั้ง การออกแบบการทดลองด้วยวิธีนี้เป็นการดูการเจริญเติบโตของเซลล์บนพื้นผิวไฮโดรเจลและเป็นการดูถึงความสัมพันธ์ของไฮโดรเจลต่อเซลล์โดยตรงอีกด้วย ขั้นตอนการทดสอบด้วยวิธีการเลี้ยงเซลล์แบบ 2 มิติแสดงในภาพประกอบ 13



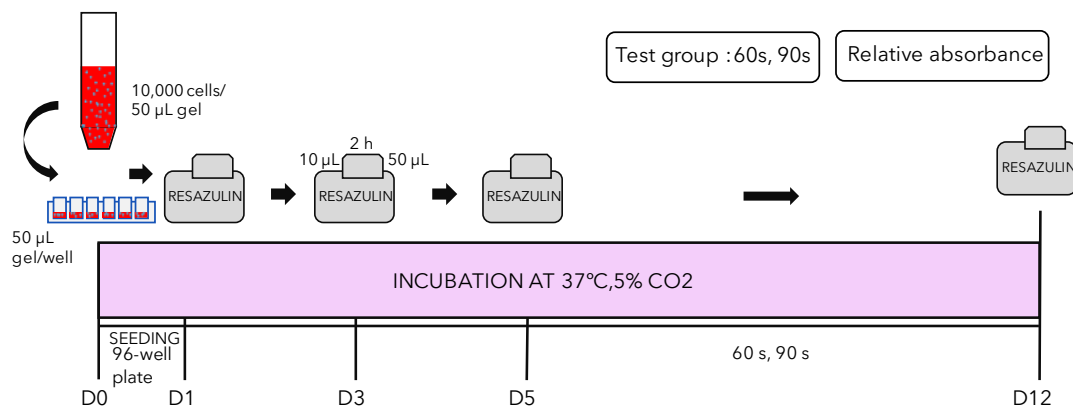
ภาพประกอบ 13 แสดงขั้นตอนการทดสอบด้วยวิธีการเลี้ยงเซลล์แบบ 2 มิติ

## 2.2.2 การทดสอบด้วยวิธีการห่อหุ้มเซลล์ด้วยไฮโดรเจล (Encapsulation assay)

การทดสอบนี้จะเป็นการดูการเจริญเติบโตของเซลล์เมื่อนำมาห่อหุ้มด้วยไฮโดรเจลในลักษณะ 3 มิติ (Encapsulation) เพื่อให้เซลล์อยู่ในสภาวะใกล้เคียงกับสิ่งแวดล้อมภายในร่างกาย (in vivo) ซึ่งเซลล์จะถูกล้อมรอบไปด้วยสารเคลือบเซลล์ (Extracellular matrix) และผลการทดลองที่ได้จะไม่มีผลจากขั้วของเซลล์มาเกี่ยวข้อง (Polarity)

การเลี้ยงเซลล์ด้วยวิธีการห่อหุ้มเซลล์ด้วยไฮโดรเจล (encapsulation) ทำได้โดยการเตรียมสารละลายเมทาคริลิตไฮยาโลโรนิกแอซิดที่ผสมแอลกอฮอล์ตามอัตราส่วนที่ได้กล่าวมาแล้ว จากนั้นนำไฟโบรบลาสต์แอล 929 มาผสมกับสารละลายไฮโดรเจลให้เป็นเนื้อเดียวกันแล้วนำไปใส่ในจานเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุมสีดำ โดยกำหนดให้ในแต่ละหลุมมีสารละลายไฮโดรเจลปริมาตร 50 ไมโครลิตรและมีเซลล์อยู่ 10,000 เซลล์ จากนั้นจึงทำการฉายแสงสีฟ้าโดยแบ่งเป็นกลุ่มที่ได้รับการฉายแสงสีฟ้าเป็นเวลา 60 วินาทีและ 90 วินาที สารละลายไฮโดรเจลจะเกิดการก่อตัวเป็นเจลโดยห่อหุ้มเซลล์อยู่ข้างใน จากนั้นให้เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดดีเอ็มอีเอ็มสมบูรณ์ลงไป หลุมละ 100 ไมโครลิตร นำเข้าบ่มในตู้เลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% แล้วทำการวัดค่าฟลูออเรสเซนส์ด้วยวิธีวิเคราะห์หาฟลูออโรสซินในวันที่ 1, 3, 5 และ 12 ของการทดสอบ ในการทดสอบนี้จะใช้กลุ่มควบคุมภายในกล่าวคือจะทำการเปรียบเทียบค่าฟลูออเรสเซนส์ที่วัดได้ในแต่ละวันกับค่าฟลูออเรสเซนส์ที่วัดได้ในวันที่ 1 ของกลุ่มทดสอบที่ได้รับการฉายแสงสีฟ้า 60 วินาที ในการทดสอบนี้จะทำการเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดดีเอ็มอีเอ็มสมบูรณ์ปริมาตร 50 ไมโครลิตรทุก 3 วัน การทดลองนี้จะทำซ้ำทั้งหมด 9 ครั้ง ขั้นตอนการทดสอบด้วยวิธีการห่อหุ้มเซลล์ด้วยไฮโดรเจลแสดงในภาพประกอบ 14

# ENCAPSULATION ASSAY



Edmondson, 2014, Areevijit, 2019

ภาพประกอบ 14 แสดงขั้นตอนการทดสอบด้วยวิธีการห่อหุ้มเซลล์ด้วยไฮโดรเจล

## 2.3 การตรวจดูลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์

ในงานวิจัยครั้งนี้จะทำการตรวจดูลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ที่ผ่านการเลี้ยงร่วมกับไฮโดรเจลทั้งในลักษณะ 2 มิติและ 3 มิติเป็นเวลา 12 วัน ทำโดยนำอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจากจานเลี้ยงเซลล์ แล้วทำการล้างอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ตกค้างด้วยฟิโซสปริมาตร 1 มิลลิลิตร หลุมละ 2 ครั้ง จากนั้นทำการตรึงด้วย 2.5% กลูตาโรลดีไฮด์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นทำการดูดออกแล้วแช่ในฟิโซส ปริมาตร 1 มิลลิลิตรเป็นเวลา 5 นาทีหลุมละ 2 ครั้ง จากนั้นจะทำการดึงน้ำออกด้วยเอธานอลที่ความเข้มข้น 25%, 50% และ 75% อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ปริมาตร 500 ไมโครลิตรต่อหลุมเป็นเวลา 5 นาทีตามลำดับ จากนั้นจึงใช้เติม 100% เอธานอล อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ปริมาตร 500 ไมโครลิตรต่อหลุมเป็นเวลา 5 นาทีอีกหลุมละ 3 ครั้ง แล้วจึงทำให้แห้งขั้นสุดท้ายด้วยเฮกซะมีทิลดีเอซ (Hexamethyldisilazane; HMDS) ปริมาตร 300 ไมโครลิตรต่อหลุม แช่ไว้เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นจึงดูดเฮกซะมีทิลดีเอซออก แล้วทิ้งไว้ให้แห้งในตู้ปลอดเชื้อเป็นเวลา 1 วัน นำชิ้นตัวอย่างที่แห้งแล้วส่งตรวจดูรูปร่างเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope; SEM) ที่คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒประสานมิตร เพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานของไฟโบรบลาสต์แอล 929

### การเก็บรวบรวมข้อมูล

1. ตรวจวัดค่าฟลูออเรสเซนส์ด้วยเครื่องอ่านค่าไมโครเพลตในการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์โดยอ้อมด้วยวิธีวิเคราะห์เอ็มทีทีและการทดสอบด้วยวิธีการเลี้ยงเซลล์แบบ 2 มิติและการทดสอบด้วยวิธีการห่อหุ้มเซลล์ด้วยไฮโดรเจลด้วยวิธีวิเคราะห์ซาซูริน
2. การตรวจดูรูปร่างของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

### สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

ในการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์โดยอ้อม การทดสอบด้วยวิธีการเลี้ยงเซลล์แบบ 2 มิติและการทดสอบด้วยวิธีการห่อหุ้มเซลล์ด้วยไฮโดรเจลจากนำค่าฟลูออเรสเซนส์ที่วัดได้มาทำการทดสอบการกระจายตัวแบบปกติของข้อมูลด้วยโปรแกรม GraphPad Prism 5 หากข้อมูลมีการกระจายตัวที่ปกติจะทำการทดสอบด้วยวิธี One-way ANOVA ร่วมกับ Tukey's multiple comparisons test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% หากข้อมูลที่ได้ไม่มีการกระจายตัวที่ปกติจะใช้วิธีการทดสอบด้วย Kruskal-Wallis test ร่วมกับ Dunn's multiple comparisons test ในการวิเคราะห์

## บทที่ 4

### ผลการวิจัย

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาความเข้ากันได้ทางชีวภาพระหว่างไฟโบรบลาสต์แอล 929 กับไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกที่มีการพอลิเมอไรเซชันโดยแสงสีฟ้า ซึ่งผู้วิจัยได้ดำเนินการวิจัยตามขั้นตอนที่ได้อธิบายไว้ข้างต้นเพื่อให้ได้ผลวิจัยดังต่อไปนี้

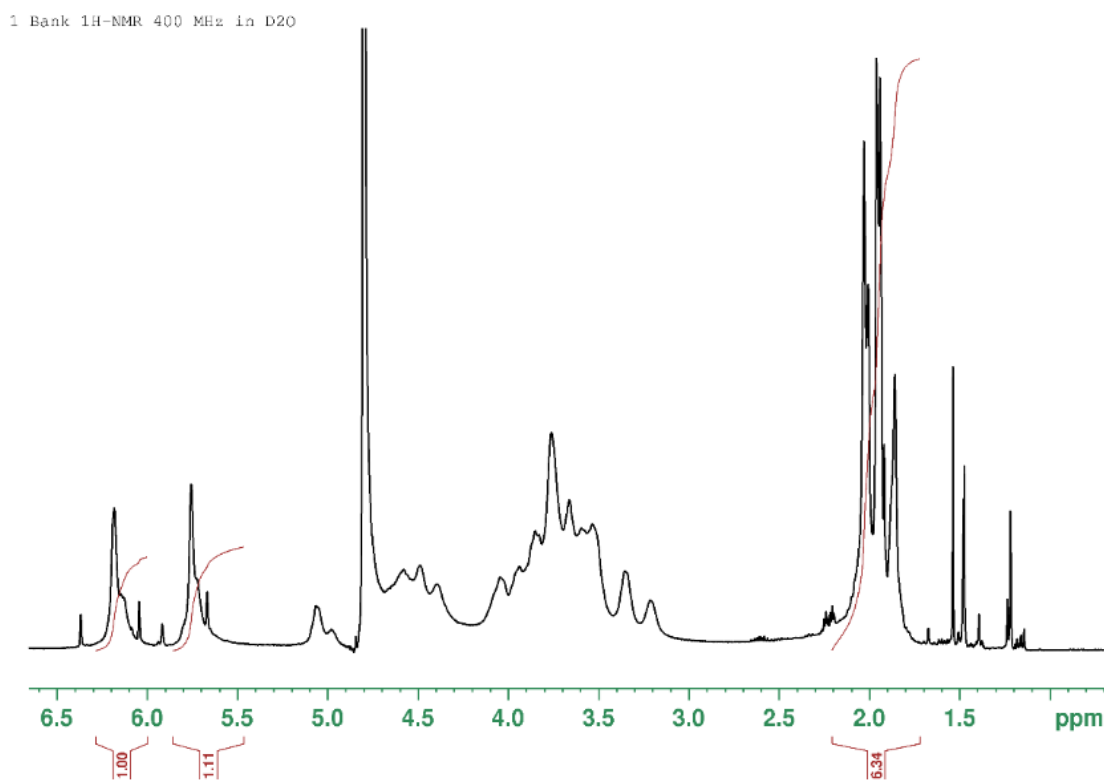
1. ผลการสังเคราะห์เมทาคริเลตไฮยาลูโรนิกแอสิด
2. ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์โดยอ้อม (Indirect cytotoxicity assay)
3. ผลการทดสอบด้วยวิธีการเลี้ยงเซลล์แบบ 2 มิติ (2D culture assay)
4. ผลการทดสอบด้วยวิธีการห่อหุ้มเซลล์ด้วยไฮโดรเจล (Encapsulation assay)
5. ผลการตรวจดูลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์

เมื่อทำการเก็บรวบรวมข้อมูลในการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์โดยอ้อม การทดสอบด้วยวิธีการเลี้ยงเซลล์แบบ 2 มิติและการทดสอบด้วยวิธีการห่อหุ้มเซลล์ด้วยไฮโดรเจลครบถ้วนได้นำข้อมูลในแต่ละการทดสอบไปทำการทดสอบการกระจายตัวแบบปกติของข้อมูลด้วยโปรแกรม GraphPad Prism 5 พบว่าข้อมูลที่รวบรวมได้จากการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์โดยอ้อมและการทดสอบด้วยวิธีการห่อหุ้มเซลล์ด้วยไฮโดรเจลไม่ผ่านการทดสอบการกระจายตัวแบบปกติของข้อมูลจึงได้วิเคราะห์ข้อมูลด้วยสถิติ Kruskal-Wallis test ร่วมกับ Dunn's multiple comparisons test ในการวิเคราะห์ข้อมูลภายในกลุ่มทดลองและใช้สถิติ Mann Whitney test ในการวิเคราะห์ข้อมูลระหว่างกลุ่มทดลองดังแสดงในภาพประกอบ 16 และภาพประกอบ 18 ในส่วนของข้อมูลจากการทดสอบด้วยวิธีการเลี้ยงเซลล์แบบ 2 มิติพบว่าการกระจายตัวของข้อมูลแบบปกติเมื่อทำการทดสอบด้วย Shapiro-Wilk test ( $\alpha=0.05$ ) จึงทำการวิเคราะห์ข้อมูลด้วยสถิติ One-way ANOVA ร่วมกับ Tukey's multiple comparisons test ดังแสดงในภาพประกอบ 17

### ผลการสังเคราะห์เมทาคริเลตไฮยาลูโรนิกแอสิด

ในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยได้ทำการสังเคราะห์เมทาคริเลตไฮยาลูโรนิกแอสิดเป็นจำนวน 4 ครั้ง โดยเมื่อทำการทดสอบหาปริมาณการเกิดการปรับปรุงโครงสร้าง (degree of modification) ด้วยวิธีโปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโคปีพบว่าเมทาคริเลตไฮยาลูโรนิกแอสิดที่สังเคราะห์ได้ทั้ง 4 ครั้งมีค่าปริมาณการเกิดการปรับปรุงโครงสร้างร้อยละ 100 ซึ่งเป็นไปตาม

เกณฑ์ที่กำหนดไว้ว่าเมทาคริลเลตไฮยาลูโรนิกแอซิดที่ใช้ในการศึกษาต้องมีค่าปริมาณการเกิดการปรับปรุงโครงสร้างมากกว่าร้อยละ 60 ตัวอย่างกราฟที่ได้จากการทดสอบโปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโคปีเป็นดังภาพประกอบ 15



ภาพประกอบ 15 ตัวอย่างผลการทดสอบหาปริมาณการเกิดการปรับปรุงโครงสร้างด้วยวิธีโปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโคปีในการสังเคราะห์ครั้งที่ 1

#### ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์โดยอ้อม (Indirect cytotoxicity assay)

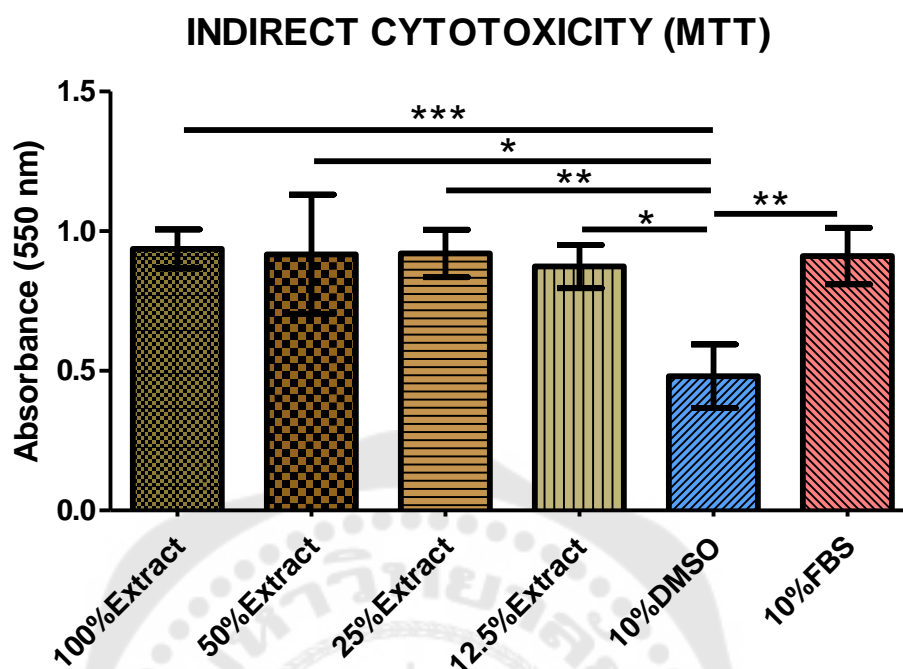
จากการนำอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ได้สัมผัสกับไฮโดรเจลเป็นเวลา 1 วันมาทดสอบกับไฟโบบลาสต์แอล 929 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วทำการวิเคราะห์ความมีชีวิตของเซลล์ด้วยวิธีวิเคราะห์เอ็มทีทีพบว่า ในกลุ่มที่ได้รับอาหารเลี้ยงเซลล์ที่สัมผัสกับไฮโดรเจลความเข้มข้น 100% วัดค่าการดูดกลืนแสงได้  $0.9371 \pm 0.0698$  กลุ่มที่ได้รับอาหารเลี้ยงเซลล์ที่สัมผัสกับไฮโดรเจลความเข้มข้น 50% วัดค่าการดูดกลืนแสงได้  $0.9173 \pm 0.2137$  กลุ่มที่ได้รับอาหารเลี้ยงเซลล์ที่สัมผัสกับไฮโดรเจลความเข้มข้น 25% วัดค่าการดูดกลืนแสงได้  $0.9208 \pm 0.0849$  กลุ่มที่ได้รับอาหารเลี้ยงเซลล์ที่สัมผัสกับไฮโดรเจลความเข้มข้น 12.5% วัดค่าการดูดกลืนแสงได้  $0.8736 \pm 0.0776$  ในกลุ่มควบคุมบวกรที่ได้รับอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี

10% Dimethyl Sulfoxide วัดค่าการดูดกลืนแสงได้  $0.4809 \pm 0.1143$  และในกลุ่มควบคุมลบที่ได้รับอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี 10% Fetal Bovine Serum วัดค่าการดูดกลืนแสงได้  $0.9111 \pm 0.1015$  ดังแสดงในตารางที่ 2 แสดงให้เห็นว่าในกลุ่มทดสอบที่ได้รับอาหารเลี้ยงเซลล์ที่สัมผัสกับไฮโดรเจลในทุกความเข้มข้นสามารถพบความมีชีวิตของเซลล์แอล 929 ได้และค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้มีค่าใกล้เคียงกันและไม่แตกต่างจากกลุ่มที่ได้รับอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี 10% Fetal Bovine Serum อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่กลุ่มที่ได้รับอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี 10% Dimethyl Sulfoxide มีค่าน้อยกว่ากลุ่มอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงให้เห็นว่าไฮโดรเจลไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์เนื่องจากเซลล์ยังสามารถคงเมแทบอลิซึมไว้ได้ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่สัมผัสกับไฮโดรเจลในทุกความเข้มข้นและมีค่าไม่ต่างกับกลุ่มที่เลี้ยงใน 10% Fetal bovine serum แผนภูมิแท่งแสดงผลการทดสอบ Indirect Cytotoxicity Assay เป็นดังภาพประกอบ 16

ตาราง 2 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้จากวิธีวิเคราะห์เอ็มทีทีในการทดสอบ Indirect Cytotoxicity Assay, n=9

อาหารเลี้ยงเซลล์ที่นำมาทดสอบ	ค่าการดูดกลืนแสง, mean $\pm$ SD
อาหารเลี้ยงเซลล์ที่สัมผัสกับไฮโดรเจลความเข้มข้น 100%	$0.9371 \pm 0.0698$
อาหารเลี้ยงเซลล์ที่สัมผัสกับไฮโดรเจลความเข้มข้น 50%	$0.9173 \pm 0.2137$
อาหารเลี้ยงเซลล์ที่สัมผัสกับไฮโดรเจลความเข้มข้น 25%	$0.9208 \pm 0.0849$
อาหารเลี้ยงเซลล์ที่สัมผัสกับไฮโดรเจลความเข้มข้น 12.5%	$0.8736 \pm 0.0776$
อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี 10% Dimethyl Sulfoxide	$0.4809 \pm 0.1143$
อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี 10% Fetal Bovine Serum	$0.9111 \pm 0.1015$



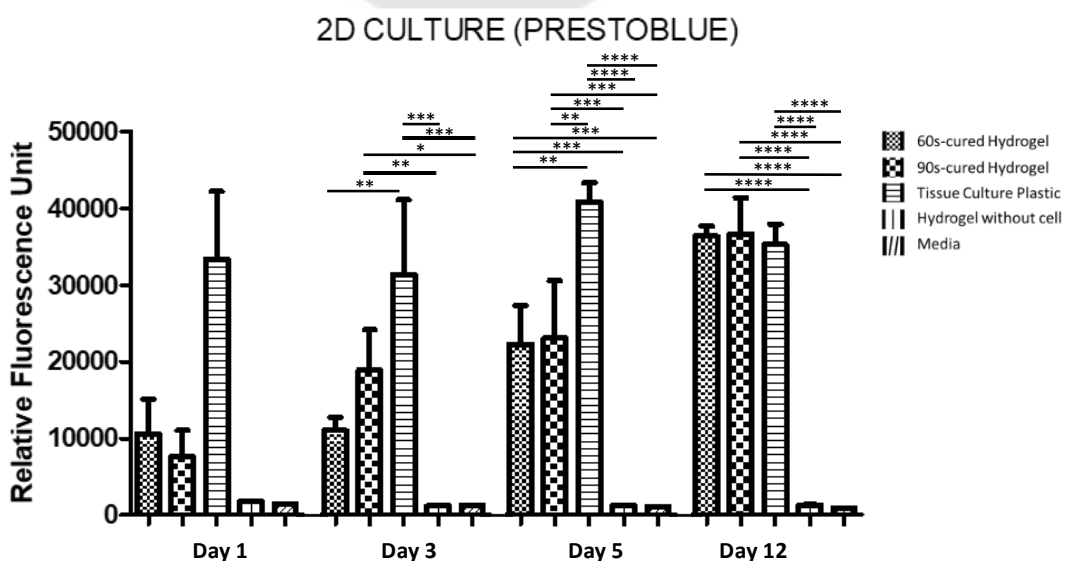


ภาพประกอบ 16 แผนภูมิแท่งแสดงผลการทดสอบ Indirect Cytotoxicity Assay ค่าที่แสดงคือ mean  $\pm$  SD, n=9, โดยใช้สถิติ Kruskal-Wallis test ร่วมกับ Dunn's multiple comparisons test,  $p < 0.05$  โดย \* หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $p < 0.05$ , \*\* หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $p < 0.01$ , \*\*\* หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $p < 0.001$ , \*\*\*\* หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $p < 0.0001$

#### ผลการทดสอบด้วยวิธีการเลี้ยงเซลล์แบบ 2 มิติ (2D culture assay)

การทดสอบการเลี้ยงไฟโบรบลาสต์ 929 บนพื้นผิวของไฮโดรเจลในลักษณะ 2 มิติแล้วนำมาทดสอบความมีชีวิตด้วยวิธีวิเคราะห์ริซาซูรินในวันที่ 1, 3, 5 และ 12 โดยเปรียบเทียบกลุ่มไฮโดรเจลที่ได้รับการฉายแสงเป็นระยะเวลา 60 วินาทีและ 90 วินาที โดยมีกลุ่มควบคุมคือพื้นผิวจานเลี้ยงเซลล์และกลุ่มควบคุมที่ไม่มีเซลล์คือไฮโดรเจลและอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดดีเอ็มอีเอ็ม พบว่าในกลุ่มที่เลี้ยงบนพื้นผิวไฮโดรเจลที่ได้รับการฉายแสงสีฟ้าเป็นเวลา 60 วินาที วัดค่าฟลูออเรสเซนส์ในวันที่ 1, 3, 5 และ 12 ได้  $10,544.33 \pm 4,544.26$ ,  $13,210.00 \pm 2,090.41$ ,  $26,749.33 \pm 6,002.81$  และ  $43,603.67 \pm 1,594.29$  ตามลำดับ ในกลุ่มที่เลี้ยงบนผิวไฮโดรเจลที่ได้รับการฉายแสงสีฟ้าเป็นเวลา 90 วินาที วัดค่าฟลูออเรสเซนส์ในวันที่ 1, 3, 5 และ 12 ได้  $7,607.33 \pm 3,440.67$ ,  $22,667.66 \pm 6,270.75$ ,  $27,623.33 \pm 9,056.13$  และ  $44,008.67 \pm 5,609.76$

ตามลำดับ กลุ่มที่เลี้ยงบน พื้นผิวจานเลี้ยงเซลล์ วัดค่าฟลูออเรสเซนส์ในวันที่ 1, 3, 5 และ 12 ได้ 33,339.00±8,822.09, 37,684.33±11,611.77, 48,941.67±3,004.50 และ 42,285.67±3,259.84 ตามลำดับ ในกลุ่มไฮโดรเจลที่ไม่มีเซลล์ วัดค่าฟลูออเรสเซนส์ในวันที่ 1, 3, 5 และ 12 ได้ 1,811.00±1.41, 1,426±9.90, 1,466±14.14 และ 1,591±71.42 ตามลำดับ ในกลุ่มอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีเซลล์ วัดค่าฟลูออเรสเซนส์ในวันที่ 1, 3, 5 และ 12 ได้ 1,492±0.00, 1,503±0.00, 1,287±0.00 และ 1,122±0.00 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 3 แสดงให้เห็นว่าเซลล์สามารถเจริญเติบโตบนพื้นผิวของไฮโดรเจลได้สังเกตได้จากการที่ค่าฟลูออเรสเซนส์ค่อยๆเพิ่มขึ้นในแต่ละวันของการทดสอบทั้งในกลุ่มไฮโดรเจลที่ได้รับการฉายแสงสีฟ้าเป็นเวลา 60 วินาทีและ 90 วินาที โดยพบว่าทั้ง 2 กลุ่มไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับการเลี้ยงบนพื้นผิวจานเลี้ยงเซลล์พบว่าในวันที่ 3 ของการทดสอบกลุ่มที่เลี้ยงบนพื้นผิวไฮโดรเจลที่ได้รับการฉายแสง 60 วินาทีมีค่าฟลูออเรสเซนส์น้อยกว่ากลุ่มที่เลี้ยงบนพื้นผิวจานเลี้ยงเซลล์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติและในวันที่ 5 ของการทดสอบ กลุ่มเซลล์ที่เลี้ยงบนพื้นผิวไฮโดรเจลทั้ง 2 กลุ่มเจริญเติบโตได้น้อยกว่ากลุ่มที่เลี้ยงบนพื้นผิวจานเลี้ยงเซลล์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่เมื่อติดตามผลการทดลองไปจนถึงวันที่ 12 พบว่าทั้ง 3 กลุ่มกลับมามีค่าฟลูออเรสเซนส์ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงให้เห็นว่าเมื่อนำเซลล์มาเลี้ยงบนพื้นผิวไฮโดรเจลในลักษณะ 2 มิติ พบว่าเซลล์สามารถเจริญเติบโตได้แต่จะช้ากว่ากลุ่มที่เลี้ยงบนพื้นผิวจานเลี้ยงเซลล์ในช่วง 3-5 วันแรกของการทดสอบ แต่เซลล์ที่เลี้ยงบนพื้นผิวไฮโดรเจลก็มีศักยภาพที่จะเจริญเติบโตมากขึ้นจนใกล้เคียงกับกลุ่มที่เลี้ยงบนพื้นผิวจานเลี้ยงเซลล์ได้ในช่วงหลังของการทดสอบ กราฟแสดงผลการทดสอบเป็นดังภาพประกอบ 17



ภาพประกอบ 17 กราฟแสดงผลการทดสอบ 2D Culture Assay, mean  $\pm$  SD, n=9, โดยใช้สถิติ One-way ANOVA ร่วมกับ Tukey's multiple comparisons test,  $p < 0.05$  โดย \* หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $p < 0.05$ , \*\* หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $p < 0.01$ , \*\*\* หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $p < 0.001$ , \*\*\*\* หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $p < 0.0001$

ตาราง 3 ค่าฟลูออเรสเซนส์จากการทดสอบด้วยวิธีวิเคราะห์ฟลูออเรสเซนส์ในการทดสอบด้วยวิธีการเลี้ยงเซลล์แบบ 2 มิติ, n=9

กลุ่มทดสอบ	ค่าฟลูออเรสเซนส์, mean $\pm$ SD			
	วันที่ 1	วันที่ 3	วันที่ 5	วันที่ 12
กลุ่มที่เลี้ยงบนผิวไฮโดรเจลที่ได้รับการฉายแสงสีฟ้าเป็นเวลา 60 วินาที	10,544.33 $\pm$ 4,544.26	13,210.00 $\pm$ 2,090.41	26,749.33 $\pm$ 6,002.81	43,603.67 $\pm$ 1,594.29
กลุ่มที่เลี้ยงบนผิวไฮโดรเจลที่ได้รับการฉายแสงสีฟ้าเป็นเวลา 90 วินาที	7,607.33 $\pm$ 3,440.67	22,667.66 $\pm$ 6,270.75	27,623.33 $\pm$ 9,056.13	44,008.67 $\pm$ 5,609.76
กลุ่มที่เลี้ยงบน Tissue Culture Plastic	33,339.00 $\pm$ 8,822.09	37,684.33 $\pm$ 11,611.77	48,941.67 $\pm$ 3,004.50	42,285.67 $\pm$ 3,259.84
กลุ่มไฮโดรเจลที่ไม่มีเซลล์แอล 929	1,811.00 $\pm$ 1.41	1,426 $\pm$ 9.90	1,466 $\pm$ 14.14	1,591 $\pm$ 71.42
กลุ่มอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีเซลล์แอล 929	1,492 $\pm$ 1.73	1,503 $\pm$ 2.87	1,287 $\pm$ 3.46	1,122 $\pm$ 2.30

### ผลการทดสอบด้วยวิธีการห่อหุ้มเซลล์ด้วยไฮโดรเจล (Encapsulation assay)

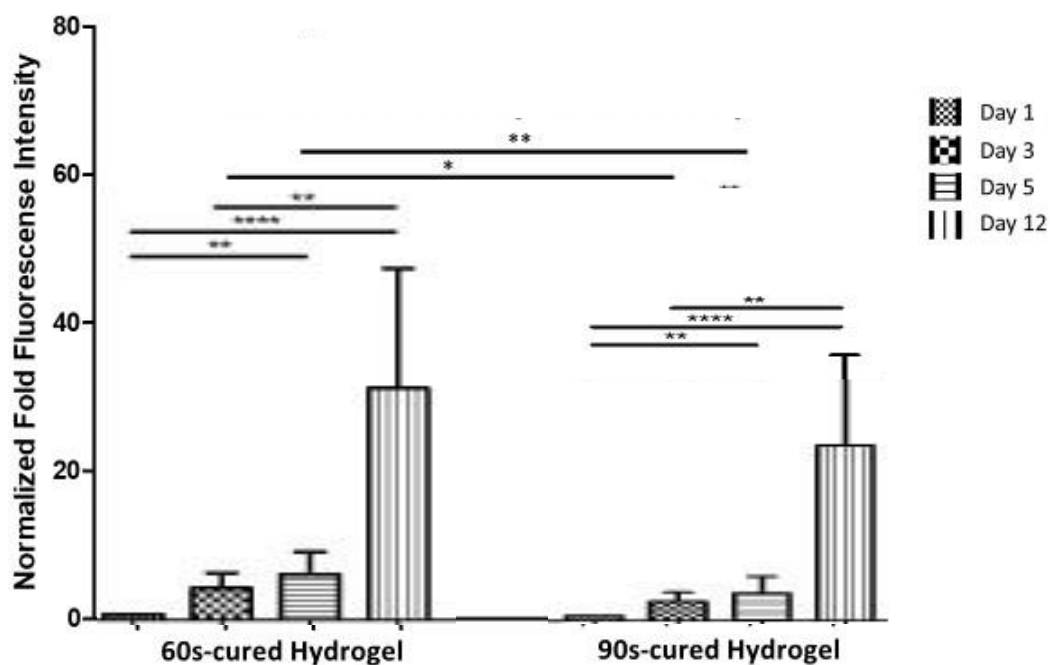
การทดสอบด้วยการเลี้ยงไฟโบรบลาสต์แอล 929 ในลักษณะสามมิติห่อหุ้มรอบเซลล์ด้วยไฮโดรเจลจากนั้นทำการทดสอบความมีชีวิตของเซลล์ในวันที่ 1, 3, 5 และ 12 แล้วแปลผลโดยใช้ค่าฟลูออเรสเซนส์สัมพันธ์ซึ่งเปรียบเทียบค่าฟลูออเรสเซนส์ที่วัดได้ในแต่ละวันกับค่าที่วัดได้ในวันแรกของกลุ่มไฮโดรเจลที่ได้รับการฉายแสงสีฟ้าเป็นเวลา 60 วินาที ผลที่ได้พบว่าในกลุ่มที่เลี้ยงในไฮโดรเจลที่ได้รับการฉายแสงสีฟ้าเป็นเวลา 60 วินาที มีค่าฟลูออเรสเซนส์สัมพันธ์ใน

วันที่ 1, 3, 5 และ 12 มีค่า  $1.00 \pm 0.49$ ,  $5.54 \pm 2.36$ ,  $7.75 \pm 2.83$  และ  $35.92 \pm 6.43$  เท่า ตามลำดับ กลุ่มที่เลี้ยงในไฮโดรเจลที่ได้รับการฉายแสงสีฟ้าเป็นเวลา 90 วินาที พบว่าค่าฟลูออเรสเซนส์สัมพันธ์ในวันที่ 1, 3, 5 และ 12 มีค่า  $0.64 \pm 0.06$ ,  $2.27 \pm 0.43$ ,  $3.21 \pm 0.97$  และ  $20.66 \pm 3.61$  เท่า ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4 แสดงให้เห็นว่าในสภาวะที่เซลล์ถูกห่อหุ้มด้วยไฮโดรเจลในลักษณะสามมิติเซลล์ยังสามารถเจริญเติบโตได้ภายในไฮโดรเจลสังเกตได้จากค่าฟลูออเรสเซนส์ที่เพิ่มมากขึ้น โดยเซลล์จะเจริญเติบโตได้ช้าในช่วง 3-5 วันแรกและเจริญเติบโตได้มากขึ้นในช่วงหลัง ในกลุ่มไฮโดรเจลที่ได้รับการฉายแสงสีฟ้าเป็นเวลา 60 วินาทีพบการเจริญเติบโตของเซลล์มากกว่ากลุ่มที่ได้รับการฉายแสงสีฟ้าเป็นเวลา 90 วินาทีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในวันที่ 3 และ 5 ของการทดลอง แผนภูมิแท่งแสดงผลการทดสอบด้วยวิธีการห่อหุ้มเซลล์ด้วยไฮโดรเจลเป็นดังภาพประกอบ 18

ตาราง 4 ค่าฟลูออเรสเซนส์สัมพันธ์จากการทดสอบด้วยวิธีวิเคราะห์หาปริมาณในการทดสอบด้วยวิธีการห่อหุ้มเซลล์ด้วยไฮโดรเจล,  $n=9$

ชนิดของไฮโดรเจล ที่ห่อหุ้มเซลล์	ค่าฟลูออเรสเซนส์สัมพันธ์, mean $\pm$ SD			
	Day 1	Day 3	Day 5	Day 12
ไฮโดรเจลที่ได้รับการ ฉายแสง 60 วินาที	$1.00 \pm 0.49$	$5.54 \pm 2.36$	$7.75 \pm 2.83$	$35.92 \pm 6.43$
ไฮโดรเจลที่ได้รับการ ฉายแสง 90 วินาที	$0.64 \pm 0.06$	$2.27 \pm 0.43$	$3.21 \pm 0.97$	$20.66 \pm 3.61$

## ENCAPSULATION (PRESTOBLUE)

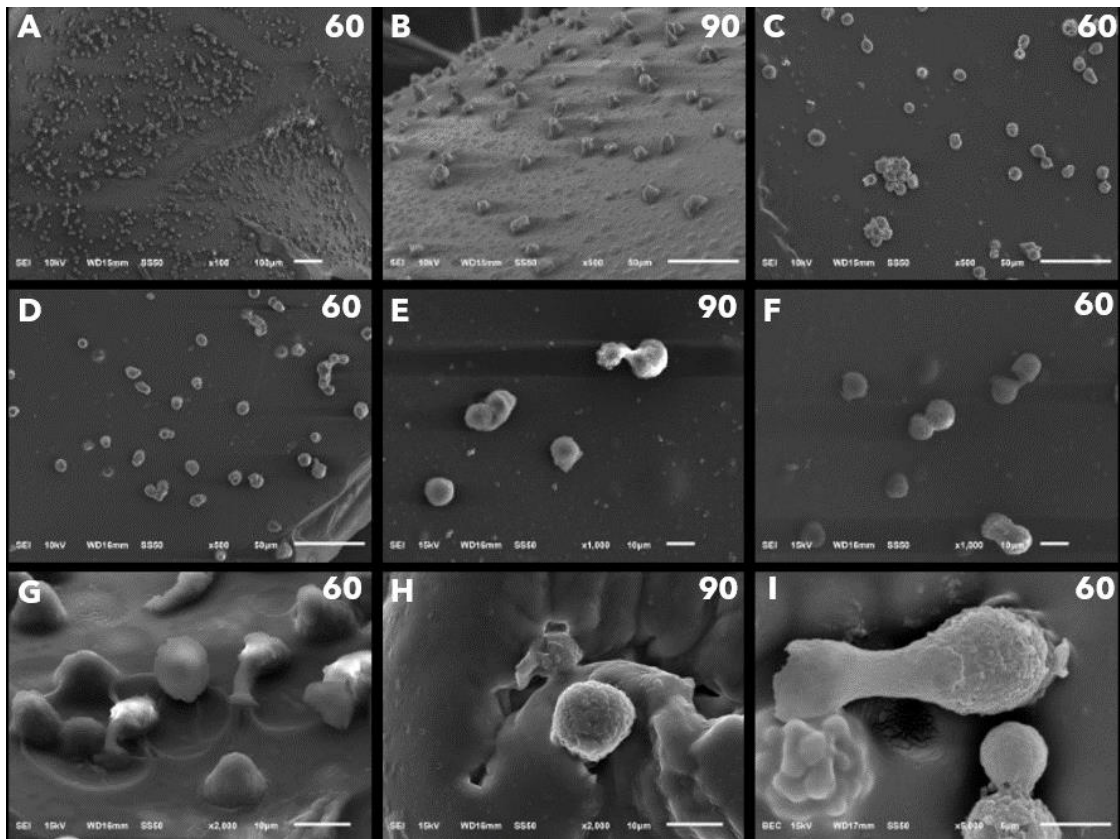


ภาพประกอบ 18 แผนภูมิแท่งแสดงผลการทดสอบ Encapsulation Culture Assay, mean  $\pm$  SD, n=9, โดยใช้สถิติ Kruskal-Wallis test ร่วมกับ Dunn's multiple comparisons test ในการวิเคราะห์ภายในกลุ่มทดลองและใช้สถิติ Mann Whitney test ในการวิเคราะห์ระหว่างกลุ่มทดลอง,  $p < 0.05$  โดย \* หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $p < 0.05$ , \*\* หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $p < 0.01$ , \*\*\* หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $p < 0.001$ , \*\*\*\* หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $p < 0.0001$

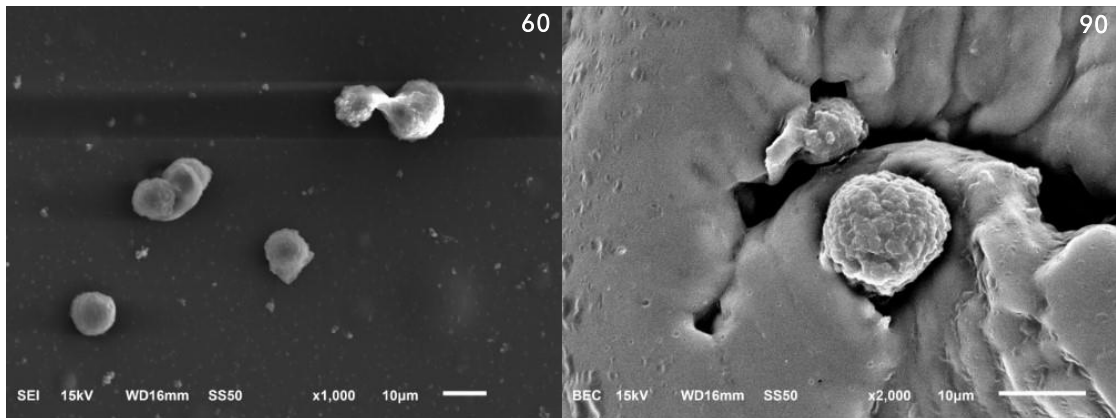
### ผลการตรวจคุณลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์

ในการดูลักษณะทางสัณฐานวิทยาครั้งนี้ได้มีการนำเซลล์ที่เลี้ยงด้วยวิธีการเลี้ยงเซลล์แบบ 2 มิติและการเลี้ยงด้วยวิธีการห่อหุ้มเซลล์ด้วยไฮโดรเจลเป็นเวลา 12 วัน มาทำการตรวจดูลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ผลที่ได้เป็นดังภาพประกอบ 19 ถึงภาพประกอบ 21 ในกลุ่มที่เลี้ยงเซลล์ด้วยวิธีการเลี้ยงเซลล์แบบ 2 มิติพบว่าเซลล์มีลักษณะกลมและบางส่วนอยู่ร่วมกันเป็นกลุ่ม ซึ่งสอดคล้องกับการตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ พบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของผิวเซลล์ที่ปกติ ในกลุ่มที่เลี้ยงด้วยวิธีการห่อหุ้มเซลล์ด้วยไฮโดรเจลสามารถเห็นลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ปกติของพื้นผิวเซลล์

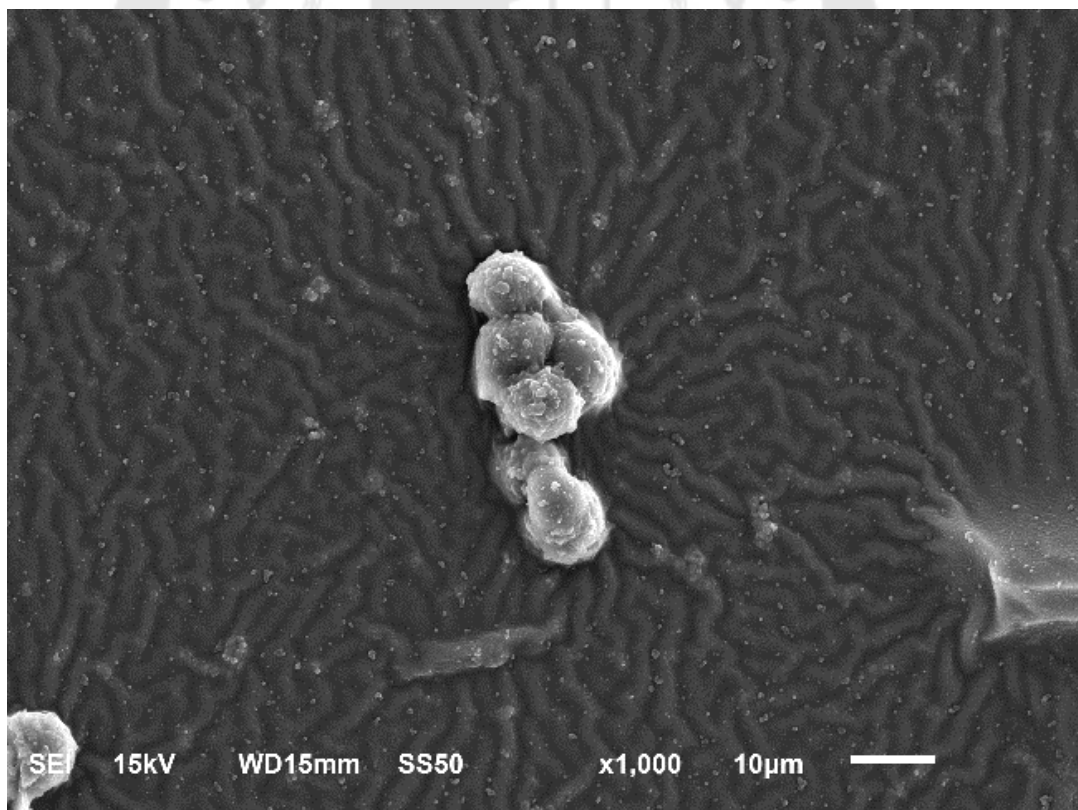
พบว่าบางเซลล์มีการยื่นแขนงของเซลล์คล้ายทรงกระสวยและเห็นลักษณะของเซลล์ที่กำลังเข้าสู่กระบวนการแบ่งเซลล์ซึ่งสอดคล้องกับการทดสอบที่กล่าวมา พบว่าทั้งกลุ่มที่เลี้ยงร่วมกับไฮโดรเจลที่ได้รับการฉายแสงสีฟ้าเป็นเวลา 60 วินาทีและ 90 วินาทีนั้นไม่มีความแตกต่างกันของลักษณะทางสัณฐานวิทยาทั้งในวิธีการเลี้ยงเซลล์แบบ 2 มิติและวิธีการห่อหุ้มเซลล์ด้วยไฮโดรเจล



ภาพประกอบ 19 แสดงตัวอย่างภาพถ่ายไฟโบรบลาสต์ 929 ที่เลี้ยงด้วยวิธีห่อหุ้มเซลล์ด้วยไฮโดรเจลเป็นเวลา 12 วันและนำมาตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด A ภาพถ่ายที่กำลังขยาย 100 เท่า B-D ภาพถ่ายกำลังขยาย 500 เท่า E-F ภาพถ่ายที่กำลังขยาย 1000 เท่า G-H ภาพถ่ายที่กำลังขยาย 2000 เท่า I ภาพถ่ายที่กำลังขยาย 5000 เท่า



ภาพประกอบ 20 แสดงตัวอย่างภาพถ่ายไฟโบรบลาสต์แอล 929 ที่เลี้ยงด้วยวิธีห่อหุ้มเซลล์ด้วยไฮโดรเจลเป็นเวลา 12 วันและนำมาตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ภาพทางซ้ายเป็นภาพของเซลล์ในกลุ่มที่เลี้ยงร่วมกับไฮโดรเจลที่ได้รับการฉายแสงสีฟ้าเป็นเวลา 60 วินาทีที่กำลังขยาย 1000X ภาพทางขวาเป็นภาพของเซลล์ในกลุ่มที่เลี้ยงร่วมกับไฮโดรเจลที่ได้รับการฉายแสงสีฟ้าเป็นเวลา 90 วินาทีที่กำลังขยาย 2000X



ภาพประกอบ 21 แสดงตัวอย่างภาพถ่ายภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดของไฟโบรบลาสต์แอล 929 ที่เลี้ยงด้วยวิธีเลี้ยงแบบ 2 มิติที่กำลังขยาย 1000 เท่า

## บทที่ 5

### สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาความเข้ากันได้ทางชีวภาพของไฟโบรบลาสต์แอล 929 กับไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกที่มีการพอลิเมอไรเซชันโดยแสงสีฟ้าและได้ผลการดำเนินงานแล้ว สามารถสรุปผลการดำเนินงานโดยแบ่งหัวข้อในการสรุปผลได้ดังต่อไปนี้

1. สรุปผลการวิจัย
2. อภิปรายผล
3. ข้อเสนอแนะ

#### สรุปผลการวิจัย

ไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกที่มีการพอลิเมอไรเซชันโดยแสงสีฟ้ามีความเข้ากันได้ทางชีวภาพที่ดีกับไฟโบรบลาสต์แอล 929 เซลล์สามารถมีชีวิตอยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่สัมผัสกับไฮโดรเจลและยังคงเจริญเติบโตได้เมื่อนำมาเลี้ยงร่วมกับไฮโดรเจลทั้งในลักษณะสองมิติและสามมิติ แม้จะเจริญเติบโตช้ากว่ากลุ่มควบคุมในช่วง 3-5 วันแรก แต่ก็สามารถเจริญเติบโตได้มากขึ้นในเวลาต่อมา และพบว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดมีลักษณะของพื้นผิวเซลล์ที่ปกติ พบการยื่นแขนงของเซลล์และพบเซลล์ที่เข้าสู่ขั้นตอนการแบ่งเซลล์อันแสดงให้เห็นถึงการเจริญเติบโตของเซลล์ ความรู้ที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ถือเป็นรากฐานสำคัญในการทำความเข้าใจการตอบสนองของเซลล์ต่อไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกที่มีการพอลิเมอไรเซชันโดยแสงสีฟ้า ซึ่งคาดว่าจะพัฒนาไปเป็นโครงร่างทางชีวภาพที่ดีสำหรับใช้ในการขนส่งเซลล์ ตัวยาหรือปัจจัยทางเคมีสำหรับงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อในทางคลินิกต่อไปในอนาคตอันใกล้

#### อภิปรายผล

ไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกเป็นหนึ่งในวัสดุโครงร่างทางชีวภาพที่ใช้กันแพร่หลายในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อ<sup>(85, 86)</sup> เนื่องมาจากการที่กรดไฮยาลูโรนิกเป็นสารที่สามารถพบได้ทั่วไปในแมทริกซ์ระหว่างเซลล์ มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพกับเซลล์ร่างกายมนุษย์ที่ดี สามารถย่อยสลายได้ตามธรรมชาติและสามารถปรับปรุงโครงสร้างเพื่อให้เกิดเป็นโครงร่างสามมิติได้ด้วยขั้นตอนที่ไม่ยุ่งยาก<sup>(6)</sup> ผู้วิจัยสังเกตเห็นถึงข้อดีของไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกจึงมีความมุ่งหมายที่



จะพัฒนาไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกเป็นวัสดุโครงร่างทางชีวภาพที่ดีเพื่อนำไปใช้งานวิศวกรรมเนื้อเยื่อในทางคลินิกในอนาคต การศึกษาในครั้งนี้ได้นำเอาไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกที่ปรับปรุงโครงสร้างด้วยเมทาคริลเลตแอนไฮไดรด์และทำให้เกิดการครอสลิงค์เป็นโครงร่างสามมิติด้วยแอลเอพีซึ่งถูกกระตุ้นให้เริ่มปฏิกิริยาโดยแสงสีฟ้าตามวิธีการสังเคราะห์ในการศึกษาของ Chaopanitcharoen (2021)<sup>(7)</sup> มาทำการศึกษาความเข้ากันได้ทางชีวภาพกับไฟโบรบลาสต์แอล 929 การสังเคราะห์ไฮโดรเจลด้วยวิธีนี้ทำให้สามารถควบคุมเวลาที่ต้องการให้เกิดการก่อตัวเป็นไฮโดรเจลได้เป็นอย่างดี ทำให้มีเวลาในการทำงานที่มากขึ้นเมื่อเทียบกับการครอสลิงค์ด้วยวิธีอื่น การศึกษาความเข้ากันได้ทางชีวภาพในงานวิจัยนี้จะศึกษาผ่านการทดสอบความเป็นพิษของไฮโดรเจลต่อเซลล์โดยอ้อม การทดสอบการเจริญเติบโตของเซลล์และการตรวจดูลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์เมื่อเลี้ยงร่วมกับไฮโดรเจล โดยในส่วนของ การทดสอบการเจริญเติบโตของเซลล์และการตรวจดูลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์จะทำการเปรียบเทียบการเลี้ยงเซลล์ร่วมกับไฮโดรเจลที่ได้รับการฉายแสงสีฟ้าเป็นเวลา 60 วินาทีกับ 90 วินาทีด้วย ซึ่งเป็นช่วงเวลาที่ทำให้ได้ไฮโดรเจลที่ก่อตัวเป็นเจลสมบูรณ์ มีลักษณะเป็นโครงร่างสามมิติ มีรูพรุนที่มีขนาดใกล้เคียงกับขนาดเซลล์โดยที่ทั้งไฮโดรเจล มีการพองตัวขึ้นเมื่อสัมผัสกับน้ำ และสามารถถูกย่อยสลายได้ด้วยเอนไซม์ไฮยาลูโรนเดส<sup>(7)</sup> สมบัติเหล่านี้เป็นสมบัติของโครงร่างทางชีวภาพที่ดี<sup>(8-10, 68)</sup> ซึ่งคาดว่าจะช่วยให้เซลล์มีชีวิตและเจริญเติบโตได้ดีเมื่อนำมาเลี้ยงร่วมกับไฮโดรเจล

ไฟโบรบลาสต์แอล 929 ที่ใช้ในการทดสอบครั้งนี้เป็นเซลล์ไลน์ไฟโบรบลาสต์ที่ได้จากเนื้อเยื่อไขมันบริเวณใต้ผิวหนังของหนูเพศผู้ สปีชีส์ *Mus musculus* C3H/An มีลักษณะเป็นเซลล์รูปทรงกระสวยหรือทรงหลายเหลี่ยม เป็นเซลล์ที่ยึดเกาะกับพื้นผิว เจริญเติบโตเร็วและเพาะเลี้ยงง่าย ไฟโบรบลาสต์แอล 929 ถูกแนะนำให้เป็นหนึ่งในเซลล์ที่เหมาะสมในการทดสอบเครื่องมือแพทย์ทางห้องปฏิบัติการโดยองค์การมาตรฐานสากลว่าด้วยมาตรฐาน ISO 10993-5 การทดสอบความเป็นพิษทางห้องปฏิบัติการ ไฟโบรบลาสต์แอล 929 ที่ใช้ในการศึกษานี้ได้รับความอนุเคราะห์จากคลังเซลล์ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยได้ทำการละลายเซลล์ในรุ่นที่ 30 และทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดดีเอ็มอีเอ็ม จนพบว่าเซลล์มีรูปร่างและอัตราการเจริญเติบโตที่เสถียรและสมบูรณ์ในรุ่นที่ 33 จึงได้เก็บเกี่ยวเซลล์มาใช้ในการทดสอบในรุ่นที่ 34-36

เมทาคริลเลตไฮยาลูโรนิกแอซิดที่ใช้ในการศึกษานี้ถูกสังเคราะห์ขึ้นทั้งหมด 4 ครั้ง เมื่อนำส่งเพื่อทดสอบโปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโคปีเพื่อคำนวณค่าปริมาณการ

เกิดการปรับปรุงพบว่าเมทาคริเลตไฮยาลูโรนิกแอซิดที่สังเคราะห์ทั้ง 4 ครั้งมีปริมาณการเกิดการปรับปรุงโครงสร้างอยู่ที่ 100% ทุกครั้งซึ่งผลที่ได้แตกต่างจากการศึกษาของ Chaopanitcharoen (2021)<sup>(7)</sup> Areevijit (2021)<sup>(6)</sup> Maturavongsadit (2015)<sup>(68)</sup> และ Trakiattikul (2018)<sup>(5)</sup> ที่ได้ค่าปริมาณการเกิดการปรับปรุงโครงสร้างของเมทาคริเลตไฮยาลูโรนิกแอซิดอยู่ที่ 42-76%, 42.03-66.37%, 40-50% และ 21.8-41.38% ตามลำดับ ค่าปริมาณการเกิดการปรับปรุงโครงสร้างที่แตกต่างกันมาจากการมีความไวในเทคนิคการสังเคราะห์ที่ค่อนข้างสูง (High technique sensitivity) ทั้งในส่วนของช่วงเวลาในการเติมเมทาคริเลตแอนไฮไดรด์ การรักษาอุณหภูมิและค่า pH ให้อยู่ในช่วงที่เหมาะสมตลอดการเกิดปฏิกิริยาในช่วง 10 ชั่วโมงแรก ซึ่งถ้าอุณหภูมิไม่อยู่ในช่วง 0-4 องศาเซลเซียสหรือค่า pH ต่ำกว่า 8 ปฏิกิริยาจะหยุดลง ในขณะที่ถ้าค่า pH เกินกว่า 10 จะเกิดการสลายของโพลีเมอร์ขึ้น จึงทำให้ค่าปริมาณการเกิดการปรับปรุงโครงสร้างของเมทาคริเลตที่สังเคราะห์ได้ในแต่ละการศึกษามีความแตกต่างกัน พบว่าหากมีค่าปริมาณการเกิดการปรับปรุงโครงสร้างที่สูงขึ้น จะเกิดการก่อตัวเป็นเจลที่เร็วกว่าเมื่อใช้โครอสลิงค์เกอร์ทางเคมี<sup>(6)</sup> เนื่องมาจากการมีหมู่ไวนิลในสายโซ่โมเลกุลที่มากกว่านั่นเอง จึงคาดว่าหากเติมแอลเอพีเข้าไปแล้วทำการฉายแสงสีฟ้า เมทาคริเลตไฮยาลูโรนิกแอซิดที่มีปริมาณการเกิดการปรับปรุงโครงสร้างมากกว่าจะเกิดการก่อตัวเป็นเจลที่มีปริมาณการครอสลิงค์ที่มากกว่าเช่นกัน ทั้งนี้เมื่อนำเมทาคริเลตไฮยาลูโรนิกที่สังเคราะห์ขึ้นในการศึกษาครั้งนี้มาผสมกับแอลเอพีแล้วทำการฉายแสงสีฟ้าความยาวคลื่น 480 นาโนเมตร ความเข้มแสง 1,800 มิลลิวัตต์/ตารางเซนติเมตร ที่ระยะห่าง 1 เซนติเมตร โดยใช้สารละลายไฮโดรเจลปริมาตร 50-80 ไมโครลิตร พบว่าสามารถเกิดการก่อตัวเป็นเจลที่สมบูรณ์เมื่อได้รับการฉายแสงสีฟ้าเป็นระยะเวลา 60 วินาทีและ 90 วินาที แม้ว่าในการศึกษาครั้งนี้จะทำการละลายเมทาคริเลตไฮยาลูโรนิกในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดดีเอ็มอีเอ็ม รวมถึงมีการผสมเซลล์ในสารละลายไฮโดรเจลก็ตาม ซึ่งต่างจากการศึกษาของ Chaopanitcharoen (2021)<sup>(7)</sup> ที่ทำการละลายเมทาคริเลตไฮยาลูโรนิกในฟอสเฟตบัฟเฟอร์เพียงอย่างเดียว

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์โดยอ้อม การทดสอบนี้ดัดแปลงมาจากมาตรฐาน ISO 10993-5 ในหัวข้อของเหลวสกัดของวัสดุทดสอบ ซึ่งเป็นการจำลองสภาวะการใช้งานจริงในทางคลินิกที่ไฮโดรเจลจะถูกห้อมล้อมด้วยเลือดหรือสารน้ำระหว่างเซลล์เมื่อถูกนำไปใช้ในการสร้างใหม่หรือทดแทนเนื้อเยื่อที่เป็นรอยโรค การทดสอบนี้จะทำการสกัดไฮโดรเจลด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดดีเอ็มอีเอ็มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลาอย่างน้อย 24 ชั่วโมง แล้วนำมาทดสอบกับเซลล์โดยไล่ระดับความเข้มข้นของของเหลวสกัดจาก 100%, 50%, 25% และ 12.5%

เมื่อทดสอบกับเซลล์ครบ 24 ชั่วโมงจะทำการวัดเมแทบอลิซึมของเซลล์ด้วยวิธีวิเคราะห์เอ็มทีที ซึ่งอาศัยหลักการที่สารละลายเอ็มทีทีที่ติดตั้งซึ่งเป็นสารในกลุ่มเตตระโซเลียมจะเป็นสารละลายที่ไม่มีฟลูออเรสเซนส์ ละลายน้ำได้ดีและสามารถผ่านเข้าเยื่อหุ้มเซลล์ได้ ในเซลล์ที่มีชีวิตจะเกิดเมแทบอลิซึมภายในเซลล์ซึ่งมีการรับและจ่ายอิเล็กตรอนเกิดขึ้นตลอด เมื่อเอ็มทีทีที่ผ่านเข้าไปในเซลล์ได้รับอิเล็กตรอนจะเปลี่ยนเป็นสารชื่อฟอร์มazan ซึ่งเป็นสารที่มีฟลูออเรสเซนส์ เราก็จะสามารถตรวจวัดค่าที่เกิดขึ้นได้ แต่ซาร์ยาน์ฟอร์มazan นั้นเป็นสารที่ไม่ละลายน้ำ ทำให้ตกตะกอนเป็นผลึกแหลมคมภายในเซลล์ ทำให้เซลล์ตายและเป็นการหยุดปฏิกิริยาในที่สุด ค่าที่ได้จากการใช้วิธีวิเคราะห์เอ็มทีทีจึงเป็นค่าที่แสดงถึงจำนวนเซลล์ในขณะนั้นได้ใกล้เคียงที่สุดเพราะไม่มีผลจากการที่เซลล์เพิ่มจำนวนขึ้นเมื่อเวลาผ่านไปมากนัก<sup>(74)</sup> กลุ่มควบคุมที่ใช้ในการทดสอบนี้คือ 10% ไคเมทิลซัลฟอกไซด์ ซึ่งมีความเป็นพิษต่อเซลล์และ 10% ฟิทัลโบไวน์ซีรัม ซึ่งช่วยให้เซลล์มีการเจริญเติบโตที่ดีขึ้น พบว่าในทุกกลุ่มความเข้มข้นของของเหลวสกัดที่นำมาทดสอบกับเซลล์มีค่าฟลูออเรสเซนส์ที่วัดได้หลังจากผ่านไป 24 ชั่วโมงไม่แตกต่างจากกลุ่ม 10% ฟิทัลโบไวน์ซีรัมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และมีค่ามากกว่ากลุ่ม 10% ไคเมทิลซัลฟอกไซด์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การที่ไฟโบรบลาสต์แอล 929 สามารถมีชีวิตอยู่ในของเหลวสกัดจากไฮโดรเจลได้ แสดงถึงไฮโดรเจลเมื่ออยู่ในสภาวะที่ก่อตัวสมบูรณ์หลังการฉายแสงสีฟ้าไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ ซึ่งสอดคล้องกับการทดสอบของ Fairbanks (2009)<sup>(72)</sup> ที่ทำการทดสอบความเข้ากันได้ของไฟโบรบลาสต์ของคนกับไฮโดรเจลจากโพลีเอธิลีนไกลคอลที่ครอสลิงค์ด้วยแอลเอพี พบว่าเซลล์มีชีวิตรอดชีวิตถึง 95% เมื่อทดสอบกับไฮโดรเจลเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และสอดคล้องกับการทดสอบของ Wang (2018)<sup>(73)</sup> ที่พบการแสดงออกของเซลล์กระดูกอ่อนเป็นปกติเมื่อนำมาเลี้ยงร่วมกับไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกและโพลีเอธิลีนไกลคอลที่ครอสลิงค์ด้วยแอลเอพี การทดสอบในครั้งนี้เป็นการทดสอบความเป็นพิษของไฮโดรเจลต่อเซลล์ในภาวะที่ไม่มีการเสื่อมสลายของไฮโดรเจล โดยพบว่าหากทำการแช่ไฮโดรเจลไว้ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์เป็นเวลาหนึ่งเดือนจะยังไม่เห็นการเสื่อมสลายของไฮโดรเจลขึ้น แต่เมื่อมีการปรากฏของไฮยาลูโรนเนสในฟอสเฟตบัฟเฟอร์จะใช้เวลาเพียง 4-5 วันในการย่อยสลายไฮโดรเจลปริมาตร 40 ไมโครลิตรอย่างสมบูรณ์ และได้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดไฮยาลูโรนิก<sup>(7)</sup> ไม่ปรากฏข้อมูลการศึกษาถึงปริมาณเมทาคริลเลตหรือแอลเอพีที่ถูกปลดปล่อยออกมาเมื่อไฮโดรเจลถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์ไฮยาลูโรนเนส แต่จากการศึกษาของ Fairbanks (2009)<sup>(72)</sup> และ Wang (2018)<sup>(73)</sup> ที่ใช้สารละลายไฮโดรเจลที่มีส่วนผสมของแอลเอพีความเข้มข้น 15 มิลลิกรัม/ลิตร แล้วนำมาสัมผัสกับเซลล์โดยตรงก่อนเกิดการก่อตัวเป็นเจลเพื่อที่จะห่อหุ้มเซลล์ด้วยไฮโดรเจล พบว่าเซลล์ยังคงความมีชีวิตไว้ได้จึงมีแนวโน้มว่าที่ความ

เข้มข้นของแอลเอพี 15 มิลลิกรัม/ลิตรซึ่งเป็นความเข้มข้นเดียวกับที่ใช้ในงานวิจัยครั้งนี้เซลล์ยังสามารถคงความมีชีวิตอยู่ได้ หากมีการปลดปล่อยของแอลเอพีภายหลังจากที่ไฮโดรเจลถูกย่อยสลาย ความเข้มข้นของแอลเอพีในอาหารเลี้ยงเซลล์จะมีไม่เกิน 15 มิลลิกรัม/ลิตรจึงมีแนวโน้มไม่เป็นอันตรายต่อเซลล์ ในลักษณะเดียวกันการศึกษาของ Areevijit (2021)<sup>(6)</sup> และ Maturavongsadit (2015)<sup>(68)</sup> ได้ทำการเตรียมเมทาคริลเลตไฮยาโลโรนิกแอซิดโดยใช้สัดส่วนเมทาคริลเลตต่อกรดไฮยาโลโรนิก 10:1 เมื่อนำสารละลายไฮโดรเจลไปผสมรวมกับเซลล์เพื่อการเลี้ยงแบบห่อหุ้มเซลล์ด้วยไฮโดรเจล พบว่าเซลล์ยังคงความมีชีวิตไว้ได้แม้ไม่ได้มีการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ก็ตาม จึงมีแนวโน้มว่าการเตรียมเมทาคริลเลตไฮยาโลโรนิกแอซิดด้วยสัดส่วนข้างต้น ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์<sup>(6)</sup> มีการศึกษาพบว่าเมทาคริลเลตโมโนเมอร์จากไฮโดรเจลที่พอลิเมอร์ไรเซชันโดยแสงที่เป็นอันตรายต่อเซลล์เป็นเมทาคริลเลตส่วนเกินที่มาจากขั้นตอนการการปรับปรุงโครงสร้าง ซึ่งสามารถกระตุ้นให้เกิดอนุมูลอิสระซึ่งมีผลกับวัฏจักรเซลล์ได้ เมื่อเข้าสู่เซลล์จะถูกตัวจับอนุมูลอิสระเช่นกลูตาไธโอนหรือเอ็นเอชดีดีลซีสเตอีนจับซึ่งเป็นกลไกหลักในการป้องกันเซลล์จากเมทาคริลเลตโมโนเมอร์<sup>(67)</sup> ทั้งนี้ยังต้องรอข้อมูลการศึกษาถึงการปลดปล่อยเมทาคริลเลตหลังจากที่มีการย่อยสลายไฮโดรเจลจากเมทาคริลเลตไฮยาโลโรนิกแอซิดต่อไป

ในการทดสอบด้วยวิธีการเลี้ยงเซลล์แบบสองมิติเป็นการนำเซลล์มาเลี้ยงบนพื้นผิวไฮโดรเจลเพื่อศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์ โดยติดตามความมีชีวิตของเซลล์ในวันที่ 1, 3, 5 และ 12 ของการทดสอบผ่านวิธีวิเคราะห์ริซาซูริน ซึ่งมีหลักการคล้ายคลึงกับวิธีวิเคราะห์เอ็มทีที กล่าวคือสารละลายริซาซูรินตั้งต้นเป็นสารที่มีฟลูออเรสเซนส์น้อยเมื่อได้รับอิเล็กตรอนจากตัวให้อิเล็กตรอนภายในเซลล์จะเปลี่ยนเป็นรีโซรูฟินซึ่งเป็นสารที่มีฟลูออเรสเซนส์เมื่อวัดที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร ข้อดีของรีโซรูฟินคือเป็นสารที่ละลายน้ำได้ดี ไม่ตกตะกอนภายในเซลล์และสามารถผ่านออกมาจากเยื่อหุ้มเซลล์ได้ ทำให้เซลล์ไม่ตาย สามารถติดตามการทดสอบเซลล์ชุดเดิมต่อในวันต่อไปได้ แต่ข้อเสียของริซาซูรินคือค่าฟลูออเรสเซนส์ที่ได้จะแปรผันตามเวลา<sup>(78)</sup> เนื่องจากเซลล์มีการเพิ่มจำนวนขึ้นเรื่อยๆหากเวลาที่ใช้วัดผลไม่เท่ากัน อาจทำให้ค่าฟลูออเรสเซนส์ที่วัดได้ไม่สามารถนำมาเปรียบเทียบกันได้โดยถูกต้องสมบูรณ์ ในการทดสอบนี้มีกลุ่มควบคุมเป็นจานเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม (Tissue culture plate) ค่าฟลูออเรสเซนส์ที่วัดได้ในแต่ละหลุมมาจากการเกิดเมแทบอลิซึมภายในเซลล์ที่มีชีวิตจึงสามารถดูแนวโน้มการเจริญเพิ่มขึ้นของเซลล์ได้จากค่าฟลูออเรสเซนส์ที่เพิ่มขึ้น จากการทดสอบเมื่อไฟโบรบลาสต์แอล 929 ถูกนำมาเลี้ยงบนพื้นผิวไฮโดรเจลที่ได้รับการฉายแสงเป็นเวลา 60 วินาทีและ 90 วินาที เซลล์สามารถเจริญเติบโตขึ้นได้เมื่อเวลาผ่านไปโดยไม่มี ความแตกต่างระหว่างกลุ่ม 60 วินาทีและ 90 วินาที

อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่พบว่ากลุ่มที่เลี้ยงบนพื้นผิวไฮโดรเจลทั้ง 2 นั้นมีการเจริญเติบโตที่น้อยกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในช่วง 3-5 วันแรก แต่เมื่อติดตามจนครบ 12 วัน จำนวนเซลล์ในกลุ่มที่เลี้ยงบนพื้นผิวไฮโดรเจลก็สามารถเพิ่มขึ้นจนใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุมได้ แสดงให้เห็นถึงความเข้ากันได้ทางชีวภาพของเซลล์เมื่อได้เลี้ยงร่วมกับไฮโดรเจลโดยตรง ในการทดสอบนี้เมื่อนำเซลล์ที่เลี้ยงบนพื้นผิวไฮโดรเจลในวันที่ 3 และ 5 มาส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ พบว่ารูปร่างเซลล์ส่วนใหญ่มีลักษณะกลมและอยู่รวมกลุ่มกัน ไม่แผ่แขนงของเซลล์เกาะไปบนพื้นผิวอย่างในกลุ่มควบคุม การที่ไฟโบรบลาสต์แอล 929 ที่เป็นเซลล์ยึดเกาะไม่สามารถเกาะบนพื้นผิวได้อย่างเหมาะสมอาจเป็นเหตุผลที่ทำให้เซลล์เจริญเติบโตได้ช้าในช่วง 3-5 วันแรก สาเหตุที่ทำให้เซลล์ไม่สามารถยึดเกาะบนพื้นผิวไฮโดรเจลได้เหมือนในงานเลี้ยงเซลล์คาดว่ามาจากการที่ความแข็งผิวของไฮโดรเจลนั้นมีค่าน้อยกว่างานเลี้ยงเซลล์มาก<sup>(7)</sup> มีการศึกษาพบว่าเมื่อนำไฮโดรเจลไปสัมผัสกับน้ำและเกิดการพองตัว ไฮโดรเจลจะทนความเค้นและความเครียดที่มากระทำต่อพื้นผิวได้ลดลง<sup>(88)</sup> หรืออีกคือมีความแข็งแรงที่ลดลงนั่นเอง เป็นผลให้เซลล์เกาะบนพื้นผิวได้ยากขึ้น อีกหนึ่งสาเหตุที่ทำให้เซลล์เกาะบนพื้นผิวได้น้อยคือ การที่เมทาคริลเลตไฮยาโลโรนิกแอซิดในการศึกษาครั้งนี้มีค่าปริมาณการเกิดการปรับปรุงสูงถึง 100% ซึ่งบริเวณที่ตัวรับของเซลล์ชนิด CD44 จับกับสายโซ่โมเลกุลของกรดไฮยาโลโรนิกคือบริเวณที่เรียกว่าบริเวณยึดเกาะ (HA-binding domain) ซึ่งเป็นบริเวณอนุรักษ์ของสายโซ่โมเลกุล (Highly conserved area) ซึ่งจะประกอบด้วยโมโนเมอร์ของกรดไฮยาโลโรนิก คืออกลูคูโรนิกแอซิดและเอ็นนอซิติลกลูโคซามีน จำนวน 3-4 คู่<sup>(89)</sup> การที่มีปริมาณการเกิดการปรับปรุงที่สูงทำให้บริเวณยึดเกาะภายในสายโซ่โมเลกุลถูกปรับปรุงโครงสร้างไปด้วยทำให้อาจเป็นหนึ่งในสาเหตุที่ทำให้เซลล์จับกับไฮโดรเจลได้น้อยลง นอกจากนี้ปัจจัยในการยึดเกาะของเซลล์ยังมีในส่วนของความขรุขระของพื้นผิว สภาพตัวของพื้นผิวและแอนติเจนของพื้นผิวอีกด้วย ในช่วงท้ายของการทดสอบครั้งนี้พบว่าเซลล์ที่เลี้ยงบนพื้นผิวไฮโดรเจลสามารถเจริญเติบโตจนทันเซลล์ในกลุ่มควบคุมได้ คาดว่ามาจากการที่เมื่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์มีการเจริญเติบโตถึงระยะหนึ่งจะมีการสร้างเมทริกซ์นอกเซลล์ขึ้นทำให้เซลล์อยู่ในภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตมากกว่าบนพื้นผิวไฮโดรเจล เซลล์เลยมีการเจริญเติบโตที่มากขึ้น ส่วนในกลุ่มควบคุมมีการเจริญเติบโตที่ลดลงเนื่องจากเซลล์ได้เพิ่มจำนวนจนเต็มงานเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุมแล้วนั่นเอง (Confluence) ข้อมูลที่ได้จากการทดสอบนี้สามารถใช้ในการพัฒนาสูตรในการสังเคราะห์เมทาคริลเลตไฮยาโลโรนิกแอซิดไฮโดรเจลที่มีประสิทธิภาพมากขึ้นได้ในอนาคต

ในการทดสอบด้วยวิธีการห่อหุ้มเซลล์ด้วยไฮโดรเจลเป็นการประเมินการเจริญเติบโตของเซลล์เมื่อถูกนำมาเลี้ยงในลักษณะสามมิติ ที่มีการห่อหุ้มล้อมไปด้วยไฮโดรเจลลักษณะคล้ายเนื้อเยื่อเกี่ยวพันตามธรรมชาติ ทำได้โดยการนำเซลล์มาผสมกับสารละลายไฮโดรเจลให้เป็นเนื้อเดียวกันจากนั้นจึงนำมาใส่จานเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุมแล้วทำการฉายแสงสีฟ้าเพื่อให้เกิดการก่อตัวเป็นเจล แบ่งออกเป็นกลุ่มที่ได้รับการฉายแสงสีฟ้าเป็นระยะเวลา 60 วินาทีกับ 90 วินาที การทดสอบนี้เซลล์ทุกเซลล์จะสัมผัสกับไฮโดรเจลโดยตรงโดยที่ไม่มีผลของการเกาะรวมกลุ่มของเซลล์เนื่องจากเซลล์เกาะบนพื้นผิวได้ไม่ดีดังเช่นในการทดสอบด้วยวิธีการเลี้ยงเซลล์ในลักษณะสองมิติ โดยจะทำการติดตามการเจริญเติบโตของเซลล์ในวันที่ 1, 3, 5 และ 12 ด้วยวิธีวิเคราะห์รีซอร์ซินและการเปรียบเทียบกับค่าในวันที่ 1 ของการทดสอบในกลุ่มที่เลี้ยงร่วมกับไฮโดรเจลที่ได้รับการฉายแสงสีฟ้าเป็นเวลา 60 วินาทีเพื่อเป็นการเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเซลล์ภายในระบบ เนื่องจากในปัจจุบันยังไม่มีโครงร่างทางชีวภาพที่สามารถใช้เป็นมาตรฐานสากลสำหรับการเลี้ยงเซลล์ในรูปแบบสามมิติให้ใช้เป็นกลุ่มควบคุมได้จึงใช้วิธีการเปรียบเทียบภายในระบบสำหรับการวิเคราะห์ข้อมูล จากการทดลองพบว่าในวันแรกหลังจากห่อหุ้มเซลล์ด้วยไฮโดรเจล สามารถตรวจพบเมแทบอลิซึมของเซลล์ได้ในทั้ง 2 กลุ่ม แสดงให้เห็นว่าเซลล์สามารถมีชีวิตและเกิดเมแทบอลิซึมภายในเซลล์ได้หลังจากถูกห่อหุ้มด้วยไฮโดรเจลและสัมผัสส่วนประกอบในสารละลายไฮโดรเจลรวมถึงผ่านขั้นตอนการฉายแสงสีฟ้า ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดสอบของการศึกษาอื่น<sup>(72, 73)</sup> มีการศึกษาถึงความเข้มข้นของไฮโดรเจลพอลิเมอร์ภายในสารละลายไฮโดรเจลมีผลต่อความมีชีวิตของเซลล์กระดูก พบว่าหากความเข้มข้นของไฮโดรเจลพอลิเมอร์มีค่าต่ำคือเท่ากับร้อยละ 2 ไฮโดรเจลที่ได้จะมีความแข็งที่น้อยส่งผลให้ความมีชีวิตของเซลล์ที่วัดได้ลดลง ความเข้มข้นของไฮโดรเจลพอลิเมอร์มีค่าสูงคือเท่ากับร้อยละ 4-5 พบว่าค่าความมีชีวิตของเซลล์เช่นกัน<sup>(90)</sup> โดยในครั้งนี้ได้ใช้ความเข้มข้นของไฮโดรเจลพอลิเมอร์เท่ากับร้อยละ 3 ในการทดสอบ ซึ่งพบว่าเซลล์สามารถเจริญเติบโตได้ภายในไฮโดรเจลสอดคล้องกับการศึกษาอื่น<sup>(6, 68)</sup> ผลการทดสอบในครั้งนี้พบว่าเซลล์สามารถเจริญเติบโตในไฮโดรเจลได้ โดยจะเจริญเติบโตช้าในช่วงแรกและเจริญเติบโตมากขึ้นในช่วงหลังของการทดสอบ ซึ่งผลที่ได้ในครั้งนี้แตกต่างจากการศึกษาของ Areevijit (2021)<sup>(6)</sup> และ Maturavongsadit (2015)<sup>(68)</sup> ที่ทดสอบโดยการห่อหุ้มเซลล์กระดูกและกระดูกอ่อนด้วยไฮโดรเจลจากเมทาคริลเลตไฮยาโลโรนิกแอซิดที่ครอสลิงค์ด้วยดีทีทีและติดตามผลถึงวันที่ 14 โดยผลที่ได้คือเซลล์มีการเจริญเติบโตที่ดีในช่วง 7 วันแรกและเริ่มช้าลงหรือคงที่ในวันที่ 10-14 ซึ่งผลที่แตกต่างกันอาจเกิดจากการที่เมทาคริลเลตไฮยาโลโรนิกแอซิดที่ใช้ในงานวิจัยครั้งนี้มีปริมาณการเกิดการปรับปรุงโครงสร้างที่สูง

กว่างานวิจัยของ Areevijit (2021)<sup>(6)</sup> และ Maturavongsadit (2015)<sup>(68)</sup> ถึง 2 เท่าโดยประมาณ ทำให้เมื่อก่อตัวเป็นเจลแล้วมีปริมาณการครอสลิงค์ภายในไฮโดรเจลที่หนาแน่นกว่าส่งผลทำให้อาหาร อากาศและพื้นที่ว่างที่เซลล์ได้รับมีน้อยกว่าเซลล์จึงเจริญเติบโตได้น้อย<sup>(90)</sup> ในช่วงแรกของการทดสอบ เมื่อเวลาผ่านไปเซลล์เริ่มย่อยสลายไฮโดรเจลรอบๆ ด้วยเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสทำให้อาหารและอากาศเข้าถึงเซลล์ได้มากขึ้น มีพื้นที่สำหรับการเพิ่มจำนวนมากขึ้นเลยเจริญเติบโตได้เร็วขึ้น และพบว่าเซลล์ในกลุ่มที่ถูกห่อหุ้มด้วยไฮโดรเจลที่ได้รับการฉายแสงสีฟ้าเป็นเวลา 60 วินาทีเจริญเติบโตได้มากกว่ากลุ่มที่ได้รับการฉายแสงสีฟ้าเป็นเวลา 90 วินาทีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในช่วงวันที่ 3-5 ของการทดสอบแต่ในวันที่ 12 ไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งสามารถอธิบายได้ด้วยเหตุผลเดียวกันกล่าวคือไฮโดรเจลที่ได้รับการฉายแสงสีฟ้าเป็นเวลา 90 วินาทีที่มีการครอสลิงค์ระหว่างสายไซโมเลกุลของพอลิเมอร์มากกว่าจึงทำให้เซลล์เจริญได้ช้ากว่าในช่วงแรก มีการศึกษาถึงผลของแสงที่นำสนใจ โดยข้อมูลจากการศึกษาของ Ragain (2021)<sup>(91)</sup> พบว่าเมื่อเซลล์เยื่อหุ้มเหงือกได้รับการฉายแสงแอลอีดีเป็นเวลานานถึง 39-120 วินาทีเซลล์เยื่อหุ้มเหงือกจะมีอัตราการเจริญเติบโตลดลงแต่ไม่ส่งผลต่อความมีชีวิตของเซลล์ ซึ่งผลที่พบนั้นแตกต่างจากการศึกษาของ Langlongsathit (2016)<sup>(92)</sup> ที่พบว่าแสงแอลอีดีไม่มีผลกับการเจริญเติบโตของเซลล์เอ็นยี่ดปริทันต์หากได้รับการฉายแสงเป็นระยะเวลาไม่เกิน 60 วินาที การได้รับการฉายแสงแอลอีดีเป็นเวลานานจะส่งผลกับโปรตีนภายในไมโทคอนเดรียและเพอร์ออกซิโซมทำให้เกิดไฮโดรเจนเพอออกไซด์ขึ้นในเซลล์ ซึ่งส่งผลต่อการแบ่งตัวของเซลล์<sup>(93)</sup> จึงมีความเป็นไปได้ที่เซลล์ที่ถูกห่อหุ้มด้วยไฮโดรเจลในการทดสอบครั้งนี้เจริญเติบโตช้าในช่วงแรกของการทดสอบเนื่องจากผ่านขั้นตอนการฉายแสงสีฟ้าเพื่อให้สารละลายเกิดการก่อตัวเป็นเจลขึ้น

ในการทดสอบด้วยวิธีการเลี้ยงเซลล์แบบ 2 มิติได้ใช้จำนวนเซลล์เริ่มต้น 5,000 เซลล์ต่อหลุมซึ่งน้อยกว่าการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์โดยอ้อมและการทดสอบด้วยวิธีการห่อหุ้มเซลล์ด้วยไฮโดรเจลที่ใช้จำนวนเซลล์เริ่มต้น 10,000 เซลล์ต่อหลุม ด้วยเหตุผลที่โฟโบริบลาสต์เป็นเซลล์ที่เจริญเติบโตได้ไว เมื่อนำมาเลี้ยงในจานเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุมโดยใช้จำนวนเซลล์เริ่มต้น 10,000 เซลล์ต่อหลุม พบว่าใช้เวลาเพียง 5 วันเซลล์ก็เจริญเติบโตจนเต็มหลุมแล้ว ทำให้ไม่สามารถติดตามการทดสอบไปจนถึงวันที่ 12 ได้ ในการทดสอบด้วยวิธีการเลี้ยงเซลล์แบบ 2 มิติจึงได้ลดจำนวนเซลล์เริ่มต้นลงเหลือเพียง 5,000 เซลล์ต่อหลุมเพื่อที่จะได้สามารถติดตามการทดลองต่อเนื่องได้ถึง 12 วัน ส่วนในการทดสอบห่อหุ้มเซลล์ด้วยไฮโดรเจลซึ่งทำการทดสอบถึง 12 วัน เช่นกันแต่ก็ยังคงใช้จำนวนเซลล์เริ่มต้นเป็น 10,000 เซลล์ต่อหลุม เนื่องจากเมื่อเซลล์ถูกห่อหุ้มด้วยไฮโดรเจลแล้วเซลล์จะถูกจำกัดอาหารและอากาศมากกว่าการเลี้ยงในลักษณะ 2 มิติมาก ซึ่ง

ส่งผลให้เซลล์เจริญเติบโตได้ช้ากว่า หากใช้ปริมาณเซลล์เริ่มต้นที่น้อยอาจไม่สามารถติดตามวัดผลค่าฟลูออเรสเซนส์ระหว่างการทดสอบแต่ละวันได้จึงใช้จำนวนเซลล์เริ่มต้นที่มากกว่าการทดสอบด้วยวิธีการเลี้ยงเซลล์แบบ 2 มิตินั่นเอง

การตรวจลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ในการศึกษาครั้งนี้ทำการตรวจดูเซลล์ที่ถูกเลี้ยงบนพื้นผิวไฮโดรเจลในลักษณะสองมิติและห่อหุ้มเซลล์ด้วยไฮโดรเจลในลักษณะสามมิติในวันที่ 12 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด โดยในการศึกษานี้มีจุดประสงค์เพื่อตรวจดูลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์จึงเลือกวิธีการทำให้ขึ้นตัวอย่างแห้งโดยการตรึงเซลล์ด้วยกลูตาโรลดีไฮด์ แล้วจึงทำให้แห้งด้วยการเพิ่มความเข้มข้นของเอทานอลเพื่อแทนที่น้ำเข้าๆและทำให้แห้งขั้นสุดท้ายด้วยเฮกซะเมทิลไดไฮลาเซน วิธีนี้จะทำให้รูปร่างของเซลล์ใกล้เคียงกับสภาพตามจริงมากที่สุดแต่มีข้อเสียคือระหว่างขั้นตอนการทำให้แห้งขั้นสุดท้ายไฮโดรเจลที่สูญเสียน้ำจะเกิดการหดตัวลงอย่างมาก ทำให้ไม่เหมาะจะใช้เป็นวิธีสำหรับการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไฮโดรเจล วิธีที่ใช้ในครั้งนี้นี้แตกต่างจากวิธีของ Chaopanitcharoen (2021)<sup>(7)</sup> ซึ่งใช้วิธีแช่แห้งแบบเยือกแข็ง ทำให้น้ำภายในไฮโดรเจลระเหิดไปโดยยังคงรูปร่างของไฮโดรเจลไว้ได้ วิธีนี้จะทำให้เห็นลักษณะรูพรุนของไฮโดรเจลเมื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดได้ แต่หากนำเซลล์ไปทำให้แห้งด้วยวิธีแช่แห้งแบบเยือกแข็ง เซลล์จะแตกระหว่างกระบวนการระเหิดทำให้ไม่สามารถศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้ ถึงเป็นข้อจำกัดในการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ที่เลี้ยงร่วมกับไฮโดรเจล ในการศึกษาของ Areevijit (2021)<sup>(6)</sup> ได้ใช้วิธีการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาด้วยการใช้อิมมูโนฟลูออเรสเซนส์ทำให้เห็นลักษณะการกระจายตัวของเซลล์ในไฮโดรเจล และสังเกตรูปร่างของเซลล์ได้ เมื่อทำการตรวจลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ในงานวิจัยครั้งนี้แล้วพบว่าลักษณะของเซลล์ไม่มีความแตกต่างกันระหว่างกลุ่มที่เลี้ยงร่วมกับไฮโดรเจลที่ได้รับการฉายแสงเป็นเวลา 60 วินาทีกับ 90 วินาที โดยในกลุ่มที่ห่อหุ้มเซลล์ด้วยไฮโดรเจลพบลักษณะเซลล์บางส่วนเป็นรูปร่างกลม บางส่วนมีการยื่นแขนงของเซลล์คล้ายรูปทรงกระสวย พบลักษณะของพื้นผิวเซลล์ที่ปกติและพบเซลล์ที่กำลังอยู่ในขั้นตอนของการแบ่งเซลล์ แสดงให้เห็นว่าเซลล์ยังคงลักษณะทางสัณฐานวิทยาเอาไว้ได้เมื่อนำมาเลี้ยงร่วมกับไฮโดรเจล ส่วนในกลุ่มที่เลี้ยงบนพื้นผิวไฮโดรเจลในลักษณะสองมิติพบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของผิวเซลล์ที่ปกติเช่นกัน แต่พบว่าเซลล์บางส่วนมีการรวมกลุ่มกันซึ่งสอดคล้องกับการตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ



### ข้อเสนอแนะ

ในการศึกษาครั้งต่อไปควรทำการศึกษาในเซลล์ปฐมภูมิเพื่อเปรียบเทียบผลการตอบสนองของเซลล์ปฐมภูมิต่อไฮโดรเจลกับผลที่ได้จากเซลล์ไลน์ในงานวิจัยครั้งนี้ ควรมีการเปรียบเทียบผลของค่าปริมาณการเกิดการปรับปรุงโครงสร้างต่อการเจริญเติบโตของเซลล์และควรศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาร่วมกันมากกว่าหนึ่งวิธีเพื่อความสมบูรณ์ของข้อมูลที่มากขึ้น มีการติดตามถึงผลของแสงสีฟ้าที่ใช้ในการบ่มไฮโดรเจลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ และตรวจวัดปริมาณเมทาคริลเลตโมโนเมอร์ที่ปลดปล่อยออกมาหลังจากที่ไฮโดรเจลถูกย่อยสลายซึ่งอาจส่งผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์



## บรรณานุกรม

1. Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med.* 1994;331(14):889-95. eng. 1994/10/06.
2. Berthiaume F, Maguire TJ, Yarmush ML. Tissue engineering and regenerative medicine: History, progress, and challenges. *Annu Rev Chem Biomol Eng.* 2011;2:403-30. eng. 2011/01/01.
3. Gao W, Zhang Y, Zhang Q, Zhang L. Nanoparticle-hydrogel: A hybrid biomaterial system for localized drug delivery. *Ann Biomed Eng.* 2016;44(6):2049-61. eng. 2016/03/10.
4. Chircov C, Grumezescu AM, Bejenaru LE. Hyaluronic acid-based scaffolds for tissue engineering. *Rom J Morphol Embryol.* 2018;59(1):71-6. eng. 2018/06/26.
5. Trakiattikul N DN, Luckanagul JA, Rungsiyanont S. The development of mannitol/bsa methacrylated hyaluronic acid hydrogels as an injectable drug delivery platform. *SWU Dent J.* 2018;11:41-54.
6. Areevijit K, Dhaneuan N, Luckanagul JA, Rungsiyanont S. Biocompatibility study of modified injectable hyaluronic acid hydrogel with mannitol/bsa to alveolar bone cells. *J Biomater Appl.* 2021;35(10):1294-303. eng. 2020/11/06.
7. Chaopanitcharoen P DN, Luckanagul J, Rungsiyanont S. The development of blue light initiated photopolymerized hyaluronic acid based hydrogel. *Proceeding in 9th Kasetsart University National Research.* 2021.
8. Szafron JM, Khosravi R, Reinhardt J, Best CA, Bersi MR, Yi T, et al. Immuno-driven and mechano-mediated neotissue formation in tissue engineered vascular grafts. *Ann Biomed Eng.* 2018;46(11):1938-50. eng. 2018/07/11.
9. Wichterle O, LÍM D. Hydrophilic gels for biological use. *Nature.* 1960;185(4706):117-8.
10. Nayyer L, Patel K, Esmaeili A, Rippel R, Birchall M, O'toole G, et al. Tissue engineering: Revolution and challenge in auricular cartilage reconstruction. *Plastic and reconstructive surgery.* 2012;129:1123-37.

11. Broughton G, 2nd, Janis JE, Attinger CE. Wound healing: An overview. *Plast Reconstr Surg.* 2006;117(7 Suppl):1e-S-32e-S. eng. 2006/06/28.
12. Stefanou A, Worden A, Kandagatla P, Reickert C, Rubinfeld I. Surgical wound misclassification to clean from clean-contaminated in common abdominal operations. *J Surg Res.* 2020;246:131-8. eng. 2019/10/04.
13. De Vries FEE, Wallert ED, Solomkin JS, Allegranzi B, Egger M, Dellinger EP, et al. A systematic review and meta-analysis including grade qualification of the risk of surgical site infections after prophylactic negative pressure wound therapy compared with conventional dressings in clean and contaminated surgery. *Medicine (Baltimore).* 2016;95(36):e4673. eng. 2016/09/08.
14. Haesler E, Swanson T, Ousey K, Carville K. Clinical indicators of wound infection and biofilm: Reaching international consensus. *J Wound Care.* 2019;28(Sup3b):s4-s12. eng. 2019/03/07.
15. Swat A, Dolado I, Rojas JM, Nebreda AR. Cell density-dependent inhibition of epidermal growth factor receptor signaling by p38alpha mitogen-activated protein kinase via sprouty2 downregulation. *Mol Cell Biol.* 2009;29(12):3332-43. eng. 2009/04/15.
16. Sorg H, Tilkorn DJ, Hager S, Hauser J, Mirastschijski U. Skin wound healing: An update on the current knowledge and concepts. *Eur Surg Res.* 2017;58(1-2):81-94. eng. 2016/12/16.
17. Witte MB, Barbul A. General principles of wound healing. *Surg Clin North Am.* 1997;77(3):509-28. eng. 1997/06/01.
18. Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature.* 2008;454(7203):428-35. eng. 2008/07/25.
19. Kurkinen M, Vaeheri A, Roberts PJ, Stenman S. Sequential appearance of fibronectin and collagen in experimental granulation tissue. *Lab Invest.* 1980;43(1):47-51. eng. 1980/07/01.
20. Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen.* 2008;16(5):585-601. eng.

2009/01/09.

21. Regan MC, Kirk SJ, Wasserkrug HL, Barbul A. The wound environment as a regulator of fibroblast phenotype. *J Surg Res.* 1991;50(5):442-8. eng. 1991/05/01.
22. Williams IR. Fibroblasts Delves PJ, editor. *Encyclopedia of immunology* (second edition). Oxford: Elsevier; 1998. 905-9.  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B0122267656002486>
23. Pierce GF, Mustoe TA, Altrock BW, Deuel TF, Thomason A. Role of platelet-derived growth factor in wound healing. *J Cell Biochem.* 1991;45(4):319-26. eng. 1991/04/01.
24. Desmoulière A, Geinoz A, Gabbiani F, Gabbiani G. Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J Cell Biol.* 1993;122(1):103-11. eng. 1993/07/01.
25. Madden JW, Smith HC. The rate of collagen synthesis and deposition in dehisced and resutured wounds. *Surg Gynecol Obstet.* 1970;130(3):487-93. eng. 1970/03/01.
26. Kyriakides TR, Bornstein P. Matricellular proteins as modulators of wound healing and the foreign body response. *Thromb Haemost.* 2003;90(6):986-92. eng. 2003/12/04.
27. Rudresha GV, Manjuprasanna VN, Urs AP, Choudhury M, Rajaiah R, Vishwanath BS. Serine protease from *tricosanthus tricuspidata* accelerates healing of echis carinatus venom-induced necrotic wound. *Toxicon.* 2020;183:1-10. eng. 2020/05/24.
28. Wattel F, Mathieu D. [oxygen and wound healing]. *Bull Acad Natl Med.* 2005;189(5):853-64; discussion 64-5. fre. 2006/01/26.
29. Arslantaş MK, Arslantaş R, Tozan EN. Effects of systemic erythropoietin on ischemic wound healing in rats. *Ostomy Wound Manage.* 2015;61(3):28-33. eng. 2015/03/10.
30. Harn HI, Ogawa R, Hsu CK, Hughes MW, Tang MJ, Chuong CM. The tension biology of wound healing. *Exp Dermatol.* 2019;28(4):464-71. eng. 2017/11/07.
31. Scalise A, Calamita R, Tartaglione C, Pierangeli M, Bolletta E, Gioacchini M, et al.

- Improving wound healing and preventing surgical site complications of closed surgical incisions: A possible role of incisional negative pressure wound therapy. A systematic review of the literature. *Int Wound J.* 2016;13(6):1260-81. eng. 2015/10/02.
32. Bernstein G. Healing by secondary intention. *Dermatol Clin.* 1989;7(4):645-60. eng. 1989/10/01.
33. Iacucci M, Ghosh S. Mucosal healing - how deep is enough? *Dig Dis.* 2016;34(1-2):160-4. eng. 2016/03/17.
34. Khoury ZH, Brooks JK, Bashirelahi N. What every dentist should know about oral mucosal wound healing. *Gen Dent.* 2020;68(6):24-6. eng. 2020/11/03.
35. Araújo MG, Silva CO, Misawa M, Sukekava F. Alveolar socket healing: What can we learn? *Periodontol 2000.* 2015;68(1):122-34. eng. 2015/04/14.
36. Lin WL, McCulloch CA, Cho MI. Differentiation of periodontal ligament fibroblasts into osteoblasts during socket healing after tooth extraction in the rat. *Anat Rec.* 1994;240(4):492-506. eng. 1994/12/01.
37. Daigo Y, Daigo E, Fukuoka H, Fukuoka N, Ishikawa M, Takahashi K. Wound healing and cell dynamics including mesenchymal and dental pulp stem cells induced by photobiomodulation therapy: An example of socket-preserving effects after tooth extraction in rats and a literature review. *Int J Mol Sci.* 2020;21(18). eng. 2020/09/24.
38. Mann FA, Payne JT. Bone healing. *Semin Vet Med Surg Small Anim.* 1989;4(4):312-21. eng. 1989/11/01.
39. Marx RE. Bone and bone graft healing. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am.* 2007;19(4):455-66, v. eng. 2007/12/20.
40. Yamagiwa H, Endo N. [bone fracture and the healing mechanisms. Histological aspect of fracture healing. Primary and secondary healing]. *Clin Calcium.* 2009;19(5):627-33. jpn. 2009/04/29.
41. Marsell R, Einhorn TA. The biology of fracture healing. *Injury.* 2011;42(6):551-5. eng. 2011/04/15.

42. Park JW, Hwang SR, Yoon IS. Advanced growth factor delivery systems in wound management and skin regeneration. *Molecules*. 2017;22(8). eng. 2017/07/28.
43. Athar U, Gentile TC. Keratinocyte growth factor. *Expert Opin Biol Ther*. 2009;9(6):779-87. eng. 2009/05/22.
44. Goodlad RA, Wright NA. Epidermal growth factor (egf). *Baillieres Clin Gastroenterol*. 1996;10(1):33-47. eng. 1996/03/01.
45. Ross R. Platelet-derived growth factor. *Annu Rev Med*. 1987;38:71-9. eng. 1987/01/01.
46. Nicholls AR, Holt RI. Growth hormone and insulin-like growth factor-1. *Front Horm Res*. 2016;47:101-14. eng. 2016/06/28.
47. Kudlow JE, Bjorge JD. Tgf alpha in normal physiology. *Semin Cancer Biol*. 1990;1(4):293-302. eng. 1990/08/01.
48. Lynch MD, Watt FM. Fibroblast heterogeneity: Implications for human disease. *J Clin Invest*. 2018;128(1):26-35. eng. 2018/01/03.
49. Strutz F, Okada H, Lo CW, Danoff T, Carone RL, Tomaszewski JE, et al. Identification and characterization of a fibroblast marker: Fsp1. *J Cell Biol*. 1995;130(2):393-405. eng. 1995/07/01.
50. Weissman-Shomer P, Fry M. Chick embryo fibroblasts senescence in vitro: Pattern of cell division and life span as a function of cell density. *Mech Ageing Dev*. 1975;4(2):159-66. eng. 1975/03/01.
51. Balestrini JL, Chaudhry S, Sarrazy V, Koehler A, Hinz B. The mechanical memory of lung myofibroblasts. *Integr Biol (Camb)*. 2012;4(4):410-21. eng. 2012/03/14.
52. Dave JM, Bayless KJ. Vimentin as an integral regulator of cell adhesion and endothelial sprouting. *Microcirculation*. 2014;21(4):333-44. eng. 2014/01/07.
53. Urist MR. Bone: Formation by autoinduction. *Science*. 1965;150(3698):893-9. eng. 1965/11/12.
54. Reddi AH, Huggins CB. Influence of geometry of transplanted tooth and bone on transformation of fibroblasts. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1973;143(3):634-7. eng. 1973/07/01.
55. Huggins C, Wiseman S, Reddi AH. Transformation of fibroblasts by allogeneic and

- xenogeneic transplants of demineralized tooth and bone. *J Exp Med*. 1970;132(6):1250-8. eng. 1970/12/01.
56. Chen G, Sato T, Ohgushi H, Ushida T, Tateishi T, Tanaka J. Culturing of skin fibroblasts in a thin plga-collagen hybrid mesh. *Biomaterials*. 2005;26(15):2559-66. eng. 2004/12/09.
57. Andrades JA, Han B, Becerra J, Sorgente N, Hall FL, Nimni ME. A recombinant human tgf-beta1 fusion protein with collagen-binding domain promotes migration, growth, and differentiation of bone marrow mesenchymal cells. *Exp Cell Res*. 1999;250(2):485-98. eng. 1999/07/22.
58. Aloise AC, Pereira MD, Duailibi SE, Gragnani A, Ferreira LM. Tgf- $\beta$ 1 on induced osteogenic differentiation of human dermal fibroblast. *Acta Cir Bras*. 2014;29 Suppl 1:1-6. eng. 2014/09/04.
59. Cho YD, Yoon WJ, Kim WJ, Woo KM, Baek JH, Lee G, et al. Epigenetic modifications and canonical wntless/int-1 class (wnt) signaling enable trans-differentiation of nonosteogenic cells into osteoblasts. *J Biol Chem*. 2014;289(29):20120-8. eng. 2014/05/29.
60. Urist MR, Strates BS. Bone morphogenetic protein. *J Dent Res*. 1971;50(6):1392-406. eng. 1971/11/01.
61. Cho Y, Kim B, Bae H, Kim W, Baek J, Woo K, et al. Direct gingival fibroblast/osteoblast transdifferentiation via epigenetics. *J Dent Res*. 2017;96(5):555-61. eng. 2017/01/13.
62. Vacanti CA, Kim W, Upton J, Vacanti MP, Mooney D, Schloo B, et al. Tissue-engineered growth of bone and cartilage. *Transplant Proc*. 1993;25(1 Pt 2):1019-21. eng. 1993/02/01.
63. Dongre A, Weinberg RA. New insights into the mechanisms of epithelial-mesenchymal transition and implications for cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2019;20(2):69-84. eng. 2018/11/22.
64. Pei D, Shu X, Gassama-Diagne A, Thiery JP. Mesenchymal-epithelial transition in development and reprogramming. *Nat Cell Biol*. 2019;21(1):44-53. eng.

2019/01/04.

65. Zaslav K, Cole B, Brewster R, DeBerardino T, Farr J, Fowler P, et al. A prospective study of autologous chondrocyte implantation in patients with failed prior treatment for articular cartilage defect of the knee: Results of the study of the treatment of articular repair (star) clinical trial. *Am J Sports Med.* 2009;37(1):42-55. eng. 2008/10/18.
66. Alvarez-Lorenzo C, Concheiro A. Intelligent drug delivery systems: Polymeric micelles and hydrogels. *Mini Rev Med Chem.* 2008;8(11):1065-74. eng. 2008/10/16.
67. Pereira I, Rodrigues C, Rodrigues A, Oliveira M, Gama M. 9 - injectable hydrogels as a delivery system for bone regeneration Rodrigues L, Mota M, editors. *Bioinspired materials for medical applications.* Woodhead Publishing; 2017. 241-71. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780081007419000097>
68. 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. eng. 2016/03/22.
69. 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 Appl Mater Interfaces.* 2017;9(4):3318-29. eng. 2016/12/28.
70. Mane S. Effect of chemical crosslinking on properties of polymer microbeads: A review. *Canadian chemical Transactions.* 2016;3:473-85.
71. Nakamura Y, Lee R, Coote ML, Yamago S. Termination mechanism of the radical polymerization of acrylates. *Macromol Rapid Commun.* 2016;37(6):506-13. eng. 2016/01/23.
72. Fairbanks BD, Schwartz MP, Bowman CN, Anseth KS. Photoinitiated polymerization of peg-diacrylate with lithium phenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphinate: Polymerization rate and cytocompatibility. *Biomaterials.* 2009;30(35):6702-7. eng. 2009/09/29.
73. 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). eng. 2019/04/10.
74. Berridge MV, Herst PM, Tan AS. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. *Biotechnol Annu Rev*. 2005;11:127-52. eng. 2005/10/12.
75. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983;65(1-2):55-63. eng. 1983/12/16.
76. Rampersad SN. Multiple applications of alamar blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. *Sensors (Basel)*. 2012;12(9):12347-60. eng. 2012/11/01.
77. Riss TL, Moravec RA. Use of multiple assay endpoints to investigate the effects of incubation time, dose of toxin, and plating density in cell-based cytotoxicity assays. *Assay Drug Dev Technol*. 2004;2(1):51-62. eng. 2004/04/20.
78. O'Brien J, Wilson I, Orton T, Pognan F. Investigation of the alamar blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem*. 2000;267(17):5421-6. eng. 2000/08/22.
79. de Fries R, Mitsuhashi M. Quantification of mitogen induced human lymphocyte proliferation: Comparison of alamarblue assay to 3h-thymidine incorporation assay. *J Clin Lab Anal*. 1995;9(2):89-95. eng. 1995/01/01.
80. Gonzalez RJ, Tarloff JB. Evaluation of hepatic subcellular fractions for alamar blue and mtt reductase activity. *Toxicol In Vitro*. 2001;15(3):257-9. eng. 2001/05/30.
81. McMillian MK, Li L, Parker JB, Patel L, Zhong Z, Gunnnett JW, et al. An improved resazurin-based cytotoxicity assay for hepatic cells. *Cell Biol Toxicol*. 2002;18(3):157-73. eng. 2002/06/27.
82. Präbst K, Engelhardt H, Ringgeler S, Hübner H. Basic colorimetric proliferation assays: Mtt, wst, and resazurin. *Methods Mol Biol*. 2017;1601:1-17. eng. 2017/05/05.
83. Wesierska-Gadek J, Gueorguieva M, Ranftler C, Zerza-Schnitzhofer G. A new multiplex

- assay allowing simultaneous detection of the inhibition of cell proliferation and induction of cell death. *J Cell Biochem.* 2005;96(1):1-7. eng. 2005/07/30.
84. Tsanaktsidou E, Kammona O, Labude N, Neuss S, Krüger M, Kock L, et al. Biomimetic cell-laden meha hydrogels for the regeneration of cartilage tissue. *Polymers (Basel).* 2020;12(7). eng. 2020/07/28.
85. Amini AR, Laurencin CT, Nukavarapu SP. Bone tissue engineering: Recent advances and challenges. *Crit Rev Biomed Eng.* 2012;40(5):363-408. eng. 2013/01/24.
86. Vo TN, Kasper FK, Mikos AG. Strategies for controlled delivery of growth factors and cells for bone regeneration. *Adv Drug Deliv Rev.* 2012;64(12):1292-309. eng. 2012/02/22.
87. Juráňová J. Illuminating the cellular and molecular mechanism of the potential toxicity of methacrylate monomers used in biomaterials. *Drug Chem Toxicol.* 2020;43(3):266-78. eng. 2019/01/05.
88. Tavsanlı B, Can V, Okay O. Mechanically strong triple network hydrogels based on hyaluronan and poly(n,n-dimethylacrylamide). *Soft Matter.* 2015;11(43):8517-24. eng. 2015/09/18.
89. Kwon MY, Wang C, Galarraga JH, Puré E, Han L, Burdick JA. Influence of hyaluronic acid modification on cd44 binding towards the design of hydrogel biomaterials. *Biomaterials.* 2019;222:119451. eng. 2019/09/04.
90. Castillo Diaz LA, Saiani A, Gough JE, Miller AF. Human osteoblasts within soft peptide hydrogels promote mineralisation in vitro. *J Tissue Eng.* 2014;5:2041731414539344. eng. 2014/11/11.
91. Ragain JC, Jr., Brodine BA, Zheng Q, Blen BJ, Garcia-Godoy F, Zhang YH. Effects of curing lights on human gingival epithelial cell proliferation. *J Am Dent Assoc.* 2021;152(4):260-8. eng. 2021/02/28.
92. Thamonwan Langlongsathit WS, Orakot Leysak, Rudee Surarit, Pirasut Rodanant. The effect of led light on viability and proliferation of periodontal ligament fibroblast cells. *M Dent J.* 2016;37:7.
93. Hockberger PE, Skimina TA, Centonze VE, Lavin C, Chu S, Dadras S, et al. Activation

of flavin-containing oxidases underlies light-induced production of  $\text{H}_2\text{O}_2$  in mammalian cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999;96(11):6255-60. eng. 1999/05/26.





## แผนการดำเนินงาน

ตาราง 5 แผนการดำเนินงานวิจัย

ขั้นตอน	ระยะเวลาดำเนินการวิจัย 12 เดือน											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
- ทบทวนงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง - รวบรวมองค์ความรู้เพื่อต่อยอดงานวิจัย	/	/	/	/	/							
- เตรียมเมทาคริเลตไฮยาโลโรนิกแอซิด - ทดสอบปริมาณการเกิดการปรับปรุงโครงสร้าง - เตรียมไฟโบรบลาสต์แอล 929						/	/	/				
- ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์โดยอ้อม - ทดสอบด้วยวิธีการเลี้ยงเซลล์แบบ 2 มิติ - ทดสอบด้วยวิธีการห่อหุ้มเซลล์ด้วยไฮโดรเจล - ตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์							/	/	/	/		
- สรุปผลการทดลองและเขียนรายงาน									/	/	/	/



MF-04-version-2.0  
วันที่ 18 ต.ค. 61

### หนังสือแจ้งผลการพิจารณา

#### คณะกรรมการจริยธรรมสำหรับพิจารณาโครงการวิจัยที่ทำในมนุษย์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

เอกสารนี้เพื่อแสดงว่าคณะกรรมการจริยธรรมสำหรับพิจารณาโครงการวิจัยที่ทำในมนุษย์ ได้พิจารณาและตอบรับเอกสารเพิ่มเติมที่เกี่ยวข้องกับโครงการวิจัยดังนี้

ชื่อโครงการวิจัย : ความเข้ากันได้ทางชีวภาพระหว่างไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกที่มีการพอลิเมอไรเซชันจากการบ่มด้วยแสงสีฟ้าและเซลล์ไฟโบรบลาสต์แอล 929

ชื่อหัวหน้าโครงการ : รองศาสตราจารย์ ดร.ทันตแพทย์สรสสินท์ รังสิยานนท์

หน่วยงานต้นสังกัด : คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

หมายเลขรหัสโครงการ : SWUEC- 479/2563X

เอกสารที่เสนอ : รายงานส่วนแก้ไขเพิ่มเติมโครงการวิจัย ฉบับลงวันที่ 27 กันยายน 2564

วันที่ประชุม : 17 พฤศจิกายน 2564 การประชุมครั้งที่ : 11/2564

ผลการพิจารณา : รับรอง

วันที่รับรอง : 10 พฤศจิกายน 2564

ข้อเสนอแนะ:  
- โปรดปฏิบัติตามแนวปฏิบัติการดำเนินงานโครงการวิจัยในมนุษย์ช่วงที่มีการระบาดของโรคติดเชื้อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ใหม่ 2019 (COVID-19)

ตอบรับโดย : คณะกรรมการจริยธรรมสำหรับพิจารณาโครงการวิจัยที่ทำในมนุษย์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

คณะกรรมการจริยธรรมสำหรับพิจารณาโครงการวิจัยที่ทำในมนุษย์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ดำเนินการให้การรับรองโครงการวิจัยตามแนวทางหลักจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ที่มีความสอดคล้องกับหลักจริยธรรมสากล ได้แก่ The Declaration of Helsinki, The Belmont report, CIOMS Guidelines และ The international Conference on Harmonization in Good Clinical Practice (ICH-GCP) ตลอดจนกฎหมาย ข้อบังคับและข้อกำหนดภายในประเทศ

(ลงชื่อ).....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ทันตแพทย์หญิงณปกา เอี่ยมจตุรกุล)

กรรมการและเลขานุการคณะกรรมการจริยธรรมสำหรับพิจารณาโครงการวิจัยที่ทำในมนุษย์

(ลงชื่อ).....

(แพทย์หญิงสุรีพร ภัทรสุวรรณ)

ประธานคณะกรรมการจริยธรรมสำหรับพิจารณาโครงการวิจัยที่ทำในมนุษย์

1759

วันที่: 17/11/2564

ภาพประกอบ 22 เอกสารรับรองจริยธรรมโครงการวิจัยที่ทำในมนุษย์ จากคณะกรรมการจริยธรรมสำหรับพิจารณาโครงการวิจัยที่ทำในมนุษย์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ หมายเลขรหัสโครงการ

SWUEC-479/2563X



## ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	ธนกันต์ จิวะเจริญ
วัน เดือน ปี เกิด	17 กันยายน 2536
สถานที่เกิด	กรุงเทพมหานคร
วุฒิการศึกษา	พ.ศ. 2561 ปริญญาตรี ทันตแพทยศาสตรบัณฑิต (ท.บ.) (เกียรตินิยมอันดับ 2) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย พ.ศ. 2564 กำลังศึกษาระดับปริญญาโท วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (วท.ม.) มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ที่อยู่ปัจจุบัน	39/237 ซ.ประชาอุทิศ 91 ถ.ประชาอุทิศ แขวงทุ่งครุ เขตทุ่งครุ กรุงเทพมหานคร 10140
รางวัลที่ได้รับ	พ.ศ. 2553 - รางวัลรองชนะเลิศอันดับ 1 การแข่งขันคณิตศาสตร์ วิทยาศาสตร์และ คอมพิวเตอร์ระหว่างโรงเรียน (SGAT) ครั้งที่ 9 สาขาวิชาชีววิทยา ณ โรงเรียนเตรียมอุดมศึกษา - รางวัลชนะเลิศ การแข่งขันตอบปัญหาทางคณิตศาสตร์และ วิทยาศาสตร์ระดับมัธยมศึกษา (TUMSCO) ครั้งที่ 10 สาขาชีววิทยา ณ โรงเรียนเซนต์คาเบรียล - รางวัลชนะเลิศ โล่พระราชทาน ศ.ดร. สมเด็จพระเจ้าลูกเธอเจ้าฟ้าจุฬา ภรณ์วลัยลักษณ์ อัครราชกุมารี ณ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล - รางวัลชนะเลิศ การแข่งขันตอบปัญหาความรู้พื้นฐานทางการแพทย์ (SI QUIZ) ณ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล - รางวัลรองชนะเลิศอันดับ 1 การแข่งขันตอบปัญหาวิชาการชีววิทยาและ วิทยาศาสตร์การแพทย์ ณ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย - เหรียญเงินการแข่งขันชีววิทยาโอลิมปิกระดับชาติ ครั้งที่ 7



พ.ศ. 2554

- เหรียญเงินการแข่งขันกีฬาวินัยโอลิมปิกระดับชาติ ครั้งที่ 8

