



การพัฒนาไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกที่มีการพอลิเมอไรเซชันโดยแสงสีฟ้าที่ผสมกับ
ไฟโบรบลาสต์โกรทแฟคเตอร์ 2

THE DEVELOPMENT OF HYALURONIC ACID-BASED HYDROGEL POLYMERIZED BY
BLUE LIGHT INCORPORATED WITH FIBROBLAST GROWTH FACTOR – 2 (FGF-2)

พลอยรุ่ง ดนัยคุษฏีกุล

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

2567

การพัฒนาไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกที่มีการพอลิเมอไรเซชันโดยแสงสีฟ้าที่ผสมกับ
ไฟโบรบลาสต์โกรทแฟคเตอร์ 2



ปริญญานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาการช่องปากและแม็กซิลโลเฟเชียล
คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ปีการศึกษา 2567
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

THE DEVELOPMENT OF HYALURONIC ACID-BASED HYDROGEL POLYMERIZED BY
BLUE LIGHT INCORPORATED WITH FIBROBLAST GROWTH FACTOR – 2 (FGF-2)



PLOYRUNG DANAIUSSADEEKUL

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of MASTER OF SCIENCE
(Master of Science Program in Oral and Maxillofacial Sciences)
Faculty of Dentistry, Srinakharinwirot University

2024

Copyright of Srinakharinwirot University

ปริญญานิพนธ์
เรื่อง
การพัฒนาไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกที่มีการพอลิเมอไรเซชันโดยแสงสีฟ้าที่ผสมกับ
ไฟโบรบลาสต์โกรทแฟคเตอร์ 2
ของ
พลอยรุ่ง ดนัยดุษฎีกุล

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาการช่องปากและแม็กซิลโลเฟเชียล
ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ฉัตรชัย เอกปัญญาสกุล)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์

..... ที่ปรึกษาหลัก	 ประธาน
(รองศาสตราจารย์ ดร.สรสัณห์ รังสิยานนท์)	(รองศาสตราจารย์ ดร.นันทา สารขวนะกิจ)
..... ที่ปรึกษาร่วม	 กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.นันทา ธเนศวร)	(รองศาสตราจารย์ ดร.ภัทราวุธ แต่บรรพกุล)
..... ที่ปรึกษาร่วม	
(รองศาสตราจารย์ ดร.จิตติมา ลัคนากุล)	

ชื่อเรื่อง	การพัฒนาไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกที่มีการพอลิเมอไรเซชันโดยแสงสีฟ้าที่มีส่วนผสมของไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์ 2
ผู้วิจัย	พลอยรุ่ง ดนัยดุชะฎีกุล
ปริญญา	วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต
ปีการศึกษา	2567
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. สรสิทธิ์ รัชสิยานนท์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร. นิรดา ธเนศวร
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร. จิตติมา ลัคนากุล

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกที่พอลิเมอไรเซชันโดยแสงสีฟ้าที่มีส่วนผสมของไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์ 2 ให้เป็นโครงร่างทางชีวภาพที่เหมาะสมสำหรับงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อ โดยการทดลองแบ่งเป็น 2 ส่วน ในส่วนแรกได้ศึกษาผลของไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์ 2 ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกันต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์แอล 929 และเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเอ็นยัดปริทันต์ในมนุษย์ เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสม ผลการทดลองพบว่าไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์ 2 ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน ไม่พบผลต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไฟโบรบลาสต์แอล 929 แต่ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเอ็นยัดปริทันต์ในมนุษย์พบว่าที่ความเข้มข้น 25, 100 และ 200 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ส่งผลให้เซลล์มีการเพิ่มจำนวนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ 48 ชั่วโมงของการทดลอง ($p < 0.05$) การทดลองตอนที่สอง ศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพของไฮโดรเจลที่ผสมไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์ 2 ซึ่งได้แก่ โครงสร้าง การสลายตัว การพองตัว และรูปแบบการปลดปล่อยไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์ 2 เมื่อนำไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์ 2 มาผสมในไฮโดรเจลที่สังเคราะห์ไว้ พบว่าคุณสมบัติทางกายภาพของกลุ่มที่ผสมและไม่ผสมโกรทแฟกเตอร์ไม่แตกต่างกัน จึงสรุปได้ว่าการเติมโกรทแฟกเตอร์ไม่ได้ส่งผลต่อคุณสมบัติทางกายภาพของไฮโดรเจล นอกจากนี้รูปแบบการปลดปล่อยไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์ 2 มีลักษณะการปลดปล่อยอย่างรวดเร็วในช่วง 30 นาทีแรก หลังจากนั้นมีการปลดปล่อยอย่างต่อเนื่อง ในอัตราที่ช้าลงอย่างคงที่ในช่วง 30 ถึง 120 นาที แต่ยังคงมีการปล่อยสารออกมาเรื่อยๆ ตลอดระยะเวลา 72 ชั่วโมงของการทดลอง ความรู้ที่ได้จากการวิจัยนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการพัฒนาไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกที่พอลิเมอไรเซชันโดยแสงสีฟ้าที่มีส่วนผสมของไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์ 2 เพื่อใช้งานวิศวกรรมเนื้อเยื่อในอนาคตต่อไป

คำสำคัญ : ไฮโดรเจล , กรดไฮยาลูโรนิก , ไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์ 2, เซลล์ไฟโบรบลาสต์แอล 929, เซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเอ็นยัดปริทันต์ในมนุษย์

Title	THE DEVELOPMENT OF HYALURONIC ACID-BASED HYDROGEL POLYMERIZED BY BLUE LIGHT INCORPORATED WITH FIBROBLAST GROWTH FACTOR – 2 (FGF-2)
Author	PLOYRUNG DANAIDUSSADEEKUL
Degree	MASTER OF SCIENCE
Academic Year	2024
Thesis Advisor	Associate Professor Dr. Sorasun Rungsiyanonte
Co Advisor	Associate Professor Dr. Nirada Dhanesuan
Co Advisor	Associate Professor Dr. Jittima Luckanagul

This research aimed to develop a hyaluronic acid-based hydrogel polymerized by blue light incorporated with fibroblast growth factor 2 (FGF-2) as a suitable biological scaffold for tissue engineering applications. The study was divided into two parts. In the first part, the effect of different concentrations of FGF-2 on L929 fibroblast cells and human periodontal ligament fibroblast (hPDLF) cells was investigated to determine the optimal concentration. The results showed that different concentrations of FGF-2 had no effect on the proliferation of L929 fibroblast cells. However, for human periodontal ligament fibroblast cells, concentrations of 25, 100, and 200 ng/mL significantly promoted cell proliferation at 48 hours of the experiment ($p < 0.05$). The second part of the experiment focused on the physical properties of the FGF-2-loaded hydrogels, including their structure, degradation, swelling, and release profile of FGF-2. When FGF-2 was incorporated into the synthesized hydrogels, no significant differences were observed in the physical properties between the FGF-2-loaded and unloaded groups. This suggests that the addition of FGF-2 does not affect the hydrogel's physical characteristics. Furthermore, the release profile of FGF-2 exhibited a burst release within the first 30 minutes, followed by a continuous, slower, and steady release from 30 to 120 minutes, with sustained release observed throughout the 72-hour experimental period. The knowledge gained from this research can be applied to the future development of a hyaluronic acid-based hydrogel polymerized by blue light for tissue engineering applications.

Keyword : Hydrogel, Hyaluronic acid, Fibroblast Growth Factor 2 (FGF-2), L929 Fibroblast Cells, Human Periodontal Ligament Fibroblast Cells

กิตติกรรมประกาศ

การจัดทำปริญญานิพนธ์ครั้งนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความช่วยเหลือจาก รศ. ดร.ทพ.สรสัณห์ รังสิยานนท์ อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก รศ. ดร.ทพญ.นิรดา ธเนศวร และ รศ. ดร.ภญ.จิตติมา ลัคนากุล อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่ได้ให้คำปรึกษา ช่วยเหลือชี้แนะ รวมถึงแก้ไขข้อบกพร่อง ให้กำลังใจ และคอยผลักดันในการทำปริญญานิพนธ์ฉบับนี้จนสมบูรณ์ อีกทั้งคณาจารย์ภาควิชาศัลยศาสตร์และเวชศาสตร์ช่องปากทุกท่านที่คอยให้ความรู้และคำแนะนำตลอดการศึกษาในมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒแห่งนี้

ขอขอบพระคุณ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่ได้เอื้อเฟื้อสถานที่ รวมถึงวัสดุ เครื่องมือในการศึกษาวิจัย และขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการทุกท่านรวมถึงนิสิตบัณฑิตศึกษาคณะเภสัชศาสตร์ทุกท่าน โดยเฉพาะอย่างยิ่ง นางสาวศิริกุล ธรรมเนียม และ นายศิริพงศ์ ตั้งประเสริฐกิจ ที่คอยช่วยเหลือแนะนำ ให้คำปรึกษาจนการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณทุนอุดหนุนการวิจัยจากโรงพยาบาลทันตกรรม คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่ให้การสนับสนุน ทำให้งานวิจัยในครั้งนี้สำเร็จลุล่วงได้

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณครอบครัวและเพื่อน รุ่นพี่รุ่นน้องนิสิตหลักสูตรวิทยาการช่องปาก และแม็กซิลโลเฟเชียลทุกท่าน ที่ให้กำลังใจและสนับสนุนเสมอมา

พลอยรุ่ง ดนัยดุษฎีกุล

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญรูปภาพ	ฉ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ภูมิหลัง	1
ความมุ่งหมายของงานวิจัย.....	4
ความสำคัญของงานวิจัย	4
ขอบเขตงานวิจัย	5
ตัวแปรที่ศึกษา	5
นิยามศัพท์เฉพาะ	5
กรอบแนวคิดวิจัย.....	6
สมมติฐานในการวิจัย.....	7
บทที่ 2 เอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	8
การหายของแผล (Wound healing).....	8
1.ระยะการแข็งตัวของเลือดและกลไกการห้ามเลือด (Coagulation and hemostasis phase)	8
2.ระยะอักเสบของแผล (Inflammatory phase).....	9
3.ระยะการเพิ่มจำนวน (Proliferation phase).....	9

4.ระยะปรับโครงสร้าง (Remodeling phase).....	11
การหายของแผลถอนฟัน (Healing of extraction socket)	11
วิศวกรรมเนื้อเยื่อ (Tissue engineering)	12
ไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิก (Hyaluronic acid based hydrogel).....	15
การครอสลิงค์ (Crosslinking)	17
การครอสลิงค์จากการบ่มตัวโดยแสง (Photo crosslink)	18
เซลล์ไฟโบรบลาสต์ (Fibroblast cell)	18
เซลล์ไฟโบรบลาสต์ 929 (Fibroblast L929 cells)	20
เซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเอ็นยึดปริทันต์ในมนุษย์ (Human Periodontal Ligament Fibroblast cells ; hPDLF)	20
โกรทแฟคเตอร์ (Growth factor)	21
ไฟโบรบลาสต์โกรทแฟคเตอร์ (Fibroblast growth factors).....	23
ไฟโบรบลาสต์โกรทแฟคเตอร์ 2 (Fibroblast growth factor-2; FGF-2)	23
ไฟโบรบลาสต์โกรทแฟคเตอร์ 2 จากพืช (Plant produced Fibroblast growth factor-2; Plant produced FGF-2)	25
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	27
1.การกำหนดกลุ่มตัวอย่าง	27
2.ขั้นตอนการทดลอง.....	28
2.1.การทดสอบหาค่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของไฟโบรบลาสต์โกรทแฟคเตอร์ 2 ต่อเซลล์ ไฟโบรบลาสต์แอล 929 และเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเอ็นยึดปริทันต์ในมนุษย์	28
2.2.การสังเคราะห์ไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกที่มีการพอลิเมอไรเซชันโดยแสงสีฟ้า ...	28
2.3.การศึกษาระยะเวลาในการก่อตัวเป็นเจลของไฮโดรเจล	31
2.4.ทำไฮโดรเจลให้แข็ง	32
2.5.การศึกษาการพองตัวของไฮโดรเจล	32

2.6.การศึกษาการสลายตัวของไฮโดรเจล	33
2.7.ศึกษารูปแบบการปลดปล่อยของไฟโบริบลาสต์โกรทแฟคเตอร์ 2	34
2.8.การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายในโครงสร้างของไฮโดรเจล	34
3.การเก็บรวบรวมข้อมูล	34
4.สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล	35
บทที่ 4 ผลการวิจัย	36
ตอนที่ 1 การทดสอบความมีชีวิตของเซลล์ด้วยวิธีเอ็มทีที (MTT assay)	36
1.1.ผลการทดสอบความมีชีวิตของเซลล์ไฟโบริบลาสต์แอล 929 ด้วยวิธีเอ็มทีที	36
1.2.ผลการทดสอบความมีชีวิตของเซลล์ไฟโบริบลาสต์ของเอ็นยัดปริทันต์ในมนุษย์ด้วยวิธีเอ็มทีที (MTT assay)	37
ตอนที่ 2 ผลการสังเคราะห์ไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกที่มีการพอลิเมอไรเซชันโดยแสงสีฟ้า	38
ตอนที่ 3 ระยะเวลาในการก่อตัวเป็นเจลของไฮโดรเจล	39
ตอนที่ 4 ผลการทดสอบการพองตัวของไฮโดรเจล	39
ตอนที่ 5 ผลการสลายตัวของไฮโดรเจล	41
ตอนที่ 6 ผลรูปแบบการปลดปล่อยโกรทแฟคเตอร์ในไฮโดรเจล	42
ตอนที่ 7 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาในโครงสร้างของไฮโดรเจล	43
ภาพส่วนพื้นผิว	44
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผลและข้อเสนอแนะ	46
สรุปผลการศึกษาวิจัย	46
อภิปรายผล	46
ข้อเสนอแนะในการทำวิจัยครั้งต่อไป	55
บรรณานุกรม	56
ภาคผนวก	66

แผนการดำเนินงาน	67
ค่า degree of modification ของไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกที่ถูกเมทาคริลิต	68
หนังสือรับรองจริยธรรมการวิจัย	71
ประวัติผู้เขียน.....	72



สารบัญตาราง

หน้า

ตาราง 1 กราฟแฟคเตอร์ที่เกี่ยวข้องกับการหายของกระดูก.....	21
ตาราง 2 แสดงค่าดูดกลืนแสงที่วัดได้จากสารละลายไฮยาโลโรนิก 100 ยูนิตในกลุ่มที่ผสมและ ไม่มีกราฟแฟคเตอร์.....	41



สารบัญรูปภาพ

หน้า

ภาพประกอบ 1 กรอบแนวคิดวิจัย	6
ภาพประกอบ 2 ระยะการหายของแผลหลังถอนฟัน	12
ภาพประกอบ 3 องค์ประกอบของวิศวกรรมเนื้อเยื่อ ประกอบด้วย เซลล์ สารส่งสัญญาณและโครงร่างวัสดุทางชีวภาพ	13
ภาพประกอบ 4 กราฟแสดงผลของการทำโปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโคปีของไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกที่ถูกเมทาคริเลต	30
ภาพประกอบ 5 ขั้นตอนการสังเคราะห์ไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกที่ถูกเมทาคริเลต (MeHA hydrogel)	31
ภาพประกอบ 6 แผนภูมิแสดงค่าดูดกลืนแสงของเซลล์ไฟโบรบลาสต์แอล 929 ที่มีความเข้มข้นของไฟโบรบลาสต์โกรทแฟคเตอร์ 2 ที่แตกต่างกันใน 48 ชั่วโมง	37
ภาพประกอบ 7 แผนภูมิแสดงค่าดูดกลืนแสงของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเอ็นยัดปริทันต์ในมนุษย์ที่มีความเข้มข้นของไฟโบรบลาสต์โกรทแฟคเตอร์ 2 ที่แตกต่างกันใน 48 ชั่วโมง เมื่อ * หมายถึงแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)	38
ภาพประกอบ 8 แสดงตัวอย่างผลที่ได้จากการวัดปริมาณการเกิดการปรับปรุงโครงสร้างด้วยวิธีโปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโคปีในการสังเคราะห์ไฮโดรเจล	38
ภาพประกอบ 9 แสดงผลการทดสอบการก่อตัวเป็นเจลในแต่ละช่วงเวลา (ก) บ่มโดยแสงสีฟ้า 30 วินาที (ข) บ่มโดยแสงสีฟ้า 60 วินาที (ค) บ่มโดยแสงสีฟ้า 90 วินาที (ง) บ่มโดยแสงสีฟ้า 120 วินาที	39
ภาพประกอบ 10 แสดงสัดส่วนการพองตัวของไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกที่ถูกเมทาคริเลตตามช่วงระยะเวลาที่ชั่งน้ำหนักหลังแช่ PBS ในหน่วยชั่วโมง	40
ภาพประกอบ 11 แสดงปริมาณน้ำ, อัตราส่วนการพองตัวเชิงมวลและอัตราส่วนการพองตัวเชิงปริมาตรของไฮโดรเจล	41

ภาพประกอบ 12 รูปแบบการสลายตัวของไฮโดรเจลโดยคำนวณเป็น ค่าร้อยละปริมาณกรดยูโรนิกที่ปล่อยออกมา.....	42
ภาพประกอบ 13 รูปแบบการปลดปล่อยโกรทแฟคเตอร์ของไฮโดรเจลแสดงเป็น ค่าปริมาณสะสมของไฟโบรบลาสต์โกรทแฟคเตอร์ 2 ใน 72 ชั่วโมง.....	43
ภาพประกอบ 14 แสดงตัวอย่างการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางรูพรุนของไฮโดรเจลด้วยโปรแกรม ImageJ.....	43
ภาพประกอบ 15 ภาพส่วนพื้นผิว กลุ่มที่ผสมโกรทแฟคเตอร์ (ก) กำลังขยาย 100 เท่า (surface 100X) (ข) กำลังขยาย 500 เท่า (surface 500X).....	44
ภาพประกอบ 16 ภาพส่วนพื้นผิว กลุ่มที่ไม่ผสมโกรทแฟคเตอร์ (ค) กำลังขยาย 100 เท่า (surface 100X) (ง) กำลังขยาย 500 เท่า (surface 500X).....	44
ภาพประกอบ 17 ภาพตัดขวางกลุ่มที่ผสมโกรทแฟคเตอร์ (ก) กำลังขยาย 200 เท่า (internal cross section 200X) (ข) กำลังขยาย 500 เท่า (internal cross section 500X).....	45
ภาพประกอบ 18 ภาพตัดขวางกลุ่มที่ไม่ผสมโกรทแฟคเตอร์ (ค) กำลังขยาย 200 เท่า (internal cross section 200X) (ง) กำลังขยาย 500 เท่า (internal cross section 500X).....	45

บทที่ 1

บทนำ

ภูมิหลัง

ในปัจจุบันมนุษย์เราพบกับปัญหาการสูญเสียเนื้อเยื่อและอวัยวะจากการเป็นโรค การบาดเจ็บ หรือความผิดปกติตั้งแต่กำเนิด จึงได้มีความพยายามในการนำเทคโนโลยีและความรู้ทางด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อมาใช้ศึกษาและแก้ปัญหาที่เกิดขึ้น งานวิศวกรรมเนื้อเยื่อเป็นการผนวกความรู้ในสาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพและวิศวกรรมเพื่อการพัฒนาสารทดแทนทางชีวภาพ (Biomaterial) เพื่อฟื้นฟู รักษาและพัฒนาการทำงานของเนื้อเยื่อ^(1, 2) โดยส่วนประกอบหลัก ได้แก่ 1. เซลล์ 2. สารส่งสัญญาณ ได้แก่ โกรทแฟคเตอร์ 3. โครงร่างชีวภาพหรือสแคฟโฟลด์ (Scaffold) ได้มีการนำวิศวกรรมเนื้อเยื่อมาใช้รักษาทั้งในเนื้อเยื่ออ่อนและเนื้อเยื่อแข็ง เช่น โรคข้อต่อขากรรไกร ซึ่งเป็นบริเวณที่รักษาได้ยากเนื่องจากมีเลือดมาเลี้ยงน้อย โรคดังกล่าวส่งผลให้ผู้ป่วยมีปัญหาในการรับประทานอาหาร การพูด จึงมีการทดลองในสัตว์ทดลองโดยนำเซลล์กระดูกอ่อนจากบริเวณอื่นของร่างกาย ไปกระตุ้นให้เกิดการสร้างและเพิ่มจำนวนของเซลล์ จากนั้นจึงปลูกถ่ายบริเวณข้อต่อขากรรไกร เพื่อให้มีการสร้างเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนมาทดแทน^(3, 4)

ในส่วนของขั้นตอนการพบปัญหาเกี่ยวกับการสูญเสียฟัน ส่งผลให้เกิดการละลายตัวของกระดูกหลังการถอนฟัน จึงได้นำงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อเข้ามาประยุกต์ใช้ในการรักษาการสูญเสียเนื้อเยื่อของกระดูกหลังถอนฟันเพื่อช่วยให้มีกระดูกเพียงพอในการฝังรากเทียม โดยมีการนำกระดูกของผู้ป่วยเอง (Autograft) มาปลูกในบริเวณที่เคยได้รับการถอนฟันซึ่งเป็นวัสดุที่ดีที่สุด เพราะมีคุณสมบัติทั้งสามารถสร้างกระดูก (Osteogenicity) การเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างกระดูก (Osteoinductivity) และการที่กระดูกใหม่เจริญเข้าไปภายในกระดูกที่นำมาปลูกทดแทน (Osteoconductivity) ไม่มีผลในการตอบสนองของภูมิคุ้มกัน แต่ข้อจำกัดของวิธีนี้ คือ บริเวณที่นำกระดูกมาต้องถูกผ่าตัดส่งผลให้ผู้ป่วยมีแผลผ่าตัดเพิ่มเติม หรือรูปร่างและปริมาณกระดูกไม่เพียงพอในการฝังรากเทียม⁽⁵⁾ จึงได้มีการนำวัสดุปลูกถ่ายอื่นๆ มาใช้ทดแทน ได้แก่ การนำกระดูกมนุษย์จากผู้บริจาคที่ถูกนำมาทำให้ปลอดเชื้อก่อนนำมาใช้งาน (Allograft) เช่น เอฟดีบีเอ (Freeze dried bone allograft; FDBA) ดี เอ ฟ ดี บี เอ (Demineralized freeze-dried bone allograft; DFDBA) เป็นต้น ข้อเสียอาจจะมีการต่อต้านเนื่องจากไม่ใช่เนื้อเยื่อของตนเอง หรืออาจมีการแพร่เชื้อของโรคติดต่อได้⁽⁶⁾ ในส่วนของกระดูกจากสิ่งมีชีวิตต่างสายพันธุ์ (Xenograft) ได้แก่ โค สุนัข กระบือหรือปะการัง ที่นำมาใช้ทดแทน และ กระดูกที่มาจากสารที่สังเคราะห์ขึ้น (Alloplastic material) เช่น ไฮดรอกซีอะพาไทต์ (Hydroxyapatite) หรือไตรแคลเซียมฟอสเฟต

(Tricalcium phosphate) เป็นต้น โดยนำมาทดลองใช้แทนกระดูกของตนเอง ซึ่งข้อดีคือผู้ป่วยไม่ต้องมีแผลผ่าตัดเพิ่ม สามารถหาได้ในปริมาณที่มากและมีความคงตัวสูง แต่ก็มีข้อเสียคือมีการสร้างกระดูกช้า ไม่มีคุณสมบัติในการสร้างกระดูกและเหนียวสำหรับการสร้างกระดูก เป็นต้น^(7, 8)

โดยงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูก ในส่วนของโครงร่างชีวภาพนั้นสามารถทำให้เกิดการยึดติดและการแบ่งตัวของเซลล์สร้างกระดูกบนพื้นผิวของวัสดุนั้นได้ โดยโครงร่างทางชีวภาพในอุดมคติต้องสามารถเข้ากับเนื้อเยื่อมนุษย์ และสลายตัวเพื่อให้กระดูกใหม่สามารถแทนที่ได้ ต้องมีคุณสมบัติทางกายภาพที่เหมาะสมเพื่อให้เซลล์สามารถเข้าไปอยู่และสร้างหลอดเลือดใหม่ได้ รวมถึงการมีความสามารถในการควบคุมการส่งสารต่างๆ หรือยา⁽⁹⁾ ในส่วนของโครงร่างชีวภาพหรือระบบนำส่งสารมีการทดสอบและพัฒนามาจากวัสดุหลากหลายชนิด ทั้งจากสารธรรมชาติและการสังเคราะห์ขึ้นมา โดยไฮโดรเจล (Hydrogel) เป็นโครงร่างสามมิติก่อตัวเป็นเจลสามารถกักเก็บน้ำได้ดีและขึ้นรูปได้หลายรูปแบบ มีความเข้ากันได้กับเนื้อเยื่อมีความคล้ายคลึงกับสารเมทริกซ์นอกเซลล์ (Extracellular matrix; ECM) มีรูพรุน (Porous)⁽¹⁰⁾ ซึ่งไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกมีคุณสมบัติความเข้ากันได้กับเนื้อเยื่อ มีความสามารถในการสลายตัวและยังสามารถปรับแต่งได้ทางเคมี จึงเป็นระบบนำส่งสารชนิดหนึ่งที่ได้รับคามสนใจนำมาใช้ทางวิศวกรรมเนื้อเยื่อ แต่ก็ยังมีข้อจำกัดบางประการ อาทิ คุณสมบัติทางกายภาพ และการสลายตัวที่ค่อนข้างเร็ว⁽¹¹⁾ อีกทั้งมีการศึกษาพบว่าในการสังเคราะห์ไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกยังมีข้อจำกัด คือ ปริมาณการเกิดพอลิเมอร์ไรเซชัน (Degree of modification) ระยะเวลาในการก่อตัวเป็นเจล (Gelation time) ที่ยังไม่สามารถควบคุมได้^(12, 13) ซึ่งได้รับการพัฒนาเพื่อแก้ไขข้อจำกัดนั้นโดยได้ทำการปรับปรุงและพัฒนาให้ไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกสามารถมีการพอลิเมอร์ไรเซชันโดยแสงสีฟ้า (Blue light activated MeHA hydrogel; BL MeHA hydrogel) เพื่อควบคุมเวลาในการก่อตัวเป็นเจล ผลการศึกษาพบว่าระยะเวลาที่ใช้น้ำที่ 90 วินาทีจะทำให้ได้โครงสร้างที่มีคุณสมบัติทางกายภาพที่ดี มีการพองตัวที่ดีและมีขนาดรูพรุนที่เหมาะสม⁽¹⁴⁾ ต่อมาการศึกษาความเข้ากันได้ทางชีวภาพของไฟโบรบลาสต์แอล 929 กับไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกที่มีการพอลิเมอร์ไรเซชันโดยแสงสีฟ้า⁽¹⁵⁾ รวมถึงมีการทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพของเซลล์ออสติโอเบลาสต์จากหนูกับไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกที่มีการพอลิเมอร์ไรเซชันโดยแสงสีฟ้า⁽¹⁶⁾ โดยผลการศึกษาพบว่ามีความเข้ากันได้ทางชีวภาพของทั้งไฟโบรบลาสต์แอล 929 และออสติโอเบลาสต์จากหนู แม้โครงร่างชนิดนี้ไม่มีผลในแง่ลบกับเซลล์ แต่อาจไม่สามารถทำนายได้ว่าไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกที่มีการพอลิเมอร์ไรเซชันโดยแสงสีฟ้าเป็นวัสดุโครงร่างที่เหมาะสมในการใช้งานทางคลินิก

ในด้านของสารสื่อสัญญาณนั้น มีการศึกษาและทดลองโกรทแฟคเตอร์กับระบบขนส่งต่างๆ ซึ่งโกรทแฟคเตอร์นั้นมีหลายชนิดที่เกี่ยวข้องกับการฟื้นฟูของเนื้อเยื่อกระดูก เช่น ไฟโบรบลาสต์โกรทแฟคเตอร์ (Fibroblast growth factors; FGFs), วีสคิวโล endothelial growth factors; VEGFs), ไนโรไลน (Insulin-like growth factors; IGFs), ทีจีเอฟ เบต้า (Transforming growth factors; TGFs- β) , พีดจีเอฟ (Platelet-derived growth factors; PDGFs) และโกรทแฟคเตอร์ชนิดบีเอ็มพี (Bone morphogenetic proteins; BMPs)⁽⁹⁾ จากการทบทวนวรรณกรรมพบว่าไฟโบรบลาสต์โกรทแฟคเตอร์ 2 (FGF-2) ได้รับความสนใจและศึกษาในงานฟื้นฟูของเนื้อเยื่อกระดูกเนื่องจากเป็นตัวกระตุ้นทำให้เกิดการหายของแผล การแบ่งตัวและการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์จำเพาะ โดยออกฤทธิ์ทั้งในกระบวนการสร้างหลอดเลือดและการสร้างกระดูก^(17, 18) มีการทดลองโดยนำไฮโดรเจลพอลิเมอร์ที่มีส่วนผสมของไฟโบรบลาสต์โกรทแฟคเตอร์ 2 ศึกษาการปลดปล่อยของโกรทแฟคเตอร์ในห้องปฏิบัติการซึ่งวิเคราะห์จากวิธีอีไลซา (Enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA) จากนั้นมีการนำวัสดุโครงร่างชีวภาพชนิดนี้ไปฝังในสัตว์ทดลอง คือ กระต่าย ผลพบว่าไฟโบรบลาสต์โกรทแฟคเตอร์ 2 กระตุ้นให้เกิดการสร้างปริมาณกระดูกมากขึ้นในช่วงสองเดือนแรกและภายหลังจากสองเดือนจะพบว่าผลของไฟโบรบลาสต์โกรทแฟคเตอร์ 2 ได้หายไป⁽¹⁹⁾ มีการศึกษาในประเทศญี่ปุ่นที่มีลักษณะคล้ายกันแต่ทดสอบกับวัสดุโครงร่างชีวภาพชนิดคอลลาเจนซึ่งมีลักษณะคล้ายเจลกึ่งพองน้ำที่มีส่วนผสมของไฟโบรบลาสต์โกรทแฟคเตอร์ 2 ในปริมาณที่แตกต่างกันได้แก่ 0,3 และ 15 ไมโครกรัม นำวัสดุไปฝังไว้ในบริเวณกะโหลกที่มีความบกพร่องของหนู พบว่ามีการสร้างกระดูกในกลุ่มที่มีส่วนผสมของโกรทแฟคเตอร์มากกว่ากลุ่มที่ไม่มีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ⁽²⁰⁾ นอกจากนี้มีการนำวัสดุโครงร่างชีวภาพชนิดโพลียูรีเทนชนิดน้ำ (Waterborne polyurethane; WPU) ที่มีการใส่ไฟโบรบลาสต์โกรทแฟคเตอร์ 2 มาประยุกต์ใช้เป็นเมมเบรน (Membrane) ในงานปลูกกระดูก (Guided bone regeneration; GBR) โดยทดสอบกับเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์ของหนู (Rat mesenchymal stem cells; rMSCs) ผลพบว่าวัสดุชนิดนี้สามารถปลดปล่อยโกรทแฟคเตอร์ในระดับคงที่ (Sustained Release) และทำให้เซลล์เกิดการยึดเกาะ แบ่งตัว และเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์จำเพาะ อีกทั้งยังกระตุ้นให้เกิดการสร้างหลอดเลือดได้ดีกว่าเมื่อเทียบกับวัสดุที่ไม่มีโกรทแฟคเตอร์⁽²¹⁾

แต่ยังมีข้อจำกัดของการนำโกรทแฟคเตอร์มาใช้เนื่องจากมีราคาที่สูง ส่งผลให้มีการพัฒนาผลิตโกรทแฟคเตอร์ด้วยเทคนิคต่างๆ จากทั้งแบคทีเรีย แมลงและพืช ออกมาเป็นรีคอมบิแนนท์โปรตีน โดยการนำพืชมาผลิตโกรทแฟคเตอร์มีข้อดีคือ มีราคาที่ถูก สามารถผลิตได้จำนวน

มาก นำมาทำให้บริสุทธิ์ได้ง่าย ปราศจากความเสี่ยงในการติดเชื้อจากแบคทีเรียและไวรัส⁽²²⁾ ในปี ค.ศ. 2023 มีการนำเบสิดไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์ที่สกัดจากพืชมาทดสอบกับสเต็มเซลล์ เพื่อขยายจำนวนของเซลล์ โดยที่สเต็มเซลล์ข้างต้นมีลักษณะรูปร่างและการแสดงออกของโปรตีนที่จำเพาะคงเดิม⁽²³⁾ นอกจากนี้มีการศึกษานำโกรทแฟกเตอร์ 2 ที่ผลิตจากพืชและแบคทีเรีย *E. coli* มาทำการทดสอบการแบ่งตัวและเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์จำเพาะของเซลล์เอ็มซีสามที่สามอีกหนึ่ง (MC3T3-E1 cells) พบว่าทั้งสองชนิดสามารถทำให้เซลล์สามารถแบ่งตัวได้ เมื่อนำโกรทแฟกเตอร์ใส่ในฟองน้ำคอลลาเจนที่สามารถดูดซึมมาทดลองพบว่าส่งเสริมการหายของกระดูกในบริเวณที่เสียหายของสัตว์ทดลอง⁽²⁴⁾ จากการศึกษาข้างต้นแสดงถึงประสิทธิภาพและศักยภาพของโกรทแฟกเตอร์ที่ได้จากพืชในการนำมาประยุกต์ใช้ในงานวิจัยได้

ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อโดยทั่วไปมักจะมิตดสอบโครงร่างชีวภาพร่วมกับโกรทแฟกเตอร์ เพื่อดูคุณสมบัติและรูปแบบการปลดปล่อยโกรทแฟกเตอร์ของโครงร่าง จากนั้นจึงนำมาทดสอบกับเซลล์ในห้องปฏิบัติการหรือในสัตว์ทดลองต่อไป ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์ 2 จากพืชต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์แอล 929 และเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเอ็นอีคปริทันต์ในมนุษย์ อีกทั้งคุณสมบัติทางกายภาพ ได้แก่ โครงสร้าง การสลายตัว และรูปแบบการปลดปล่อยโกรทแฟกเตอร์ของไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกที่มีการพอลิเมอไรเซชันโดยแสงสีฟ้าที่ผสมไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์ 2 โดยมุ่งหวังว่าผลจากการศึกษาสามารถนำมาต่อยอดและพัฒนาไฮโดรเจลเพื่อใช้เป็นระบบนำส่งยาสำหรับงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อทางคลินิกได้อย่างเหมาะสม

ความมุ่งหมายของงานวิจัย

ในการวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยได้ตั้งความมุ่งหมายไว้ดังนี้

1. เพื่อศึกษาผลของไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์ 2 ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกันต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์แอล 929 และเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเอ็นอีคปริทันต์ในมนุษย์
2. เพื่อศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพ ได้แก่ โครงสร้าง การพองตัว การสลายตัว และรูปแบบการปลดปล่อยโกรทแฟกเตอร์ของไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกที่มีการพอลิเมอไรเซชันโดยแสงสีฟ้าที่ผสมไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์ 2

ความสำคัญของงานวิจัย

เพื่อนำความรู้ที่ได้จากการศึกษาไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกที่มีการพอลิเมอไรเซชันโดยแสงสีฟ้าที่ผสมไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์ 2 มาพัฒนาไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกที่มี

การพอลิเมอไรเซชันโดยแสงสีฟ้า เพื่อใช้เป็นระบบนำส่งยาสำหรับงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อทางคลินิก ได้อย่างเหมาะสม

ขอบเขตงานวิจัย

การศึกษาวิจัยครั้งนี้เป็นการศึกษาวิจัยพื้นฐานในห้องปฏิบัติการ เพื่อศึกษาผลของไฟโบร بلاสต์โกรทแฟคเตอร์ 2 ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกันต่อเซลล์ไฟโบร بلاสต์แอล 929 และเซลล์ไฟโบร بلاสต์ของเอ็นอีคปริทันต์ในมนุษย์ โดยดูความมีชีวิตของเซลล์ซึ่งใช้วิธีวิเคราะห์เอ็มทีที (MTT assay) เพื่อศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพของไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกที่มีการพอลิเมอไรเซชันโดยแสงสีฟ้าที่ผสมไฟโบร بلاสต์โกรทแฟคเตอร์ 2 โดยศึกษาคุณสมบัติ ได้แก่ โครงสร้าง การสลายตัว และรูปแบบการปลดปล่อยโกรทแฟคเตอร์

ตัวแปรที่ศึกษา

- 1.1. ตัวแปรต้น : ความเข้มข้นของไฟโบร بلاสต์โกรทแฟคเตอร์ 2
- 1.2. ตัวแปรตาม : ความมีชีวิตของเซลล์ไฟโบร بلاสต์แอล 929 และเซลล์ไฟโบร بلاสต์ของเอ็นอีคปริทันต์ในมนุษย์ด้วยวิธีวิเคราะห์เอ็มทีที (MTT assay)
- 1.3. ตัวแปรควบคุม : อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดดีเอ็มอีเอ็ม (Dulbecco's Modified Eagle Medium; DMEM)
- 2.1. ตัวแปรต้น : ไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกที่มีการพอลิเมอไรเซชันโดยแสงสีฟ้าที่ผสมกับไฟโบร بلاสต์โกรทแฟคเตอร์ 2
- 2.2. ตัวแปรตาม : คุณสมบัติทางกายภาพของไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกที่มีการพอลิเมอไรเซชันโดยแสงสีฟ้าที่ผสมไฟโบร بلاสต์โกรทแฟคเตอร์ 2
- 2.3. ตัวแปรควบคุม : ไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกที่มีการพอลิเมอไรเซชันโดยแสงสีฟ้าเป็นระยะเวลา 90 วินาที

นิยามศัพท์เฉพาะ

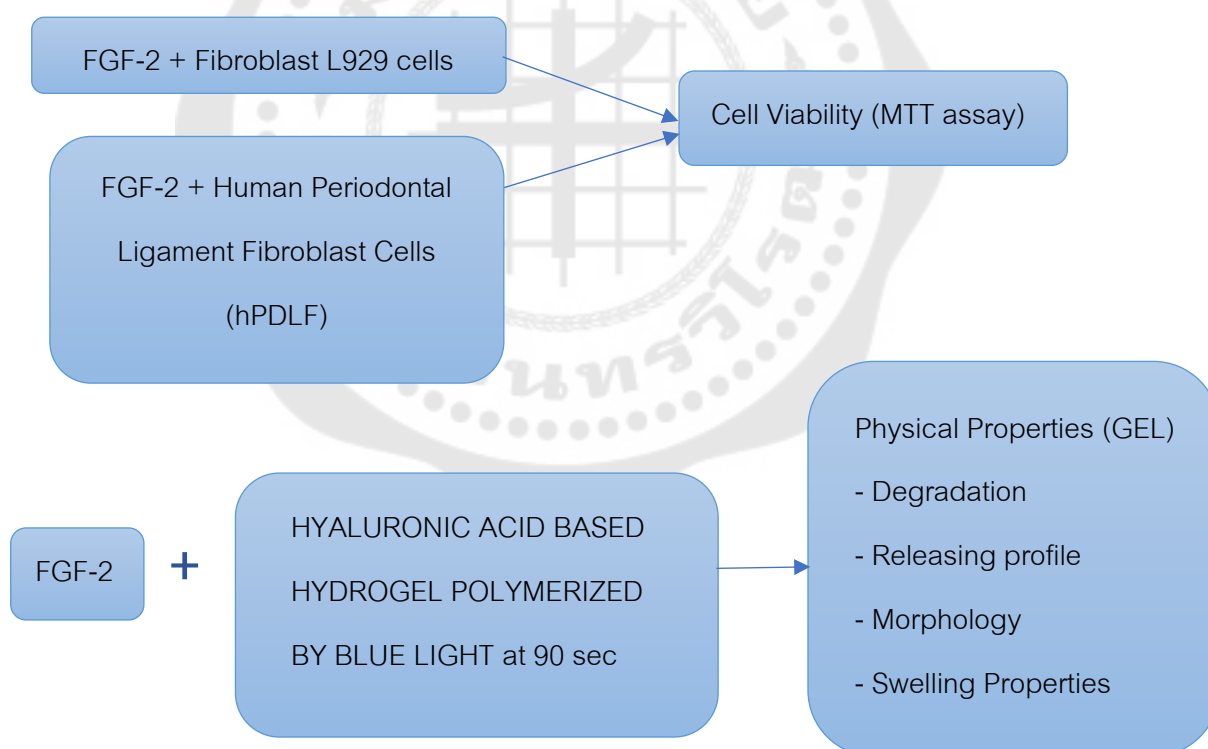
1. ไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกที่มีการพอลิเมอไรเซชันโดยแสงสีฟ้า หมายถึง วัสดุทางชีวภาพที่สามารถย่อยสลายได้ ไฮโดรเจลที่มีส่วนประกอบหลักจากกรดไฮยาลูโรนิกที่ปรับปรุงโครงสร้างด้วยเมทาคริลิตและมีสารกระตุ้นให้เกิดพอลิเมอไรเซชันของพอลิเมอร์ผ่านการครอสลิงค์ (Crosslink) โดยการบ่มแสงสีฟ้า

2. เซลล์ไฟโบรบลาสต์แอล 929 หมายถึง เซลล์ไลน์ไฟโบรบลาสต์ที่ได้จากเนื้อเยื่อเกี่ยวพันใต้ผิวหนังของหนูเพศผู้ อายุ 100 วัน ที่จัดจำหน่ายโดยบริษัทไบโอมีเดียไทยแลนด์ จำกัด ซึ่งเป็นเซลล์ไลน์ไฟโบรบลาสต์ที่ใช้เป็นมาตรฐานในการทดสอบอุปกรณ์การแพทย์ทางห้องปฏิบัติการตามองค์การมาตรฐานสากล (ISO10993-5)

3. เซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเอ็นยึดปริทันต์ในมนุษย์ หมายถึง เซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ได้จากเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่อยู่ระหว่างรากฟันและกระดูกเบ้าฟันของมนุษย์ จัดจำหน่ายโดยบริษัทลอนซา วอคเกอร์สวิลล์ จำกัด

4. ไฟโบรบลาสต์โกรทแฟคเตอร์ 2 หมายถึง Plant-produced basic Fibroblast Growth Factor จากพืช *Nicotiana benthamiana* ที่จัดจำหน่ายโดยบริษัท บีจีเอฟ แพลนท์เทค จำกัด

กรอบแนวคิดวิจัย



ภาพประกอบ 1 กรอบแนวคิดวิจัย

สมมติฐานในการวิจัย

1.1.สมมติฐานหลัก : ไฟโบรบลาสต์โกรทแฟคเตอร์ 2 ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกันส่งผลต่อการมีชีวิตของเซลล์ไฟโบรบลาสต์แอล 929 และเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเอ็นอีบริทันต์ในมนุษย์แตกต่างกัน

1.2.สมมติฐานรอง : ไฟโบรบลาสต์โกรทแฟคเตอร์ 2 ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกันส่งผลต่อการมีชีวิตของเซลล์ไฟโบรบลาสต์แอล 929 และเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเอ็นอีบริทันต์ในมนุษย์ไม่แตกต่างกัน

2.1.สมมติฐานหลัก : คุณสมบัติทางกายภาพของไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกที่มีการพอลิเมอไรเซชันโดยแสงสีฟ้าที่ผสมไฟโบรบลาสต์โกรทแฟคเตอร์ 2 และไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกที่มีการพอลิเมอไรเซชันโดยแสงสีฟ้าไม่มีความแตกต่างกัน

2.2.สมมติฐานรอง : คุณสมบัติทางกายภาพของไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกที่มีการพอลิเมอไรเซชันโดยแสงสีฟ้าที่ผสมไฟโบรบลาสต์โกรทแฟคเตอร์ 2 และไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกที่มีการพอลิเมอไรเซชันโดยแสงสีฟ้ามีความแตกต่างกัน

บทที่ 2

เอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในการวิจัยครั้งนี้ผู้จัดทำได้ทำการศึกษาเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง และได้นำเสนอตามหัวข้อต่อไปนี้

- 1.การหายของแผล (wound healing)
- 2.วิศวกรรมเนื้อเยื่อ (Tissue engineering)
- 3.ไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิก (Hyaluronic acid based hydrogel)
- 4.เซลล์ไฟโบรบลาสต์ (Fibroblast cell)
- 5.โกรทแฟคเตอร์ (Growth factor)

การหายของแผล (Wound healing)

การเกิดบาดแผล เกิดจากการทำลายเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ที่ปกติของร่างกายไม่ว่าส่วนใดเกิดได้จากทั้งปัจจัยภายในและภายนอก เช่น บาดแผลจากตัวโรค อุบัติเหตุ การผ่าตัด เป็นต้น

การหายของแผลเป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นโดยการทำงานร่วมกันของอวัยวะต่างๆ ภายในร่างกายอย่างซับซ้อน โดยเริ่มตั้งแต่เกิดอาการบาดเจ็บทำให้เซลล์ที่อยู่บริเวณแผลและเซลล์อื่นๆ มาทำหน้าที่ให้แผลหายดีด้วยหลายขั้นตอน ซึ่งเกิดได้ในเนื้อเยื่อส่วนใหญ่ของร่างกาย แต่อวัยวะบางส่วนอาจมีการหายของบาดแผลต่างกัน เช่น ตับ กล้ามเนื้อลาย เป็นต้น⁽²⁵⁾ โดยทั่วไปการหายของแผลจะแบ่งได้ 4 ระยะ ได้แก่

1.ระยะการแข็งตัวของเลือดและกลไกการห้ามเลือด (Coagulation and hemostasis phase)

การหายของบาดแผลในขั้นนี้เริ่มตั้งแต่เกิดการบาดเจ็บ ซึ่งเมื่อเลือดออกจะเกิดการแข็งตัวของเลือดเพื่อที่จะป้องกันการบาดเจ็บต่อระบบไหลเวียนเลือด และมีการหลั่งสารต่างๆ เพื่อช่วยในการหายของแผลในขั้นถัดไป ซึ่งการหายของบาดแผลในขั้นนี้จะต้องใช้เซลล์ต่างๆ เช่น เซลล์เยื่อบุผิว (epithelial cell) เกล็ดเลือด มาช่วยในการให้เลือดแข็งตัวและสลายไฟบริน (fibrin) ที่บริเวณแผล⁽²⁶⁾

หลังเลือดออกที่แผลจะเกิดการหดตัวของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบเพื่อช่วยหยุดการเลือดออกจากเส้นเลือดที่บาดเจ็บ และจะมีผลทำให้หลอดเลือดแดงเล็ก (arteriole) ที่บริเวณอื่นเกิดการตอบสนองด้วยการหดตัวของหลอดเลือดด้วยเช่นกัน ต่อมาจะเกิดภาวะออกซิเจนต่ำ (hypoxia) และสภาวะเป็นกรด (acidosis) ที่บริเวณแผล ส่งผลให้เกิดการคลายตัวของผนังหลอดเลือด

เลือด เกิดการเลือดออกและเกิดการสร้างลิ่มเลือด โดยลิ่มเลือดนี้ไม่เพียงแต่ช่วยห้ามเลือดเท่านั้น แต่เป็นโครงสร้างเบื้องต้นสำหรับการเคลื่อนย้ายของเซลล์และกระตุ้นการหลั่งไซโตไคน์และโกรทแฟกเตอร์ต่างๆ นอกจากนี้เกล็ดเลือดยังกระตุ้นการหลั่งสารที่ทำให้เกิดขยายตัวของหลอดเลือด (vasodilation) เพิ่มการซึมผ่านผนังหลอดเลือด (vascular permeability) ส่งผลให้มีสารน้ำรั่วออกมาจากหลอดเลือด นำไปสู่ระยะอักเสบของแผลต่อไป⁽²⁵⁾

2.ระยะอักเสบของแผล (Inflammatory phase)

ร่างกายจะเข้าสู่ระยะอักเสบซึ่งมีวัตถุประสงค์เพื่อกำจัดสิ่งแปลกปลอม เชื้อโรค และเนื้อเยื่อที่ตายแล้วออกจากบริเวณบาดแผล ใช้ระยะเวลาประมาณ 3-5 วัน เมื่อมีการสร้างลิ่มเลือดส่งผลกระทบให้หลั่งสารไซโตไคน์ (cytokines) และโกรทแฟกเตอร์ เช่น พีดีจีเอฟ (platelet-derived growth factor; PDGF) ทีจีเอฟเบต้า (transforming growth factors; TGFs-β) อีจีเอฟ (epidermal growth factor; EGF) ไอจีเอฟ (insulin-like growth factor; IGF) ซึ่งสารเหล่านี้จะช่วยในการหายของแผล โดยการกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิลล์ (Neutrophils) เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดแมคโครฟาจ (Macrophages) เซลล์เยื่อบุผิวและเซลล์ไฟโบรบลาสต์

โดยเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิล (neutrophils) จะเป็นเซลล์กลุ่มแรกที่เดินทางมาถึงและมีบทบาทในการฟาโกไซโตซิส (phagocytosis) หลังจากนั้นมาโครฟาจ (macrophages) จะเข้ามาทำหน้าที่กำจัดซากเซลล์และสิ่งแปลกปลอม⁽²⁷⁾

3.ระยะการเพิ่มจำนวน (Proliferation phase)

เป็นช่วงของการหายของแผลจะเริ่มหลังจากบาดเจ็บ 4-14 วัน เป็นช่วงที่มีหลายกระบวนการเกิดขึ้น ทั้งการสร้างเยื่อบุผิว การสร้างหลอดเลือด สร้างเนื้อเยื่อแกรนูเลชัน (granulation tissue) และการที่คอลลาเจนมาสะสมที่บริเวณแผล ซึ่งเป็นกระบวนการหนึ่งที่สำคัญในการหายของแผล⁽²⁸⁾

การสร้างเยื่อบุผิวใหม่ (Epithelialization) เริ่มจากการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เคอราติโนไซต์ที่ยังเหลืออยู่ที่บริเวณแผลและบริเวณที่ติดกับชั้นหนังแท้ (dermis) การเปลี่ยนแปลงของเซลล์เคอราติโนไซต์ที่บริเวณแผลมีหลายขั้นตอนดังนี้ คือ การติดกันของเซลล์ (detachment) การเคลื่อนที่ของเซลล์ (migration) การเพิ่มจำนวนของเซลล์ (proliferation) การเปลี่ยนแปลงของเซลล์ (differentiation) และการแบ่งชั้นของเซลล์ (stratification) โดยเริ่มจากเซลล์เคอราติโนไซต์เคลื่อนที่ผ่านเส้นใยเอกติน และเซลล์เยื่อบุผิวสร้างอินทีกรินรีเซปเตอร์ (integrin receptor) มาทำงานกับสารอินทีกริน เพื่อช่วยแยกเนื้อเยื่อที่ตายแล้วกับเซลล์ปกติ หลังจากเซลล์เยื่อบุผิวเคลื่อนที่ไปบริเวณแผล จะสร้างตัวกระตุ้นเอนไซม์คอลลาจิเนสหรือเอ็มเอ็มพี 1 (collagenase or Metalloproteinase-1; MMP-1) และพลาสมินोजิน (plasminogen) ซึ่งช่วยในการหายของแผล

และการเกิดแผลจะทำให้เซลล์บริเวณแผลหลั่งสาร เช่น เคอราติโนไซต์โกรทแฟคเตอร์ (keratinocyte growth factor) มาช่วยในการสร้างเยื่อผิวหนังใหม่อีกด้วย^(29, 30)

การสร้างหลอดเลือดใหม่ (Angiogenesis) เกิดหลังจากการบาดเจ็บของเซลล์บริเวณแผล ร่วมกับภาวะขาดออกซิเจน(hypoxia) โดยเซลล์แมคโครฟาจ และเคอราติโนไซต์จะหลั่งสารกระตุ้นให้เกิดหลอดเลือด (angiogenic factor) เช่น ฟีอีจีเอฟ (VEGF) ซึ่งกระตุ้นการเคลื่อนที่ของเซลล์เยื่อบุหลอดเลือด (endothelial cell) และการเพิ่มจำนวนของเซลล์เยื่อบุหลอดเลือด ทำงานร่วมกับสารเมทริกซ์นอกเซลล์ที่มีไฟบริน และไฟโบรเนกตินปริมาณมากจะกระตุ้นให้กลุ่มของเส้นเลือดฝอย (capillary sprout) เคลื่อนที่ผ่านเนื้อเยื่อประสานที่รองรับอยู่ใต้แผ่นเซลล์เนื้อผิว (basement membrane) ด้วยการใช้ไฟโบรเนกติน ซึ่งกลุ่มเส้นเลือดฝอยจะแตกแขนงเพิ่มผ่านการทำงานของไฟโบรบลาสต์โกรทแฟคเตอร์ และฟีอีจีเอฟ⁽²⁵⁾

การสร้างเนื้อเยื่อแกรนูโลชันจะเกิดหลังจากเกิดแผล 3-4 วัน ซึ่งจะไปทดแทนลิ้มเลือดที่สร้างขึ้น เนื้อเยื่อแกรนูโลชันประกอบด้วยสารเมทริกซ์บริเวณชั้นหนังแท้ (dermal matrix) ที่ทำตัวเป็นเครือข่ายให้เซลล์ต่างๆเคลื่อนที่ เกิดจากการทำงานของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ เซลล์นี้จะมาบริเวณแผลในช่วง 2 วันหลังจากเกิดแผลผ่านการทำงานของฟีดีจีเอฟ (PDGF) และอีจีเอฟ (EGF) จากเกล็ดเลือดและแมคโครฟาจ ซึ่งเซลล์ไฟโบรบลาสต์จะสร้างคอลลาเจนไปแทนที่ไฟบริน และไฟโบรเนกติน ซึ่งคอลลาเจนจะช่วยเรื่องการเคลื่อนที่ของเซลล์ การสร้างความแข็งแรงของแผล อีกทั้งการสร้างใหม่ของแผลด้วย

และยังพบการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ เกิดจากการที่เซลล์ไฟโบรบลาสต์ซึ่งเป็นเซลล์ที่เปลี่ยนแปลงมาจากเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์ในเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน และหยุดอยู่ในระยะ G0 ของวัฏจักรของเซลล์ (cell cycle) จะถูกดึงมาที่บริเวณที่เกิดแผลด้วยกระบวนการเคลื่อนที่ด้วยการชักนำของสารเคมี (chemotaxis) จากสารทีจีเอฟเบต้า ($TGF-\beta$) และฟีดีจีเอฟ (PDGF) ที่เกิดจากเกล็ดเลือด และเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดแมคโครฟาจ หรือสารอื่น เช่น ทีเอ็นเอฟแอลฟา ($TNF-\alpha$) มากกระตุ้นการเพิ่มจำนวนและการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ จากนั้นเซลล์ไฟโบรบลาสต์เองจะหลั่งสารไฟโบรบลาสต์โกรทแฟคเตอร์ 2 (FGF-2) เพื่อการเพิ่มจำนวนตัวเองต่อไป⁽²⁹⁾

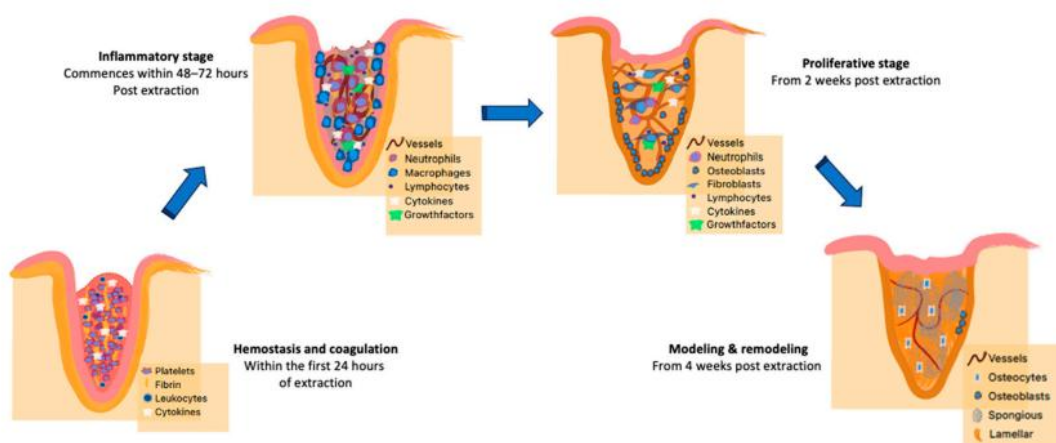
4. ระยะปรับโครงสร้าง (Remodeling phase)

ระยะนี้เป็นช่วงที่สำคัญในการหายของแผล มีการจัดระเบียบและปรับเปลี่ยนโครงสร้างของคอลลาเจนที่สร้างขึ้นใหม่เพื่อเป็นโครงร่างที่แข็งแรง ซึ่งช่วงนี้จะเกิดหลังจากเกิดแผลตั้งแต่ 8 วัน ถึง 1 ปี ต่อจากการระยะที่ผ่านมาที่มีการสร้างคอลลาเจนขึ้นมาอย่างต่อเนื่องมาประมาณ 4-5 สัปดาห์⁽³¹⁾ คอลลาเจนนั้นจะเริ่มสร้างซ้ำลง โดยผลของเอนไซม์คอลลาจิเนสหรือเอ็มเอ็มพี 1 (collagenase or Metalloproteinase-1; MMP-1) มาช่วยทำลายคอลลาเจนส่วนเกิน ร่วมกับการสลายตัวของไกลโคโปรตีน (glycoprotein) และมิวโคพอลิแซ็กคาไรด์ (mucopolysaccharides) จะเกิดการจัดเรียงตัวขนานกับเนื้อเยื่อที่ปกติและหนาตัวขึ้นเพื่อเสริมความแข็งแรง จะต้องใช้เวลามากกว่า 3 เดือนที่แผลจะกลับมามีความแข็งแรงประมาณ 80% ของเนื้อเยื่อเดิม^(28, 29)

การหายของแผลถอนฟัน (Healing of extraction socket)

การถอนฟัน ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อบริเวณนั้น ทั้งเนื้อเยื่อแข็งและอ่อน (Hard and soft tissue) และหลังจากเกิดการบาดเจ็บแล้ว ร่างกายจะเริ่มทำกระบวนการเพื่อให้แผลที่เกิดหลังจากการถอนฟันหาย (socket healing) แบ่งการหายของแผลเป็น 4 ระยะตามที่ได้กล่าวไปข้างต้น

โดยหลังจากถอนฟันจะมีเลือดไหลในกระดูกเบ้าฟัน (socket) มีการรวมตัวกันของเกล็ดเลือดและสร้างลิ่มเลือดขึ้นมา เกิดขึ้นภายใน 24 ชั่วโมงหลังการถอนฟัน เกล็ดเลือดก็จะหลังไซโตไคน์ และโกรทแฟคเตอร์ เช่น ทีจีเอฟ และทีจีเอฟเบต้า กระตุ้นการอักเสบและซ่อมแซมเนื้อเยื่อ ระยะการอักเสบจะเกิดขึ้นภายใน 48-72 ชั่วโมง ซึ่งเซลล์เม็ดเลือดขาว เช่น นิวโทรฟิล แมคโครฟาจ จะมาทำหน้าที่กำจัดสิ่งแปลกปลอมรวมถึงเชื้อโรค ระยะนี้มักมีการตอบสนองคืออาการบวมและปวดเล็กน้อย ต่อมาจะมีการสร้างเนื้อเยื่อแกรนูเลชันโดยการทำงานของเซลล์ไฟโบรบลาสต์และเซลล์บุผนังหลอดเลือด (endothelial cell) มีการสร้างคอลลาเจนและหลอดเลือดใหม่ โดนกระตุ้นด้วยไฟโบรบลาสต์โกรทแฟคเตอร์ 2 และทีจีเอฟเบต้า ซึ่งในระยะนี้เกิดขึ้นภายใน 3-7 วันหลังถอนฟัน จากนั้นประมาณ 2-3 สัปดาห์หลังถอนฟันเนื้อเยื่อแกรนูเลชันจะเริ่มถูกแทนที่ด้วยกระดูกใหม่ที่ยังไม่สมบูรณ์ (woven bone) โดยเริ่มสร้างจากส่วนที่ชิดผนังกระดูกเบ้าฟันก่อน จากนั้นจะมีการปรับเปลี่ยนโครงสร้างของกระดูกจึงกลายเป็นกระดูกชั้นแข็ง (lamellar bone) ในส่วนของกระดูกใช้ระยะเวลาประมาณ 3-6 เดือน ในส่วนของเนื้อเยื่ออ่อนมักจะปกคลุมแผลใช้ระยะเวลาประมาณ 2-4 สัปดาห์ หลังแผลถอนฟันหายระดับเหงือกและกระดูกจะลดต่ำลง^(32, 33) ดังภาพประกอบ 2



ภาพประกอบ 2 ระยะการหายของแผลหลังถอนฟัน

ที่มา : Udeabor SE, Heselich A, Al-Maawi S, Alqahtani AF, Sader R, Ghanaati S.

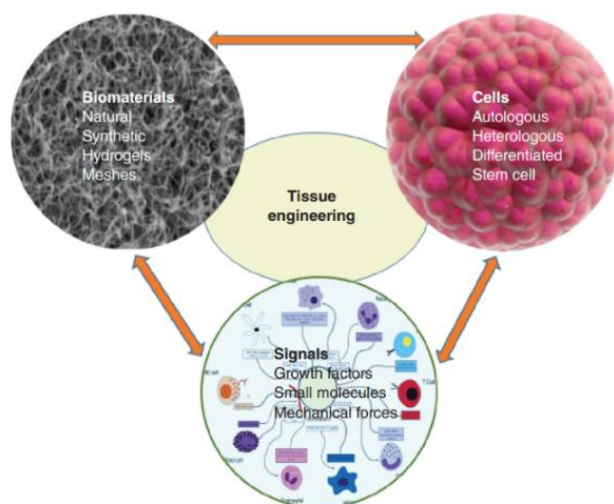
Current knowledge on the healing of the extraction socket: A narrative review. Bioengineering (Basel). 2023;10(10):1245.

วิศวกรรมเนื้อเยื่อ (Tissue engineering)

งานวิศวกรรมเนื้อเยื่อ เป็นการรวมกันของความรู้ด้านวิทยาศาสตร์ชีวภาพและวิศวกรรม เพื่อการพัฒนาสิ่งทดแทนทางชีวภาพเพื่อฟื้นฟู รักษา และพัฒนาการทำงานของเนื้อเยื่อ⁽¹⁾ โดยมีการนำงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อมาประยุกต์ใช้ในงานเวชศาสตร์ฟื้นฟู ด้านเภสัชกรรม การวินิจฉัยโรค การวิจัยเพื่ออธิบายถึงพื้นฐานการทำงานของเซลล์ในสัตว์ทดลอง หรือเพื่อระบุกระบวนการทำงานในการแก่ชราและการกลายเป็นโรค องค์ประกอบของงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อประกอบด้วย 1. เซลล์ 2. สารส่งสัญญาณ ได้แก่ โกรทแฟคเตอร์ 3. โครงร่างชีวภาพหรือสแคฟโฟลด์⁽³⁴⁾ (ภาพประกอบ 3)

กระบวนการทางวิศวกรรมเนื้อเยื่อ เริ่มจากการนำเซลล์ใส่ไปในโครงร่างชีวภาพพร้อมกับการกระตุ้นโดยสารส่งสัญญาณหรือโกรทแฟคเตอร์ที่เหมาะสม เพื่อให้เกิดการเจริญเติบโตและแบ่งตัวของเซลล์แล้วจึงนำไปปลูกถ่ายในบริเวณที่ต้องการซ่อมแซมเนื้อเยื่อ การรวมสามองค์ประกอบเข้าด้วยกันของงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อต้องอาศัยทั้งสามส่วนที่เหมาะสม โดยโครงร่างชีวภาพหรือสแคฟโฟลด์ที่ดี ควรมีคุณสมบัติการเข้ากันได้ทางชีวภาพกับร่างกายได้ดี เพื่อที่จะไม่ให้เกิดการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันบริเวณที่มีการปลูกถ่าย คงอัตราการสลายตัวอย่างเหมาะสมเพื่อให้มีการสร้างเนื้อเยื่อเข้ามาทดแทนได้ มีรูพรุน มีลักษณะคล้ายคลึงกับสภาวะแวดล้อมในเซลล์สิ่งมีชีวิตโดยมีความสามารถในการรับแรงเชิงกล (Mechanical support) สามารถสนับสนุนให้เซลล์ยึดติด แบ่งตัว และเปลี่ยนสภาพ ส่งผลให้เนื้อเยื่อเติบโตได้ นอกจากนี้

โครงร่างต้องช่วยให้เกิดกระบวนการทางเซลล์ได้สะดวก เช่น การแพร่ของสาร การสร้างหลอดเลือด การกำจัดของเสีย เป็นต้น และสุดท้ายมีความเป็นไปได้ในการผลิตให้มีประสิทธิภาพและประหยัด⁽³⁴⁻³⁷⁾



ภาพประกอบ 3 องค์ประกอบของวิศวกรรมเนื้อเยื่อ ประกอบด้วย เซลล์ สารส่งสัญญาณและโครงร่างวัสดุทางชีวภาพ

ที่ ม ๑ : Mhanna R, Hasan A. Introduction to tissue engineering. In: Tissue engineering for artificial organs: regenerative medicine, smart diagnostics and personalized medicine. 2017.p.1-34.

สแคฟโฟลด์อาจสร้างมาจากวัสดุธรรมชาติหรือวัสดุสังเคราะห์ก็ได้ เนื่องจากมีความหลากหลายของวัสดุชีวภาพในการสร้างสแคฟโฟลด์ส่งผลให้เกิดคุณสมบัติที่แตกต่างกันไปด้วย มีข้อดีข้อเสียที่ต่างกัน ในกลุ่มที่มาจากวัสดุธรรมชาติ อาจสร้างมาจากส่วนประกอบของสารเมทริกซ์นอกเซลล์ เช่น คอลลาเจน ไคโตซาน (Chitosan) อีลาสติน (Elastin) ไฟบรินเจน (Fibrinogen) กรดไฮยาลูโรนิก (hyaluronic acid) และใยไหม (Silk) เป็นต้น โดยกลุ่มนี้จะมี ความเข้ากันได้กับเนื้อเยื่อได้ดีและมีความสามารถในการย่อยสลายทางชีวภาพได้เอง แต่พบข้อเสีย คือ ความสามารถในการรับแรงเชิงกลต่ำ ส่วนในกลุ่มที่มาจากวัสดุสังเคราะห์ เช่น พอลิแลกติก (Poly Lactic Acid; PLA) พอลิกลีค (Poly Glycolic Acid; PGA) และพอลิแลกติก-โค-ไกลิโคไลด์ (Poly Lactide-Co-Glycolide) เป็นต้น จะสามารถออกแบบโครงสร้างทางเคมีได้ สามารถควบคุมอัตราการย่อยสลายได้ มีความแข็งแรง สามารถรับแรงเชิงกลได้ ควบคุมปริมาณรูพรุน และ

ขนาดรูพรุนได้ แต่ข้อเสียของกลุ่มนี้ คือ ขนาดส่วนประกอบของสารเมทริกซ์นอกเซลล์ และการย่อยสลายของวัสดุมักจะเหลือสิ่งที่เป็นพิษต่อเซลล์ โดยส่วนมากจะเป็นกรดอ่อน⁽³⁸⁾

ในส่วน of เซลล์นั้นก็ต้องมาจากแหล่งที่มาที่เหมาะสม โดยอยากให้เซลล์สามารถผลิตสารออกมาให้ใกล้เคียงกับเนื้อเยื่อธรรมชาติ ซึ่งเซลล์นั้นมักจะมาจากเซลล์ปฐมภูมิ (Primary cell) ของตัวคนไข้เอง นำมาใส่สแคฟโฟลด์และปลูกถ่ายกลับไปยังเนื้อเยื่อส่วนที่เสียหาย ซึ่งการนำเซลล์มาใช้ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อนิยมใช้เป็นเซลล์ของตัวเอง (Autologous cell) เนื่องจากไม่กระตุ้นให้เกิดการต้านทานของระบบภูมิคุ้มกัน จึงไม่จำเป็นต้องใช้การกดภูมิคุ้มกัน และไม่ต้องรับผลข้างเคียงด้วย อย่างไรก็ตามวิธีนี้ก็ยังมีข้อจำกัดเนื่องจากเซลล์ของตนเองใช้เวลานานในการเลี้ยงเซลล์เพื่อให้ได้เนื้อเยื่อที่ต้องการ อีกทั้งการเก็บเซลล์อาจส่งผลให้เซลล์กลายเป็นโรค ดังนั้นจึงมีการเปลี่ยนมาสนใจเซลล์ต้นกำเนิด (Stem cell) ที่เป็นเซลล์ของตนเองกันมากขึ้น^(34, 39) เนื่องจากมีการค้นพบโดย Yamanaka และTakahashi ว่าสามารถเปลี่ยนแปลงเซลล์ที่โตเต็มวัยให้กลายเป็นเซลล์ต้นกำเนิดได้⁽⁴⁰⁾ โดยที่เซลล์ต้นกำเนิด คือ เซลล์ที่มีคุณสมบัติในการแบ่งตัวเพื่อเพิ่มจำนวนตัวเองได้ และสามารถเปลี่ยนแปลง (Differentiate) ให้กลายเป็นเซลล์อื่นที่ทำหน้าที่หลากหลายได้

โดยในทางทันตกรรมก็มีการนำงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อเข้ามาประยุกต์ใช้เช่นกัน ทั้งในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่ออ่อนและเนื้อเยื่อแข็ง เช่น มีงานวิจัยทางคลินิกพบว่าจากการซ่อมแซมบริเวณขากรรไกรภายหลังจากการถอนฟัน ส่งผลให้เกิดการละลายตัวของกระดูกหลังการถอนฟัน มีการทดลองโดยมีการนำเซลล์ต้นกำเนิดจากฟัน (dental pulp stem cell) รวมกับโครงร่างชีวภาพคอลลาเจนแบบฟองน้ำ ใช้ในการรักษาเนื้อเยื่อกระดูกบริเวณที่ถอนฟันกรามซี่ที่สามไป ผลพบว่าสามารถซ่อมแซมเนื้อเยื่อได้ทั้งกระดูกขากรรไกรและเนื้อเยื่อปริทันต์⁽⁴¹⁾ หรือในกรณีที่มีการสูญเสียการทำงานของต่อมน้ำลายซึ่งอาจเกิดจากผลข้างเคียงของการใช้ยา การฉายรังสีเพื่อการรักษาหรือจากโรคภูมิคุ้มกันต้านทานเนื้อเยื่อตัวเอง เช่น โรคไซเกริน (Sjogren's syndrome) มีความพยายามในการสร้างต่อมน้ำลายมาทดแทน โดยมีการทดลองนำเซลล์ต้นกำเนิดจากต่อมน้ำลายได้ขากรรไกรมนุษย์ (human submandibular gland stem cells) มาใส่ในโครงร่างสามมิติ (Matrigel) และกระตุ้นด้วยไฟโบรบลาสต์โกรทแฟคเตอร์ 10 (FGF-10) นำไปปลูกถ่ายในหนูทดลองเพื่อสร้างต่อมน้ำลาย ผลพบว่าในกลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วยไฟโบรบลาสต์โกรทแฟคเตอร์ 10 (FGF-10) มีการแสดงออกตัวบ่งชี้ (marker) ที่จำเพาะของต่อมน้ำลายมากกว่ากลุ่มที่ไม่ได้ถูกกระตุ้นโดยโกรทแฟคเตอร์⁽⁴²⁾

ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูก พบว่ามีการใช้อุปกรณ์โลหะแบบเฉื่อยที่เข้ากับเนื้อเยื่อมนุษย์ได้ กระดูกของตนเอง (Autogenous graft) และวัสดุทดแทนจากกระดูกของสิ่งมีชีวิตสปีชีส์

เดียวกัน (Allograft) ในการซ่อมแซมกระดูกที่ถูกทำลายเป็นบริเวณกว้าง แม้จะเป็นวิธีมาตรฐาน แต่ก็มีข้อจำกัด เช่น ในการใช้อุปกรณ์โลหะอาจจะต้องผ่าตัดซ้ำเพื่อนำออก ในกรณีที่วัสดุทดแทนจากกระดูกของสิ่งมีชีวิตสปีชีส์เดียวกันก็มีความเสี่ยงในการได้รับโรค หรือการใช้กระดูกของตนเองก็จะสร้างความเจ็บปวดให้ผู้ป่วยที่ต้องผ่าตัดบริเวณที่บริจาค ซึ่งจุดมุ่งหมายของงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูก คือ การเตรียมวัสดุในบริเวณที่กระดูกถูกทำลายและให้เซลล์ของผู้ป่วยเองทำการซ่อมแซม โดยวัสดุที่เลือกมานั้นจะทำหน้าที่เป็นสแคฟโฟลด์ จึงต้องมีคุณสมบัติในการรับแรงเชิงกล สนับสนุนให้เซลล์ยึดติด และเกิดการสะสมของแร่ธาตุได้ โครงสร้างที่มีรูพรุนเหนียวช่วยให้เซลล์และหลอดเลือดเข้ามาเพื่อสร้างกระดูก สามารถย่อยสลายเองได้เมื่อมีการสร้างกระดูกใหม่ขึ้นมา ส่งผลให้มีความพยายามในการพัฒนาเพื่อหาวัสดุที่เหมาะสมในการสร้างเนื้อเยื่อกระดูก และลดความเสี่ยงข้างต้นที่ได้กล่าวมา^(37, 39)

ไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิก (Hyaluronic acid based hydrogel)

ไฮโดรเจล คือ โครงร่างสามมิติของพอลิเมอร์ที่มีการเชื่อมต่อกัน มีคุณสมบัติในการกักเก็บน้ำและมีรูพรุน โดยขนาดและรูปร่างแตกต่างกันไปขึ้นกับการสังเคราะห์ ความสำคัญในความเป็นรูพรุนนี้ส่งผลต่อการรวมตัวกับสารชีวโมเลกุล ไฮโดรเจลจึงเป็นระบบขนส่งสารที่สามารถจุปริมาณของยาได้ใกล้เคียงกับปริมาตรของไฮโดรเจลเอง และยังมีคุณสมบัติความเข้ากันได้ของเนื้อเยื่อ จึงส่งผลให้ไฮโดรเจลกลายเป็นตัวเลือกที่ดีในการควบคุมและคงไว้ซึ่งสารสำหรับการรักษา^(43, 44) ไฮโดรเจลนั้นสามารถขึ้นรูปได้หลายแบบ ทั้งยังสามารถนำไปใช้ประโยชน์ทางอุตสาหกรรมทางการแพทย์ มีคุณสมบัติชอบน้ำ ซึ่งจะพบในพอลิเมอร์ที่มีส่วนประกอบของหมู่ที่ชอบน้ำ เช่น คาร์บอกซิลิก (-COOH) ไฮดรอกซิล (-OH) เป็นต้น⁽⁴⁵⁾ โดยไฮโดรเจลสามารถแบ่งได้หลากหลายประเภท อาทิ กระบวนการครอสลิงค์ แบ่งเป็นการเชื่อมขวางทางกายภาพ (physically cross linking) หรือการเชื่อมขวางทางเคมี (chemical cross linking) ลักษณะทางกายภาพ ได้แก่ ไฮโดรเจลแบบแข็ง กึ่งของแข็งของเหลว แบบเหลว เป็นต้น หรือแบ่งจากสารที่สร้าง ได้แก่ สารธรรมชาติหรือสารสังเคราะห์⁽⁴⁶⁾

กรดไฮยาลูโรนิกเป็นสารที่มีส่วนประกอบของน้ำตาล (polysaccharide) พบได้ในสารเมทริกซ์นอกเซลล์ของสิ่งมีชีวิต สามารถถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์ไฮยาลูโรนเดส (hyaluronidase enzyme) เนื่องด้วยความเข้ากันได้ทางชีวภาพกับร่างกาย ความสามารถในการย่อยสลายทางชีวภาพ และการปรับเปลี่ยนทางเคมี ส่งผลให้สารชนิดนี้มีศักยภาพที่น่าสนใจนำไปใช้ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อได้ แต่สารชนิดนี้มีข้อด้อย คือ ไม่สามารถรับแรงเชิงกลได้มาก และมีการสลายตัวอย่างรวดเร็ว จึงมีความพยายามเปลี่ยนแปลงทางเคมีเพื่อพัฒนาคุณสมบัติทางกายภาพให้

ดีมากขึ้น⁽¹¹⁾ มีการนำกรดไฮยาลูโรนิกมาเป็นส่วนประกอบในการสังเคราะห์ไฮโดรเจล ได้ออกมาเป็นไฮโดรเจล จากกรดไฮยาลูโรนิกซึ่งเป็นที่ยอมรับโดยมีการนำไปใช้อย่างแพร่หลาย เนื่องจากมีความสามารถในการเลียนแบบเนื้อเยื่อของมนุษย์ และสามารถแลกเปลี่ยนออกซิเจน สารอาหาร และของเสีย^(11, 47)

ได้มีการสร้างระบบนำส่งยาไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกในรูปแบบฉีด ที่มีการปรับปรุงโครงสร้างจากไฮดราโซน (Injectable modified hyaluronic acid from hydrazone-crosslinked hydrogel) เพื่อนำส่งโกรทแฟคเตอร์ชนิดบีเอ็มพี 2 (BMP-2) การทดลองพบว่าไฮโดรเจลที่บีเอ็มพี 2 ได้อย่างต่อเนื่อง 28 วัน ในวันที่ 28 ยังพบระดับบีเอ็มพี 2 ได้ถึง 86% นอกจากนี้ยังได้ทำการทดลองฉีดไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกในรูปแบบฉีด ที่มีการปรับปรุงโครงสร้างจากไฮดราโซน เข้าไปในกะโหลกของหนู พบว่าไฮโดรเจลชนิดนี้สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างกระดูกได้ในเวลา 8 สัปดาห์ ผลการศึกษารูปได้ว่าสามารถใช้ไฮโดรเจลชนิดนี้เป็นระบบนำส่งบีเอ็มพี 2 เข้าไปในเซลล์ กระตุ้นให้เกิดการสร้างกระดูกและไม่เป็นพิษต่อเซลล์ แต่ไฮโดรเจลชนิดนี้ก็มี การเติมหมู่อัลดีไฮด์ (Aldehyde) โดยปฏิกิริยาเปอร์ริโอเดทออกซิไดซ์ (Periodate oxidized) ในการก่อตัวเป็นเจล จึงเป็นข้อจำกัดเมื่อมีการใช้กับเนื้อเยื่อ⁽⁴⁸⁾

มีการศึกษาและพัฒนาไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกเพื่อให้มีคุณสมบัติที่เหมาะสมสำหรับการใช้งานวิศวกรรมเนื้อเยื่อ ในปีค.ศ. 2016 Maturavongsadit และคณะ ได้มีการทดลองผลิตไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกแบบฉีด มีการปรับเปลี่ยนโครงสร้างโดยการเติมสารเมทาคริลิคแอนไฮไดรด์ (Methacrylic anhydride) ซึ่งเป็นการเติมหมู่อะคริลิกให้กับกรดไฮยาลูโรนิก และใช้สารครอสลิงค์เป็นทีเอ็มวีวันซิส (Cysteine-inserted Tobacco mosaic virus (TMV) mutants; TMV1 cys) กับไดไทโอเทรียล (Dithiotreitol; DTT) โดยทำการเปรียบเทียบกับเมทาคริลิตไฮยาลูโรนิกไฮโดรเจลที่ใช้สารครอสลิงค์เป็นดีทีทีเพียงตัวเดียว โดยปฏิกิริยาครอสลิงค์ของไฮโดรเจลทั้งสองชนิดใช้ปฏิกิริยาไธออลอินคลิก (thiol-ene click reaction) ซึ่งเป็นปฏิกิริยาที่ไม่มีผลข้างเคียงต่อโปรตีนที่มีส่วนประกอบของหมู่เอไมด์ จึงไม่ส่งผลกับโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบของยาด้วย มักใช้ปฏิกิริยานี้เป็นตัวสร้างไฮโดรเจล เนื่องจากไธออลอคริลิตนั้นเป็นสารตั้งต้นที่ควบคุมเวลาการก่อตัวเป็นเจลได้ดีและเป็นปฏิกิริยาที่ง่ายและมีความปลอดภัย ผลจากการศึกษาพบว่า กรดไฮยาลูโรนิกน้ำหนักโมเลกุล 47 กิโลดาลตัน เป็นขนาดที่เหมาะสมที่จะทำให้เกิดความหนืดและความถ่วงจำเพาะที่ดีต่อการเกิดปฏิกิริยาการเติมหมู่เมทาคริลิตเพื่อใช้ในการปรับปรุงโครงสร้างของกรดไฮยาลูโรนิก โดยทั้งไฮโดรเจลที่ครอสลิงค์ด้วยทีเอ็มวีวันซิสและไดไทโอเทรียลมีขนาดของรูพรุนภายในเจล 20-100 ไมโครเมตร ซึ่งเป็นขนาดของรูพรุนที่

เหมาะสมต่อการเป็นที่ยึดของเซลล์สำหรับวิศวกรรมเนื้อเยื่อ และเป็นขนาดที่เหมาะสมต่อการซึมผ่านของยาเพื่อนำไปใช้ในระบบนำส่งยา⁽⁴⁹⁾

ต่อมา มีการทดลองนำไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกที่ปรับปรุงโครงสร้างด้วยเมทาคริลิกแอนไฮไดรด์มาพัฒนาต่อ โดยการเปลี่ยนสารที่ก่อให้เกิดการเชื่อมขวางได้แก่ ไดโทอีทรีโธล พียูรี (4-arm polyethylene glycol; PEG) และพีเอเอ็มเอเอ็ม (Multi-arm polyamidoamine; PAMAM) เพื่อใช้เป็นไฮโดรเจลสำหรับการทดลองกับเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูก (Bone marrow stem cells; BMSCs) ในห้องปฏิบัติการ ผลการศึกษาพบว่าการเชื่อมขวางนั้นเกิดจากไฮดรอกซิลคลิกตามเดิม โดยปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นได้อย่างสมบูรณ์ที่อุณหภูมิห้องและมีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 8 อีกทั้งพบว่าไฮโดรเจลที่เชื่อมขวางด้วยดีทีทีใช้เวลาเร็วที่สุดเพียง 60 นาทีในการก่อตัวเป็นเจล⁽⁵⁰⁾ อีกการศึกษาของ Trakiattikul และคณะ ในปี ค.ศ. 2018 นำไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกแบบฉีดที่ดัดแปลงด้วยเมทาคริลิกแอนไฮไดรด์ (Methacrylic anhydride) และสารเชื่อมขวางคือ ดีทีที มาผสมเข้ากับแมนนิทอล (Mannitol) ที่ทำหน้าที่เป็นสารเพิ่มปริมาณยาและบีเอสเอ (Bovine serum albumin; BSA) เป็นตัวแทนของโปรตีน ผลการศึกษาพบว่าได้ไฮโดรเจลที่มีคุณสมบัติทางกายภาพที่ดี แต่ยังมีข้อจำกัด คือ ระยะเวลาในการก่อตัวเป็นเจลที่นาน 30 นาที⁽¹²⁾ เช่นเดียวกันกับ Areevijit และคณะ ในปี ค.ศ. 2019 ที่นำเมทาคริลิกไฮยาลูโรนิกไฮโดรเจล (Methacrylate hyaluronic acid hydrogel) ที่เชื่อมขวางด้วยดีทีที มาทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพกับเซลล์กระดูกอ่อนฟันมนุษย์ พบว่าระยะเวลาในการก่อตัวเป็นเจลที่ 15-30 นาที อาจส่งผลถึงปัญหาในการใช้ในคลินิกได้⁽¹³⁾

การเชื่อมขวาง (Crosslinking)

การเชื่อมขวาง คือ การกระบวนการทางเคมีที่จะทำให้เกิดการเสถียรของพอลิเมอร์ โดยมีการเชื่อมและขยายจากสายพอลิเมอร์ในทุกมิติให้กลายเป็นร่างแหพอลิเมอร์ การเชื่อมขวางอาจจะเป็นพันธะไฮดรอกซิล หรือพันธะโควาเลนต์ การเปลี่ยนการเชื่อมขวางอาจส่งผลให้พอลิเมอร์เปลี่ยนสถานะจากของเหลวให้กลายเป็นของแข็ง ดังนั้นการเชื่อมขวางจะส่งผลต่อคุณสมบัติทางกายภาพของไฮโดรเจล เช่น ความยืดหยุ่น (Elasticity) ความต้านทานการไหล (Viscosity) จุดหลอมเหลว (Melting point)⁽⁵¹⁾ ซึ่งไฮโดรเจลสามารถถูกสร้างได้หลายรูปแบบโดยการเชื่อมขวางทางกายภาพ (Physical) เช่น การเปลี่ยนค่าความเป็นกรด-ด่าง การเปลี่ยนอุณหภูมิ ส่วนในทางเคมี (Chemical) การเติมเชื่อมขวางเชิงโควาเลนต์ ได้แก่ คาร์โบไดอิมิด (carbodiimides) คาร์บอนิลไดอิมิดาโซล (carbonyldiimidazole) บิวทีดีอี (butanedioldeglycidyl ether; BDDE)⁽⁵²⁾

การครอสลิงค์จากการบ่มตัวโดยแสง (Photo crosslink)

เนื่องจากการนำไฮโดรเจลมาใช้อย่างแพร่หลายส่งผลให้มีการศึกษาเกี่ยวกับการกระตุ้นและการตอบสนองของไฮโดรเจลมากยิ่งขึ้น ไฮโดรเจลนั้นสามารถตอบสนองต่อสิ่งกระตุ้นที่หลากหลาย เช่น แสง สารเคมี อุณหภูมิ สิ่งกระตุ้นเหล่านี้จะส่งผลต่อโครงสร้างและการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง การใช้แสงเป็นตัวกระตุ้นมีข้อดี คือ สามารถควบคุมการเปิด-ปิดแสง ควบคุมปริมาณของแสงได้อย่างแม่นยำ ส่งผลให้สามารถควบคุมเวลาในการก่อตัวเป็นเจลได้ง่าย⁽⁵³⁾ นอกจากนี้ยังช่วยลดความเสี่ยงในการเปลี่ยนแปลงของคุณสมบัติของโปรตีนหรือไฮโดรเจลที่เกิดจากการเติมสารเคมีครอสลิงเกอร์ได้⁽⁵⁴⁾

โดยงานวิจัยของ Chaopanitcharoen และคณะ ในปี ค.ศ. 2021 ได้ทำการพัฒนาให้ไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิก มีการพอลิเมอไรเซชันโดยแสงสีฟ้า เพื่อควบคุมเวลาในการก่อตัวเป็นเจล ผลการศึกษาพบว่าระยะเวลาที่ใช้บ่มที่ 90 วินาทีจะทำให้ได้โครงสร้างที่มีคุณสมบัติทางกายภาพที่ดี มีการพองตัวที่ดี และมีขนาดรูพรุนที่เหมาะสม⁽¹⁴⁾ ต่อมาในงานวิจัยของ Jivacharoen และคณะ ในปี ค.ศ. 2022⁽¹⁵⁾ และ Leewisutthikul และคณะ ในปี ค.ศ. 2022⁽¹⁶⁾ ได้ทำการทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพของไฟโบรบลาสต์แอล 929 และเซลล์ออสติโอเบลาสต์จากหนูกับไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกที่มีการพอลิเมอไรเซชันโดยแสงสีฟ้า ตามลำดับ ผลพบว่ามีความเข้ากันได้ทางชีวภาพของทั้งเซลล์ไฟโบรบลาสต์แอล 929 และเซลล์ออสติโอเบลาสต์จากหนู

เซลล์ไฟโบรบลาสต์ (Fibroblast cell)

เซลล์ไฟโบรบลาสต์ เป็นเซลล์ชนิดหนึ่งที่พบได้ในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันทั่วร่างกาย มีต้นกำเนิดมาจากเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์ มีบทบาทสำคัญในการสร้างเส้นใยเพื่อช่วยรักษาโครงสร้างของเนื้อเยื่อ ช่วยรักษาความสมบูรณ์โครงสร้าง ด้านทานแรงกระแทกที่เข้ามกระทบต่อผิวหนังหรืออวัยวะ ทั้งยังมีบทบาทในกระบวนการหายของแผลและการซ่อมแซมเนื้อเยื่อ⁽⁵⁵⁾ เซลล์ไฟโบรบลาสต์จะมีลักษณะคล้ายทรงกระสวยยาว (Elongate spindle) หรือรูปร่างคล้ายดาว (Stellate) มีแขนยาว หากพบเซลล์ไฟโบรบลาสต์บริเวณแผลในขณะที่กำลังจะหาย มักพบว่า มีนิวเคลียสกลมใหญ่ และมีนิวคลีโอล (Nucleoli) เด่นชัด ในส่วนของไซโทพลาสซึม (Cytoplasm) มีบริเวณกว้าง มีร่างแหเอนโดพลาสมิกชนิดหยาบ (Rough endoplasmic reticulum; RER) จำนวนมาก มีกอลจิ (Golgi) เด่นชัด แสดงให้เห็นว่ามีการสังเคราะห์และส่งออกโปรตีน นอกจากนี้ยังพบแขนงของเซลล์มีการยื่นประสานเป็นร่างแหกับเซลล์ไฟโบรบลาสต์ข้างเคียง ซึ่งในลักษณะนี้จะเรียกว่า เซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ถูกกระตุ้น (Activated fibroblast)^(56, 57) ตรงข้ามกันกับเซลล์

ไฟโบรบลาสต์ที่ไม่ถูกกระตุ้นจะพบร่างแหเอนโดพลาสมิกซิทียาบน้อยลง และไม่พบลักษณะการแตกแขนง

เซลล์ไฟโบรบลาสต์สามารถผลิตส่วนประกอบสารเมทริกซ์นอกเซลล์ เช่น คอลลาเจนประเภทที่ 1 2 และ 4 โปรตีโอไกลแคน (Proteoglycan) ไฟโบรเนกติน ลามินิน (Laminins) ไกลโคสะมิโนไกลแคน (Glycosaminoglycans) เอนไซม์เอ็มเอ็มพี (Metalloproteinases) และโพรสตาแกลนดิน (Prostaglandins) รวมถึงสามารถจัดเรียงเมทริกซ์โดยการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายหรือเชื่อมสารในเมทริกซ์ โดยตัวของเซลล์ไฟโบรบลาสต์นั้นจะถูกกระตุ้นจากสัญญาณของไฮโดรคอร์ตและโกรทแฟคเตอร์ต่างๆ⁽⁵⁸⁾ ในกระบวนการหายของแผลนั้น เซลล์ไฟโบรบลาสต์ก็ยังมีส่วนสำคัญในทุกๆ ระยะ โดยจะมีการหลั่งของไฮโดรคอร์ตหรือโกรทแฟคเตอร์ต่างๆ ตามกระบวนการแล้วมากระตุ้นเซลล์ไฟโบรบลาสต์หรือในบริเวณที่เป็นแผล เซลล์ไฟโบรบลาสต์ถูกกระตุ้นจึงมีการเปลี่ยนรูปร่างเป็นเซลล์ไมโอไฟโบรบลาสต์ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีเส้นใยความเครียด (Stress fiber) ที่ประกอบด้วยเส้นใยแอคตินชนิดแอลฟาในกล้ามเนื้อเรียบ (α smooth muscle actin) ส่งผลให้เกิดการหดตัวของแผล⁽⁵⁶⁾

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาที่พบว่าเซลล์ไฟโบรบลาสต์นั้นยังมีความสามารถในการเปลี่ยนเป็นเซลล์จำเพาะชนิดอื่นๆ เช่น เซลล์ที่สร้างกระดูก หรือเซลล์ที่สร้างไขมัน เป็นต้น ในปี ค.ศ. 2017 มีการศึกษาทดลองเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ได้มาจากชั้นผิวหนัง (Human dermal-derived fibroblast cells; hDDFCs) โดยนำรีคอมบิแนนต์อะดิโนไวรัสบีเอ็มพี 7 (Human BMP-7 recombinant adenovirus) มาเข้ากระบวนการนำกรดนิวคลีอิกบริสุทธิ์เข้าไปในเซลล์ จากนั้นจะมีการดูลักษณะของการเปลี่ยนเป็นเซลล์สร้างกระดูก วัตถุประสงค์ทางพันธุกรรมของยีนที่มีความเกี่ยวข้องกับออสติโอเบลาสต์ (Osteoblast-related gene) และมีการนำมาทดสอบการสร้างกระดูกโดยทำการฉีดเซลล์ที่มีไวรัสที่อยู่ในแคลเซียมอัลจิเนตไฮโดรเจล (Calcium alginate hydrogel) เข้าไปในสัตว์ทดลอง ต่อมาจะมีการตรวจทางภาพรังสีและการตัดชิ้นเนื้อ ผลพบว่าเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ได้มาจากชั้นผิวหนัง มีลักษณะเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์สร้างกระดูก และมีการแสดงออกทางพันธุกรรมในแบบที่เกี่ยวข้องกับออสติโอเบลาสต์⁽⁵⁹⁾ นอกจากนี้ยังได้มีการศึกษาเปรียบเทียบการรักษากระดูกที่ละลายในสันกระดูกบ่าฟันโดยแบ่งผู้ป่วยเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 ใช้สแคฟโฟลด์ชนิดเบต้าทีซีพี (β -tricalcium phosphate; β -TCP) จากนั้นใช้แผ่นคอลลาเจนปิดบริเวณกระดูกนั้น ในขณะที่กลุ่มที่ 2 มีการเพิ่มเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากเหงือก (Gingival Fibroblast; GF) บนสแคฟโฟลด์และปิดด้วยแผ่นคอลลาเจนเหมือนกัน พบว่าในกลุ่มที่ 2 มีการลดร่องลึกปริทันต์ (Vertical pocket depth) และการสูญเสียการยึดเกาะทางคลินิก

(Clinical attachment loss) ที่ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ 1 นอกจากนี้เมื่อประเมินทางภาพรังสีพบว่ามีการเพิ่มของกระดูกในกลุ่มที่ 2 มากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ผู้วิจัยจึงสรุปว่าการนำเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากเหงือกมาใช้เป็นทางเลือกที่น่าสนใจ เนื่องจากการเพิ่มองค์ประกอบในด้านเซลล์จึงสามารถเพิ่มศักยภาพในการฟื้นฟูเนื้อเยื่อได้⁽⁶⁰⁾

เซลล์ไฟโบรบลาสต์ 929 (Fibroblast L929 cells)

เซลล์ไฟโบรบลาสต์ 929 เป็นเซลล์ที่ได้มาจากเนื้อเยื่อเกี่ยวพันบริเวณเนื้อเยื่อไขมันและใต้ผิวหนังของหนูเพศผู้ที่มีอายุ 100 วัน สปีชีส์ *Mus musculus* C3H/An โดย NCTC clone 929 (L-929) เป็นหนึ่งในสายพันธุ์กลุ่มแรกที่มาจากสายพันธุ์แอล (L strain) เซลล์ชนิดนี้ถูกนำมาใช้ในห้องปฏิบัติการเพื่อทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ ตามคู่มือของระบบมาตรฐาน 10993 Part 5 Cytotoxic test (ISO 10993-5:2009) ซึ่งเป็นการให้เซลล์สัมผัสกับสารสกัดหรือสารละลายต่างๆ มีการนำไปทดสอบความเข้ากันได้ของวัสดุทางทันตกรรมต่อเซลล์ด้วย ในงานวิจัยมักมีการนำมาทดสอบกับเซลล์ข้างต้นก่อนจะนำไปทดสอบกับสัตว์ทดลองต่อไป เซลล์ชนิดนี้ถูกจัดเก็บโดยแช่แข็งในไนโตรเจนเหลวที่ได้มาตรฐานการเก็บรักษาจากเอทีซีซี (American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA))

เซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเอ็นยึดปริทันต์ในมนุษย์ (Human Periodontal Ligament Fibroblast cells ; hPDLF)

เซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเอ็นยึดปริทันต์ (Periodontal ligament fibroblasts cell; PDLF) มีลักษณะเป็นทรงกระสวยยาว (spindle-shaped) เป็นเซลล์ที่ได้จากเนื้อเยื่อเอ็นยึดปริทันต์ (periodontal ligament) ของมนุษย์มีบทบาทสำคัญต่อสาเหตุของโรคปริทันต์และการฟื้นฟูเนื้อเยื่อปริทันต์ ในเนื้อเยื่อปริทันต์ที่มีสุขภาพดีเซลล์ชนิดนี้จะช่วยรักษาสมดุลของเนื้อเยื่ออ่อนและเนื้อเยื่อแข็ง นอกจากนี้ยังสามารถหลั่งไซโตไคน์หรือโกรทแฟกเตอร์ที่มีผลต่อการทำงานของเซลล์ออสติโอคลาส (osteoclast) และเซลล์ออสติโอบลาสต์ (osteoblast) ที่ทำให้กระดูกงอกขึ้นได้อย่างแข็งแรง ในการทดลองมักมีการนำเซลล์ชนิดนี้ไปใช้ทดสอบกับการฟื้นฟูของเนื้อเยื่อ การติดเชื้อหรือการอักเสบ⁽⁶¹⁾ มักนำไปใช้ในการศึกษาเกี่ยวกับชีววิทยาของปริทันต์ การซ่อมแซมเนื้อเยื่อและการปลูกถ่ายเนื้อเยื่อ

โกรทแฟคเตอร์ (Growth factor)

โกรทแฟคเตอร์เป็นกลุ่มของเปปไทด์ มีหน้าที่กระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์ การเคลื่อนที่ การเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์จำเพาะ โดยกลไก คือ การจับกับ receptor บนเซลล์ที่เป็นจุดหมาย แล้วจะมีการส่งสัญญาณเพื่อกระตุ้นให้เกิดการทำงานของเซลล์ที่เฉพาะ⁽⁶²⁾ ซึ่งถูกนำมาใช้ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อ โดยใช้สแคฟโฟลด์เป็นตัวปลดปล่อยโกรทแฟคเตอร์เพื่อการซ่อมแซมเนื้อเยื่อที่เสียหาย ในส่วนของงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูก มีโกรทแฟคเตอร์หลายชนิดเข้ามาเกี่ยวข้อง เพราะแต่ละชนิดจะมีหน้าที่เฉพาะและส่งเสริมให้เกิดการซ่อมแซมกระดูก อาทิ โกรทแฟคเตอร์ชนิดบีเอ็มพี (bone morphogenetic proteins; BMPs) ทีจีเอฟ เบต้า (Transforming growth factor- β ; TGF- β) ไฟโบรบลาสต์โกรทแฟคเตอร์ (Fibroblast growth factor; FGF) พีดีจีเอฟ (platelet-derived growth factor; PDGF) วีอีจีเอฟ (Vascular endothelial growth factor; VEGF) และไอจีเอฟ (Insulin-like growth factors; IGFs) เป็นต้น⁽⁶³⁾ การทำความเข้าใจลักษณะทางชีววิทยาของโกรทแฟคเตอร์ กลไกการออกฤทธิ์และกลยุทธิ์การนำส่งสารเป็นสิ่งสำคัญก่อนที่จะนำมาใช้ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อ⁽⁹⁾ ตัวอย่างโกรทแฟคเตอร์ที่พบในการหายของกระดูกมีดังตาราง 1

ตาราง 1 โกรทแฟคเตอร์ที่เกี่ยวข้องกับการหายของกระดูก

โกรทแฟคเตอร์	เซลล์ที่ทำหน้าที่ผลิต	ผลทางชีวภาพ	ผลต่อกระดูก
Bone Morphogenic Protein (BMP)	เซลล์ต้นกำเนิดกระดูก (Osteoprogenitor cell) ออสติโอเบลาสต์ เซลล์กระดูกอ่อน เซลล์เอนโดทีเลียม	สร้างกระดูกและกระดูกอ่อน การเหนี่ยวนำการสร้างกระดูก (Osteoinduction)	การเคลื่อนย้ายเซลล์ต้นกำเนิดกระดูก เหนี่ยวนำการเพิ่มจำนวนและการเปลี่ยนแปลงการสร้างแมทริกซ์
Insulin-like Growth Factor (IGF)	ออสติโอเบลาสต์ เซลล์กระดูกอ่อน เซลล์ตับ เซลล์เอนโดทีเลียม	ควบคุมผลของโกรทฮอร์โมน	การเพิ่มจำนวนของออสติโอเบลาสต์และสร้างแมทริกซ์ของกระดูก การสลายตัวของกระดูก

ตาราง 1 โกรทแฟคเตอร์ที่เกี่ยวข้องกับการหายของกระดูก (ต่อ)

โกรทแฟคเตอร์	เซลล์ที่ทำหน้าที่ผลิต	ผลทางชีวภาพ	ผลต่อกระดูก
Fibroblast Growth Factor (FGF)	เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดแมคโครฟาจ โมโนไซต์ เซลล์ไขกระดูก เซลล์กระดูกอ่อน ออสติโอเบลาสต์ เซลล์เอนโดทีเลียม	การสร้างหลอดเลือดใหม่ (Angiogenesis) การเพิ่มจำนวนเซลล์ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์และเซลล์กล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือด	การเติบโตของเซลล์กระดูกอ่อน การเพิ่มจำนวนเซลล์และการเปลี่ยนแปลงของออสติโอเบลาสต์ ยับยั้งการทำลายตัวเอง (Apoptosis) ของออสติโอเบลาสต์ที่ยังไม่โตเต็มที่ เน้นย่นำการทำลายตัวเองของเซลล์กระดูก การสลายตัวของกระดูก (Bone resorption)
Platelet-Derived Growth Factor (PDGF)	เกล็ดเลือด ออสติโอเบลาสต์ เซลล์เอนโดทีเลียม เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดแมคโครฟาจ โมโนไซต์	การเพิ่มจำนวนเซลล์ของเซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน การเคลื่อนที่ของโมโนไซต์แมคโครฟาจและเซลล์กล้ามเนื้อเรียบตามการชักนำของสารเคมี (Chemotaxis) การสร้างหลอดเลือดใหม่	การเคลื่อนย้ายของเซลล์ การเพิ่มจำนวนของเซลล์และการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ต้นกำเนิดกระดูก
Transforming Growth Factor beta (TGF- β)	เกล็ดเลือด ออสติโอเบลาสต์ เซลล์ไขกระดูก เซลล์เอนโดทีเลียม เซลล์ไฟโบรบลาสต์ เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดแมคโครฟาจ	กดภูมิคุ้มกัน การสร้างหลอดเลือดใหม่ กระตุ้นการเติบโตของเซลล์ การเปลี่ยนแปลงและการสร้างเมทริกซ์ที่อยู่นอกเซลล์ (Extracellular matrix)	การเพิ่มจำนวนเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ การรวมตัวกันของพรีเคอร์เซอร์ของออสติโอเบลาสต์ที่ช่วยในการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ออสติโอเบลาสต์และเซลล์กระดูกอ่อน (ยับยั้งการเปลี่ยนแปลงขั้นสุดท้าย) การสร้างเมทริกซ์ของกระดูก การรวมตัวกันของพรีเคอร์เซอร์ของออสติโอคลาสต์
Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)	ออสติโอเบลาสต์ เกล็ดเลือด	การสร้างหลอดเลือดใหม่	เปลี่ยนกระดูกอ่อนเป็นกระดูก การเพิ่มจำนวนและการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ออสติโอเบลาสต์

ไฟโบรบลาสต์โกรทแฟคเตอร์ (Fibroblast growth factors)

กลุ่มไฟโบรบลาสต์โกรทแฟคเตอร์เป็นกลุ่มโพลีเปปไทด์แบบเนื้อเดียวกัน (homogeneous polypeptide) ที่มีสมาชิก 22 ตัว มีศักยภาพในการส่งเสริมการซ่อมแซมและฟื้นฟูของเนื้อเยื่อ ช่วยกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ไฟโบรบลาสต์โกรทแฟคเตอร์ทำงานโดยการจับกับไฟโบรบลาสต์รีเซปเตอร์ (FGFRs) ด้วยความช่วยเหลือจากเฮพารินซัลเฟตซึ่งทำหน้าที่เป็นโคแฟกเตอร์ (Co-factor) โดยการส่งสัญญาณหลักผ่านทาง RAS/MAP kinase pathway จากศักยภาพดังกล่าวไฟโบรบลาสต์โกรทแฟคเตอร์ถูกนำไปใช้ในการฟื้นฟูเนื้อเยื่อที่เสียหาย เช่น ผิวหนัง หลอดเลือด กล้ามเนื้อ เส้นเอ็น ไขมัน กระดูกอ่อน กระดูก ฟัน และเส้นประสาท จากหลายการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าไฟโบรบลาสต์โกรทแฟคเตอร์ทำหน้าที่โดยตรงกับบริเวณแผลเหมือนกันกับโกรทแฟคเตอร์ชนิดอื่นๆ อย่างไรก็ตามไฟโบรบลาสต์โกรทแฟคเตอร์ที่เป็นอิสระจะมีโอกาสถูกย่อยสลายได้ ส่งผลให้สูญเสียการทำหน้าที่ทางชีวภาพ หากอยากให้ไฟโบรบลาสต์โกรทแฟคเตอร์ทำงานได้ดีต้องทำการดูดซับ (Adsorbed) หรือห่อหุ้ม (Encapsulated) โดยวัสดุที่ปลอดภัยเพื่อคงไว้และควบคุมการปลดปล่อยโกรทแฟคเตอร์ได้⁽¹⁸⁾

ไฟโบรบลาสต์โกรทแฟคเตอร์ 2 (Fibroblast growth factor-2; FGF-2)

ไฟโบรบลาสต์โกรทแฟคเตอร์ 2 (FGF-2) หรือ เบสิกไฟโบรบลาสต์โกรทแฟคเตอร์ (Basic fibroblast growth factor) มีโครงสร้างลำดับที่ 3 แบบ β barrel มีแกนตรงกลางเป็นส่วนที่ไม่ชอบน้ำและมีประจุบริเวณพื้นผิวของโปรตีน มีกลุ่มประจุบวกรวมตัวกันด้านหนึ่งซึ่งเป็นด้านที่เฮพารินมาจับ⁽⁶⁴⁾ หน้าที่ของไฟโบรบลาสต์โกรทแฟคเตอร์ชนิดนี้มีผลต่อการเพิ่มจำนวน การเคลื่อนที่ การเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์จำเพาะของเซลล์ออสติโอเบลลัสต์ และการสร้างหลอดเลือดที่เป็นหน้าที่หลัก จึงเป็นเหตุผลที่ไฟโบรบลาสต์โกรทแฟคเตอร์ 2 นิยมถูกนำไปใช้ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูก⁽¹⁷⁾ ตัวอย่างเช่น มีการนำไฮโดรเจลพอลิเมอร์ที่มีส่วนผสมของไฟโบรบลาสต์โกรทแฟคเตอร์ 2 มาศึกษาการปลดปล่อยของโกรทแฟคเตอร์ในห้องปฏิบัติการซึ่งวิเคราะห์จากวิธีอีไลซ่า (Enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA) จากนั้นมีการนำวัสดุโครงร่างชีวภาพชนิดนี้ไปฝังในสัตว์ทดลอง คือ กระต่าย ผลพบว่าไฟโบรบลาสต์โกรทแฟคเตอร์ 2 กระตุ้นให้เกิดการสร้างปริมาณกระดูกมากขึ้นในช่วงสองเดือนแรก แต่หลังจากสองเดือนจะพบว่าผลของไฟโบรบลาสต์โกรทแฟคเตอร์ 2 ได้หายไป⁽¹⁹⁾ นอกจากนี้มีการนำวัสดุโครงร่างชีวภาพชนิดโพลียูรีเทนชนิดน้ำ (Waterborne polyurethane; WPU) ที่มีการใส่ไฟโบรบลาสต์โกรทแฟคเตอร์ 2 มาประยุกต์ใช้เป็นเมมเบรน (Membrane) ในงานปลูกกระดูก (Guided bone regeneration; GBR) โดยทดสอบกับเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์ของหนู (Rat mesenchymal stem cells; rMSCs) ผลพบว่าวัสดุชนิดนี้สามารถปลดปล่อยโกรทแฟคเตอร์อย่างคงระดับ

(Sustained Release) และทำให้เซลล์เกิดการยึดเกาะ แบ่งตัว เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์จำเพาะ อีกทั้งยังกระตุ้นให้เกิดการสร้างหลอดเลือดได้ดีกว่าเมื่อเทียบกับวัสดุที่ไม่มีโกรทแฟคเตอร์⁽²¹⁾

นอกจากนี้ในปี ค.ศ. 2016 มีการศึกษาในมนุษย์โดยนำไฟโบรบลาสต์โกรทแฟคเตอร์ 2 ไปใส่ในสแคฟโฟลด์ชนิดเบต้าทีซีพี (β -tricalcium phosphate; β -TCP) ไปวางบริเวณกระดูกที่มีการละลายไปเนื่องจากโรคปริทันต์โดยใช้ความเข้มข้นของไฟโบรบลาสต์โกรทแฟคเตอร์ 2 ที่แตกต่างกัน พบว่าในความเข้มข้นที่ 0.3% หรือ 0.4% ของ rhFGF-2 ส่งผลให้เกิด 71% ของอัตราการรักษาสำเร็จในระยะ 6 เดือน และพบว่ามีกระดูกเพิ่มขึ้นมา 2.5 mm เมื่อเทียบกับ 0.1% ของ rhFGF-2 หรือกลุ่มควบคุมที่มีอัตราสำเร็จเพียง 45%⁽⁶⁵⁾

สำหรับเรื่องปริมาณหรือความเข้มข้นของโกรทแฟคเตอร์ข้างต้น มีการศึกษาในปี ค.ศ. 2014 และ 2017 โดย Eom และคณะ^(66, 67) ซึ่งทำการศึกษาความเข้มข้นของไฟโบรบลาสต์โกรทแฟคเตอร์ 2 กับอัตราการเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์จากไขกระดูก (Bone marrow-derived mesenchymal stem cells; BMSCs) พบว่าโกรทแฟคเตอร์ชนิดนี้สามารถกระตุ้นให้เกิดการแบ่งตัวและกดกระบวนการเซลล์กลืนกินตัวเอง (Autophagy) รวมถึงการเสื่อมสภาพ (Senescence) ในการเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์จากไขกระดูกระยะยาว หลังจากการเพาะเลี้ยงเซลล์ระยะแรกเป็นระยะเวลา 3 วัน พบว่าการกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์จะขึ้นอยู่กับปริมาณ (dose dependent) ของโกรทแฟคเตอร์ แต่ในระยะยาวซึ่งเป็นเวลา 2 เดือน พบว่าความเข้มข้นของไฟโบรบลาสต์โกรทแฟคเตอร์ 2 ที่ 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร นั้นส่งผลให้อัตราการแบ่งตัว (proliferation) จำนวนเซลล์สะสมลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่ความเข้มข้นของไฟโบรบลาสต์โกรทแฟคเตอร์ 2 ต่ำคือ 1 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าอัตราการแบ่งตัวเพิ่มขึ้น

ในส่วนงานวิศวกรรมของเนื้อเยื่ออ่อน ไฟโบรบลาสต์โกรทแฟคเตอร์ 2 มีการนำมาศึกษาอย่างแพร่หลาย โดยใช้กระตุ้นฟื้นฟูของเนื้อเยื่อปริทันต์ (Periodontal tissue regeneration) หรือส่งเสริมการหายของแผล โดยในปี ค.ศ. 2025 มีการศึกษานำไฟโบรบลาสต์โกรทแฟคเตอร์ 2 และอนุพันธ์เมทริกซ์เคลือบฟัน (Enamel matrix derivative; EMD) มาทดสอบในหนูทดลอง ผลพบว่าทั้งสองสารกระตุ้นให้เกิดการหายของแผลได้ดีกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญในวันที่ 1 ของการทดลองและเมื่อเทียบค่าความหนาของเยื่อปริทันต์ เนื้อเยื่อเกี่ยวพันและเหงือก กลุ่มที่ใส่ไฟโบรบลาสต์โกรทแฟคเตอร์ 2 มีค่ามากกว่ากลุ่มที่ใส่อนุพันธ์เมทริกซ์เคลือบฟันอย่างมีนัยสำคัญ⁽⁶⁸⁾ เช่นเดียวกันกับผลการศึกษาในเซลล์เอ็นปริทันต์หนู เมื่อนำไฟโบรบลาสต์โกรทแฟคเตอร์ 2 มาทดสอบพบว่าการกระตุ้นการหลั่งโกรทแฟคเตอร์ชนิดวีกีจีเอฟเอ (VEGF-A) ซึ่งช่วยกันส่งเสริมให้เกิดการสร้างหลอดเลือดใหม่ กระตุ้นการเคลื่อนที่ของเซลล์ได้ดี⁽⁶⁹⁾ หรือการศึกษาเกี่ยวกับการ

กระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากเซลล์ไขมันต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์ของหนู (Adipose mesenchymal stem cells; ADSCs) ของไฟโบรบลาสต์โกรทแฟคเตอร์ 2 โดยใช้ความเข้มข้นของไฟโบรบลาสต์โกรทแฟคเตอร์ 2 ที่ 0, 1, 10 และ 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าเซลล์มีการแบ่งตัวได้ดีที่สุดที่ความเข้มข้น 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ในความเข้มข้น 100 นาโนกรัม เซลล์จะแบ่งตัวได้น้อยกว่าความเข้มข้น 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร⁽⁷⁰⁾

ไฟโบรบลาสต์โกรทแฟคเตอร์ 2 จัดเป็นโกรทแฟคเตอร์ที่มีศักยภาพโดดเด่นและเป็นที่น่าจับตามองในขอบเขตของงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อ ทั้งในส่วนของการเนื้อเยื่อแข็งและเนื้อเยื่ออ่อน คุณสมบัติเฉพาะตัวของ FGF-2 ส่งผลให้เป็นตัวเลือกที่เหมาะสมอย่างยิ่งสำหรับการนำมาประยุกต์ใช้ในการทดลองวิจัยครั้งนี้

ไฟโบรบลาสต์โกรทแฟคเตอร์ 2 จากพืช (Plant produced Fibroblast growth factor-2; Plant produced FGF-2)

โกรทแฟคเตอร์ที่นำมาใช้ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อ มีการพัฒนาด้วยเทคนิคต่างๆ โดยมีการผลิตจากทั้งแบคทีเรีย แมลงและพืช ออกมาเป็นรีคอมบิแนนท์โปรตีน การที่นำพืชมาผลิตโกรทแฟคเตอร์มีข้อดีคือ มีราคาถูก สามารถผลิตได้จำนวนมาก นำมาทำให้บริสุทธิ์ได้ง่าย ปราศจากความเสี่ยงในการติดเชื้อจากแบคทีเรียและไวรัส⁽²²⁾ มีการนำไปใช้ในงานวิจัยหลากหลาย เช่น มีการศึกษาเอาเบสไฟโบรบลาสต์โกรทแฟคเตอร์ที่ผลิตจากข้าว (RbFGF) นำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงสเต็มเซลล์ของมนุษย์ (Human embryonic stem cells; hESCs และ Human induced pluripotent stem cells; hiPSCs) พบว่าเซลล์ทั้งสองชนิดสามารถเจริญเติบโตได้โดยยังคงคุณสมบัติความสามารถของเซลล์ที่จะพัฒนาไปเป็นเซลล์ชนิดต่างๆ (pluripotent) รูปร่าง การแสดงออกของยีนจำเพาะและความเสถียรของโครโมโซมเอาไว้ได้ทั้งหมด ซึ่งเป็นทางเลือกที่ปลอดภัยและมีต้นทุนต่ำกว่าในการผลิต⁽²³⁾ เช่นเดียวกับการศึกษาในปี ค.ศ. 2023 มีการนำเบสไฟโบรบลาสต์โกรทแฟคเตอร์ที่สกัดจากพืชมาทดสอบกับสเต็มเซลล์เพื่อขยายจำนวนของเซลล์โดยที่สเต็มเซลล์ข้างต้นมีลักษณะรูปร่างและการแสดงออกของโปรตีนที่จำเพาะคงเดิม⁽²³⁾

นอกจากนี้มีการศึกษานำโกรทแฟคเตอร์ 2 ที่ผลิตจากพืช และแบคทีเรีย *E. coli* มาทำการทดสอบการแบ่งตัวและเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์จำเพาะของเซลล์เอ็มซีสามที่สามอีกหนึ่ง (MC3T3-E1 cell) พบว่าทั้งสองชนิดสามารถทำให้เซลล์สามารถแบ่งตัวได้ เมื่อนำโกรทแฟคเตอร์ใส่ในฟองน้ำคอลลาเจนที่สามารถดูดซึมมาทดลองพบว่าส่งเสริมการหายของกระดูกในบริเวณที่เสียหายของสัตว์ทดลอง⁽²⁴⁾ ทั้งยังมีการศึกษาของไฟโบรบลาสต์โกรทแฟคเตอร์จากพืช *Nicotiana benthamiana* พบว่าสามารถกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์เอ็นยัดปริทันต์ของมนุษย์ (human periodontal ligament cells; hPDLCs) และเซลล์เดอร์มอลพาพิลลาของต่อมไขมันของมนุษย์

(human follicle dermal papilla cells; hFDPCs) และยังส่งเสริมการผลิตคอลลาเจนในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ผิวหนังของมนุษย์ (human dermal fibroblast cells; hDFCs)⁽⁷¹⁾ จากการศึกษาข้างต้นแสดงถึงประสิทธิภาพและศักยภาพของโกรทแฟคเตอร์ที่ได้จากพืชในการนำมาประยุกต์ใช้ในงานวิจัยได้



บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

การศึกษาวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยวางแผนวิจัย โดยมีลำดับขั้นตอนดังต่อไปนี้

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

1.การกำหนดกลุ่มตัวอย่าง

1.1.เซลล์ที่ใช้ในการทดสอบ

- 1.1.1.เซลล์ไฟโบรบลาสต์แอล 929 จากบริษัทไบโอมีเดียไทยแลนด์จำกัด
- 1.1.2.เซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเอ็นอีดีปริตันตีในมนุษย์จากบริษัท ลอนซา วอคเกอร์ สวิส จำกัด

1.2.โกรทแฟคเตอร์ที่ใช้ในการทดสอบ

ไฟโบรบลาสต์โกรทแฟคเตอร์ 2 หมายถึง Plant-produced basic Fibroblast Growth Factor จากพืช *Nicotiana benthamiana* ที่จัดจำหน่ายโดยบริษัทบีจีเอฟแพลนท์ทริกซ์ จำกัด

1.3.ไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกที่มีการพอลิเมอไรเซชันโดยแสงสีฟ้า

ในการศึกษานี้จะใช้ไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกที่มีการพอลิเมอไรเซชันโดยแสงสีฟ้า จากสูตรของ Chaopanitcharoen และคณะ ซึ่งได้ทำการศึกษาระยะเวลาในการบ่มโดยแสงสีฟ้าที่แตกต่างกันของสารละลายเมทาคริลेटเตดไฮโดรเจลพอลิเมอร์ ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ผสมกับสารละลายลิเทียมฟีนิลไตรเมทิลเบนโซอิลฟอสฟิเนต (Lithium Phenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphinate: LAP, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) ความเข้มข้น 15 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อพัฒนาสูตรการสังเคราะห์ไฮโดรเจลให้มีคุณสมบัติทางกายภาพที่ดี ซึ่งในการศึกษานี้จะใช้ระยะเวลาการบ่มโดยแสงสีฟ้าเป็นเวลา 90 วินาทีเพื่อทำให้เกิดการก่อตัวเป็นเจล โดยอ้างอิงจากงานวิจัยของ Chaopanitcharoen และคณะ⁽¹⁴⁾

2. ขั้นตอนการทดลอง

2.1. การทดสอบหาค่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของไฟโบร بلاสต์โกรทแฟคเตอร์

2 ต่อเซลล์ไฟโบร بلاสต์แอล 929 และเซลล์ไฟโบร بلاสต์ของเอ็นยิดปริทันต์ในมนุษย์

2.1.1. เพาะเลี้ยงเซลล์ไฟโบร بلاสต์แอล 929 และเซลล์ไฟโบร بلاสต์ของเอ็นยิดปริทันต์ในมนุษย์ โดยนำเซลล์ไฟโบร بلاสต์แอล 929 และเซลล์ไฟโบร بلاสต์ของเอ็นยิดปริทันต์ในมนุษย์ลงเพาะเลี้ยงในจานเลี้ยงเซลล์ เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดดีเอ็มอีเอ็ม (DMEM; Dulbecco's Modified Eagle Medium, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) กับ 10% FBS (Fetal Bovine Serum, Gibco, Grand Island, USA) และ 1% Penicillin-Streptomycin (10,000 U/mL, Gibco, Grand Island, USA) นำจานเลี้ยงเซลล์เข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 2-3 วัน เมื่อเซลล์มีความหนาแน่นประมาณร้อยละ 70-80 จึงทำการ subculture ด้วยการใส่ 0.25% trypsin-EDTA 500 ไมโครลิตร (Gibco, Grand Island, USA) ในภาชนะเลี้ยงเซลล์เข้าตู้อบรอ 3 นาที จากนั้นแบ่งไปในภาชนะเลี้ยงเซลล์อันใหม่แล้วใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ โดยใช้เซลล์ไฟโบร بلاสต์แอล 929 ลำดับที่ 151-152 และเซลล์ไฟโบร بلاสต์ของเอ็นยิดปริทันต์ในมนุษย์ ลำดับที่ 13-14 ในการทดลอง

2.1.2. ใส่เซลล์ไฟโบร بلاสต์แอล 929 และเซลล์ไฟโบร بلاสต์ของเอ็นยิดปริทันต์ในมนุษย์ในจานเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม จำนวน 8,000 เซลล์ต่อหลุม จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ลงไป 100 ไมโครลิตร ในวันถัดมาให้ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เดิมออก เตรียมสารละลายโกรทแฟคเตอร์โดยนำไฟโบร بلاสต์โกรทแฟคเตอร์ 2 จากพีซลักษณะเป็นผงแช่แข็ง (Freeze Dried) ในบรรจุภัณฑ์มาละลายในน้ำบริสุทธิ์ (DI water) 1 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และนำมาเจือจางในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดดีเอ็มอีเอ็มที่มีส่วนผสม 2% FBS (Fetal Bovine Serum), 1% penicillin/streptomycin จนได้ความเข้มข้นที่ 1.56, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 และ 200 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เตรียมสารละลายปริมาตร 100 ไมโครลิตรในแต่ละหลุม ทำการทดสอบค่าความมีชีวิตของเซลล์ด้วยวิธีวิเคราะห้เอ็มทีทีในวันที่ 2 ของการทดลอง ทำการทดลองในแต่ละกลุ่มซ้ำ 3 ครั้ง (triplicate)

2.2. การสังเคราะห์ไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกที่มีการพอลิเมอไรเซชันโดยแสงสีฟ้า

ในการศึกษานี้จะได้ไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกที่มีการพอลิเมอไรเซชันจากการบ่มโดยแสงสีฟ้าตามสูตรของ Chaopanitcharoen และคณะ (2021)⁽¹⁴⁾

2.2.1. โดยนำกรดไฮยาโลโรนิก น้ำหนักโมเลกุล 47 กิโลดาลตัน ไปละลายใน Potassium phosphate buffer (Kemas, Sydney, Australia) สัดส่วน 1% โดยน้ำหนัก ในสถานะที่มีค่า $\text{pH} \geq 8$

2.2.2. หยด methacrylic anhydride (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) สัดส่วนเชิงมวล 1:10 ต่อ HA monomer ลงในสารละลายที่มีอุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส และควบคุมให้เกิดปฏิกิริยาขึ้นในช่วงอุณหภูมิ 0-4 องศาเซลเซียส จากนั้นจะมีการปรับค่า pH ของสารทั้ง 2 สถานะให้มีค่า 8-10 โดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 5 โมลาร์

2.2.3. ปล่อยให้ปฏิกิริยาดำเนินต่อไป 8 ชั่วโมงแรกที่อุณหภูมิ 0-4 องศาเซลเซียส ซึ่งต้องทำการตรวจสอบและปรับค่า pH ตลอด

2.2.4. นำสารละลายมาแก้วบนเครื่องผสมสารแบบแม่เหล็ก (magnetic stirrer) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนครบ 24 ชั่วโมง

2.2.5. ทำการกรองสารละลายโดยใช้ถุงกรอง SnakeSkin Dialysis Tubing ที่มี ความจุ 3.7 มิลลิลิตรต่อเซนติเมตร ยาว 30 เซนติเมตร 1 ถุง นำไปแช่น้ำร้อนเป็นเวลา 2 นาทีและ แช่น้ำที่อุณหภูมิห้องอีก 10 นาที พับปลายถุง 2 ทบแล้วหนีบปลายไว้ไม่ให้มีรอยรั่ว

2.2.6. นำสารละลายข้างต้นมาเทใส่ถุงกรอง พับปากถุงแล้วหนีบไม่ให้มีรอยรั่ว บริเวณปลาย 2 ฝั่งเข้าหากัน ติดกับเครื่องมือลอยน้ำ (Floating device)

2.2.7. แช่น้ำอัลตราเพียวขนาดปริมาตร 3 ลิตร จากนั้นนำไปติดตั้งบนเครื่องผสมสารแบบแม่เหล็กเป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยทำการเปลี่ยนน้ำ อัลตราเพียว 10 ครั้ง

2.2.8. นำสารละลายที่ได้ไปปั่นด้วยเครื่อง Centrifuge (BioSan, Riga, Latvia) ที่ ความเร็ว 10,000 รอบ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนที่ตกตะกอนออก ส่วนของเหลวนำไปแช่ไนโตรเจนเหลวทันที

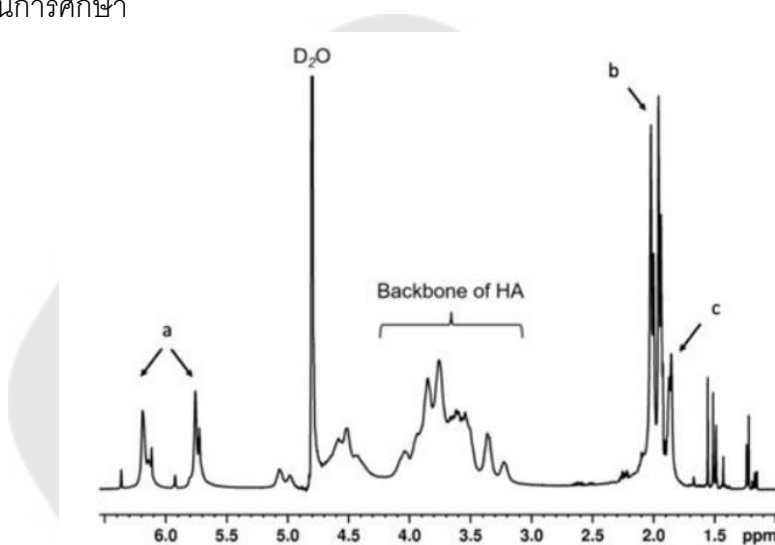
2.2.9. นำไปแช่แห้งแบบเยือกแข็ง (freeze-dried technique or lyophilization; Labconco, Missouri, USA) ใช้เวลา 3 วัน สารละลายจะถูกระเหิดออกเหลือเป็นร่างแหของเมทาคริลเลตไฮยาโลโรนิกที่มีลักษณะคล้ายฟองน้ำ

2.2.10. ทำการแบ่งไฮโดรเจลจากกรดไฮยาโลโรนิกที่ถูกเมทาคริลเลตมา 13 มิลลิกรัม ทำการเติมดิวทีเลียม (Deuterium; D_2O) ลงไป 0.5 มิลลิลิตร แล้วดูตามาส์หลอด NMR ให้สารละลายสูงอย่างน้อย 4 เซนติเมตร ทำการปิดจุกให้แน่นแล้วเขียนชื่อและวันที่บริเวณหลอด

2.2.11. นำไปตรวจดูปริมาณการเกิดการปรับปรุงของโครงสร้าง (Degree of modification) ของกรดไฮยาลูโรนิกด้วยเทคนิคโปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโคปี (1H-NMR spectroscopy) ผลที่ได้จะเป็นกราฟ ซึ่งสามารถนำค่าจากกราฟดังกล่าวประกอบ 4 มาคำนวณหาปริมาณการเกิดการปรับปรุงได้จากสูตร

$$\text{Degree of modification} = \frac{a \times \frac{3}{2}}{c - (a \times \frac{3}{2})} \times 100$$

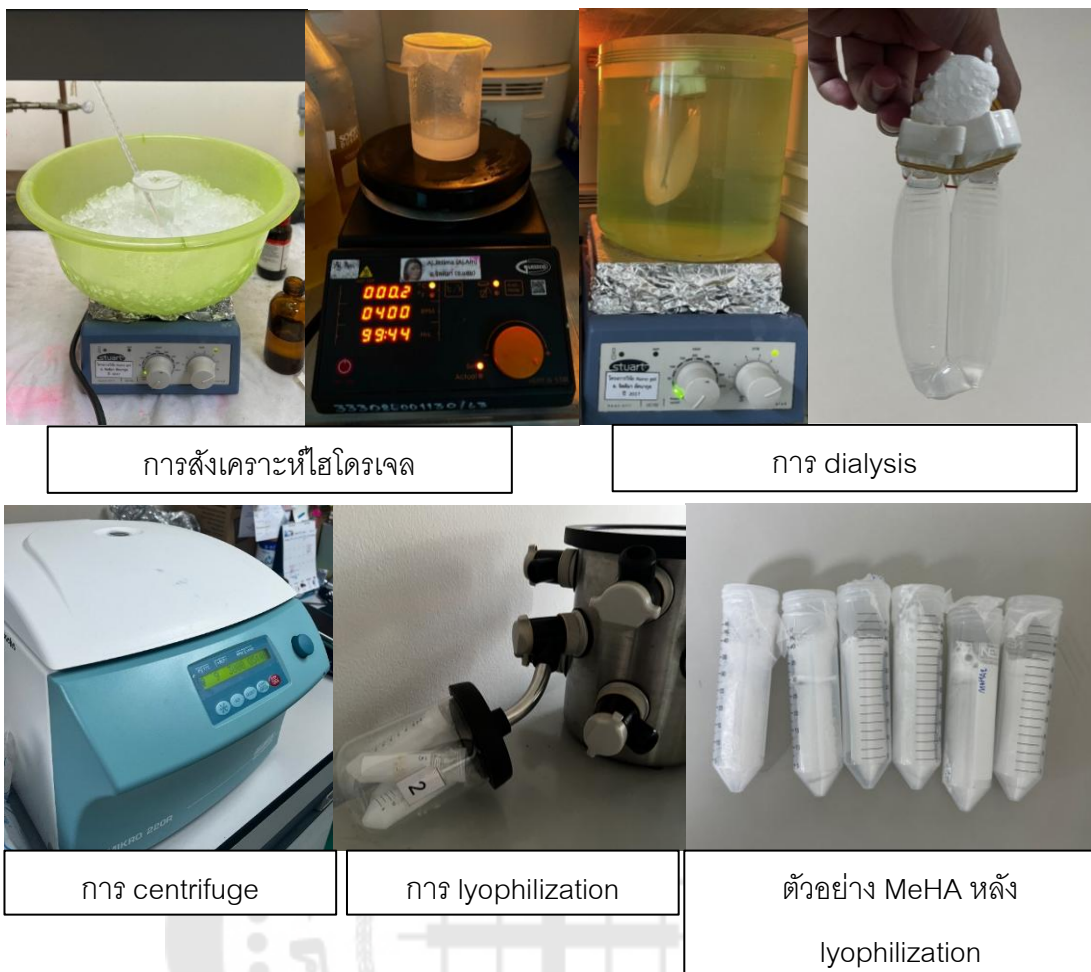
ในการศึกษาก่อนหน้านี้ได้แนะนำให้ Degree of modification $\geq 40\%$ จึงนำมาใช้ในการศึกษา



ภาพประกอบ 4 กราฟแสดงผลของการทำโปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโคปีของไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกที่ถูกเมทาคริเลต

2.2.12. ก่อนนำมาใช้ต้องทำการฆ่าเชื้อก่อนด้วยการนำไปแช่ 99.99%เอทิลแอลกอฮอล์ (Ethyl alcohol) เป็นเวลา 10 นาทีจากนั้นนำไปอบรังสีอัลตราไวโอเลตภายในตู้ปลอดเชื้อต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมงจะได้ไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกที่ถูกเมทาคริเลตพร้อมนำไปใช้

2.2.13. ผสมสารละลายลิเทียมฟีนิลไตรเมทิลเบนโซอิลฟอสฟิเนต (lithium phenyl-2,4,6-trimethyl benzoylphosphinate : LAP) ความเข้มข้น 15 mg/L ต่อ methylated hydrogel polymer ความเข้มข้น 100 mg/L ในการผสมสารละลายไฮโดรเจลจะทำภายใต้ตู้ปลอดเชื้อ



ภาพประกอบ 5 ขั้นตอนการสังเคราะห์ไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกที่ถูกเมทาคริลเลต (MeHA hydrogel)

2.3. การศึกษาระยะเวลาในการก่อตัวเป็นเจลของไฮโดรเจล

ระยะเวลาในการก่อตัวเป็นเจล คือ ระยะเวลาที่ใช้ในการเปลี่ยนแปลงจาก sol-phase ไปเป็น gel-phase โดยจะนำสารละลายไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกที่มีการพอลิเมอร์ไรเซชันโดยแสงสีฟ้า ปริมาตร 50 ไมโครลิตร หยดบนกระดาษพาราฟิล์ม (Parafilm; Bemis, Neenah, USA) จากนั้นจึงทำการบ่มโดยแสงสีฟ้าโดยใช้เครื่องฉายแสงรุ่น R Max Cure 9 ซึ่งเป็นเครื่องที่ให้แสงความยาวคลื่น 480 นาโนเมตร ความเข้มแสง 1,800 มิลลิวัตต์ต่อตารางเซนติเมตร ห่างจากพื้นผิวสารละลายไฮโดรเจลเป็นระยะ 1 เซนติเมตร ในช่วงเวลา 30, 60, 90 และ 120 วินาที โดยกำหนดระยะเวลาในการใช้แสงสีฟ้าอ้างอิงมาจากการวิจัยก่อนหน้า⁽¹⁴⁾ โดยชุดวิจัยในแต่ละช่วงเวลาจะทำการทดสอบซ้ำช่วงระยะเวลาละ 3 ครั้ง (triplicate) โดย หลังจากครบเวลาแล้วคว่ำกระดาษพาราฟิล์มกลับหัวลง โดยเจลที่ได้สามารถต้านแรงโน้มถ่วงจากน้ำหนักของตัวไฮโดรเจลเองได้นานมากกว่า 30 วินาที จะถือว่าสารผสมนี้ก่อตัวเป็นเจลแล้ว

2.4.ทำไฮโดรเจลให้แห้ง

มีการนำสารละลายไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกที่มีการพอลิเมอไรเซชันโดยแสงสีฟ้าใส่เอฟเฟนดอร์ฟที่ปริมาตร 40, 50 และ 200 ไมโครลิตรที่ได้รับการบ่มโดยแสงสีฟ้าเป็นระยะเวลา 90 วินาที จากข้อสรุปการทดลองของ Chaopanitcharoen และคณะ (2021) นำไปแช่แห้งแบบเยือกแข็งอีกครั้งเป็นระยะเวลา 2 วัน

2.5.การศึกษาการพองตัวของไฮโดรเจล

นำไฮโดรเจลแบบแห้ง (Freeze dried MeHA hydrogel) ที่ปริมาตร 200 ไมโครลิตรไปแช่ให้พองใน PBS ปริมาตร 3 มิลลิตรและอีกกลุ่มการทดลองได้แช่ใน PBS ที่ผสมไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์ 2 ความเข้มข้น 25 นาโนกรัมต่อมิลลิตร ปริมาตร 3 มิลลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทำซ้ำ 3 ตัวอย่างในแต่ละกลุ่มการทดลอง แล้วชั่งน้ำหนักเจลที่ช่วงเวลาต่างๆกันดังนี้ น้ำหนักก่อนแช่ PBS , น้ำหนักหลังแช่ PBS ไปแล้ว 5 นาที, 10 นาที, 20 นาที, 30 นาที, 1 ชั่วโมง, 2 ชั่วโมง, 4 ชั่วโมง, 6 ชั่วโมง, 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง จากนั้นนำมาคำนวณค่าอัตราการพองตัวของไฮโดรเจล (Swelling ratio) ตามสมการดังนี้

$$\% \text{ Swelling ratio} = \frac{M_s - M_d}{M_d} \times 100$$

โดย M_s คือ น้ำหนักตอนแช่ใน PBS ในเวลานั้น ส่วน M_d คือน้ำหนักตอนแห้ง

ส่วนไฮโดรเจลที่อิมเมอร์ใน PBS 48 ชั่วโมง นำมากำจัดน้ำส่วนเกินออกด้วยวิธีการแช่แห้งแบบเยือกแข็ง แล้วนำไฮโดรเจลที่แห้งมาชั่งน้ำหนักอีกครั้ง น้ำหนักของไฮโดรเจลขณะพองตัวเต็มที่ 2 วัน แทนด้วย M_s น้ำหนักของไฮโดรเจลแห้ง แทนด้วย M_d แล้วนำมาคำนวณเพื่อหาค่าร้อยละของปริมาณน้ำในไฮโดรเจลหลังจากการพองตัว (Water content) 2 วันตามสมการดังนี้

$$\% \text{ Water content} = \frac{M_s - M_d}{M_s} \times 100$$

จากนั้นนำไปหาค่าอัตราส่วนการพองตัวของเจลโดยมวล (Mass swelling ratio ; Q_m) โดยใช้สมการดังนี้

$$Q_m = \frac{M_s}{M_d}$$

และคำนวณหาอัตราส่วนการพองตัวของไฮโดรเจลโดยปริมาตร (Volumetric based swelling ratio ; Q_v) โดยใช้สมการดังนี้

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

เมื่อ ρ_p คือความหนาแน่นของกรดไฮยาลูโรนิก และ ρ_s คือความหนาแน่นของ PBS

ซึ่งการศึกษาลักษณะการพองตัวของไฮโดรเจลแสดงถึงความสามารถในการกักเก็บน้ำโดยมักจะสอดคล้องกับความสามารถในการปลดปล่อยสารสำคัญ

2.6. การศึกษาการสลายตัวของไฮโดรเจล

นำไฮโดรเจลที่ผ่านทำให้แห้งปริมาตร 40 ไมโครลิตร มาผสมไฟโบรบลาสต์โกรทแฟคเตอร์ 2 ความเข้มข้น 25 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และสารละลายฟิปีเอสเป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง โดยทำกลุ่มละ 3 ตัวอย่าง โดยอ้างอิงจากการศึกษาของ Maturavongsadit P. และคณะในปี 2017⁽⁵⁰⁾ ตัวอย่างดังกล่าวจะถูกย่อยในเอ็นไซม์ไฮยาลูโรนิกเดส (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) 100 ยูนิตในสารละลาย PBS 400 ไมโครลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยจะเก็บสารละลายจากการทดลองทั้งหมดและเติมเอ็นไซม์ไฮยาลูโรนิกเดสในสารละลาย PBS ความเข้มข้นเท่าเดิมไปแทนที่ทุก 24 ชั่วโมง จนกว่าไฮโดรเจลจะละลายหมด จากนั้นเก็บสารละลายดังกล่าวในอุณหภูมิ -20 °C จนกว่าจะนำไปทดสอบต่อไป การทดสอบคาร์บาไฮล (Supelco, Bellefonte, USA) ใช้เพื่อหาปริมาณกรดยูโรนิกที่ปลดปล่อยออกมาขณะไฮโดรเจลเกิดการสลายตัว โดยนำสารละลายที่เก็บมาได้ 50 ไมโครลิตร แบ่งใส่ลงในหลอดเพเพนดอร์ฟตาม ช่วงเวลาที่เก็บมา จากนั้น นำโซเดียมเตตระโบเรต (sodium tetraborate; Kemaus, Sydney, Australia) ความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ ในกรดซัลฟูริก (QREC, New Zealand) ปริมาณ 200 ไมโครลิตร ใส่ในแต่ละหลอดและให้ความร้อนที่ 100 °C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นทิ้งให้เย็นตัวลงที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที เติม 0.125% คาร์บาไฮลในเอทานอลบริสุทธิ์ 50 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลอดและให้ความร้อนที่ 100 °C เป็นเวลาอีก 10 นาที และทิ้งให้เย็นตัวลงที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้น สารละลายจะถูกถ่ายลงในจานเลี้ยงเชื้อ 96 หลุม โดยแบ่งสารละลายจากเพเพนดอร์ฟมาหลุมละ 100 ไมโครลิตร และนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงในเครื่อง SpectraMax M2 Multi-Mode microplate reader (Molecular Devices) ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร โดยนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาหาเทียบเส้นกราฟมาตรฐาน (Standard curve) เพื่อหาปริมาณและคำนวณเป็นค่าร้อยละของกรดยูโรนิกที่สลายออกมา⁽⁵⁰⁾

2.7. ศึกษารูปแบบการปลดปล่อยของไฟโบรบลาสต์โกรทแฟคเตอร์ 2

นำไฮโดรเจลที่ผ่านการแช่แข็งปริมาตร 40 ไมโครลิตร มาผสมไฟโบรบลาสต์โกรทแฟคเตอร์ 2 ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง โดยทำกลุ่มละ 3 ตัวอย่าง จากนั้นนำไฮโดรเจลที่ผสมโกรทแฟคเตอร์มาแช่ในสารละลายฟิปีเอส จากนั้นทำการเก็บสารละลายออกมาแล้วใส่สารละลายฟิปีเอสเข้าไปใหม่ที่ 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120 นาที 24 ชั่วโมง และ 72 ชั่วโมง จากนั้นปริมาณโกรทแฟคเตอร์ที่ถูกปลดปล่อยนำมาวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี Coomassie Bradford⁽⁷²⁾ นำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงในเครื่อง SpectraMax M2 Multi-Mode microplate reader (Molecular Devices, San Jose, USA) ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร นำมาบันทึกเป็นกราฟเพื่อดูรูปแบบการปลดปล่อยโกรทแฟคเตอร์ของไฮโดรเจล

2.8. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายในโครงสร้างของไฮโดรเจล

ศึกษาผ่านกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด เพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายในโครงสร้างของไฮโดรเจล โดยมีวิธีการคือนำไฮโดรเจลที่ผ่านการแช่แข็งแบบเยือกแข็ง มาผสมไฟโบรบลาสต์โกรทแฟคเตอร์ 2 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ความเข้มข้น 25 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และสารละลายฟิปีเอสเป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง โดยทำกลุ่มละ 3 ตัวอย่าง จากนั้นนำไปแช่ในไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 30 นาที และนำไปเก็บไว้ในตู้ -80 องศาเซลเซียสเพื่อเตรียมนำไปแช่แข็งแบบเยือกแข็งเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ก่อนนำมาตัดตามแนวขวาง (cross section) เพื่อดูลักษณะโครงสร้างภายในและตามแนวยาว (longitudinal section) เพื่อดูลักษณะพื้นผิวภายนอก แล้วไปยัดกับแท่งเหล็กที่ปิดด้วยเทปคาร์บอน จากนั้นนำชิ้นตัวอย่างไปเคลือบด้วยทอง โดยจะทำการสุ่มพื้นที่ของชิ้นตัวอย่างเพื่อศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของตัวอย่างที่ศึกษา

3. การเก็บรวบรวมข้อมูล

1. ประเมินความมีชีวิตของเซลล์ไฟโบรบลาสต์แอล 929 และเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเอ็นยัดปริทัศน์ในมนุษย์ จากปริมาณการดูดกลืนของแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ในวิธีวิเคราะห์เอ็มทีทีและคำนวณค่าร้อยละความมีชีวิตของเซลล์โดยสูตร

$$\text{ค่าร้อยละความมีชีวิตของเซลล์} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสง (ตัวอย่าง)}}{\text{ค่าการดูดกลืนแสง (กลุ่มควบคุม)}} \times 100$$

2. ประเมินคุณสมบัติทางกายภาพของไฮโดรเจล ได้แก่

- 2.1 ประเมินระยะเวลาในการก่อตัวเป็นเจลของไฮโดรเจล
- 2.2 ประเมินการสลายตัวของไฮโดรเจล
- 2.3 ประเมินการพองตัวของไฮโดรเจล
- 2.4 ประเมินรูปแบบการปลดปล่อยของโกรทแฟคเตอร์
- 2.5 สังเกตและบรรยายลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไฮโดรเจลที่ศึกษาผ่านกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราดจากกลุ่มตัวอย่าง

4.สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

แบ่งออกเป็น 2 ส่วน

1.วิเคราะห์เชิงคุณภาพโดยใช้สถิติเชิงพรรณนา (Descriptive statistic)

อธิบายคุณสมบัติทางกายภาพของไฮโดรเจล ได้แก่ ระยะเวลาการก่อตัวเป็นเจล การสลายตัว รูปแบบการปลดปล่อยของโกรทแฟคเตอร์ และลักษณะทางสัณฐานวิทยา

2.วิเคราะห์เชิงปริมาณ

ใช้โปรแกรม GraphPad Prism 10 ในการวิเคราะห์ข้อมูล โดยใช้การทดสอบ Shapiro-Wilk test เพื่อตรวจสอบการกระจายตัวของข้อมูล และใช้การทดสอบ One-Way ANOVA วิเคราะห์หาความแตกต่างในกลุ่มทดลอง สถิติทั้งหมดคำนวณที่ระดับความเชื่อมั่น $p < 0.05$ ในส่วนของความมีชีวิตรอดของเซลล์

บทที่ 4

ผลการวิจัย

ผลการวิจัยครั้งนี้ได้เสนอตามลำดับหัวข้อดังนี้

ตอนที่ 1 การทดสอบความมีชีวิตของเซลล์ด้วยวิธีเอ็มทีที (MTT assay)

ตอนที่ 2 การสังเคราะห์ไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกที่มีการพอลิเมอไรเซชันโดยแสงสีฟ้า

ตอนที่ 3 ระยะเวลาในการก่อตัวเป็นเจลของไฮโดรเจล

ตอนที่ 4 การพองตัวของไฮโดรเจล

ตอนที่ 5 การสลายตัวของไฮโดรเจล

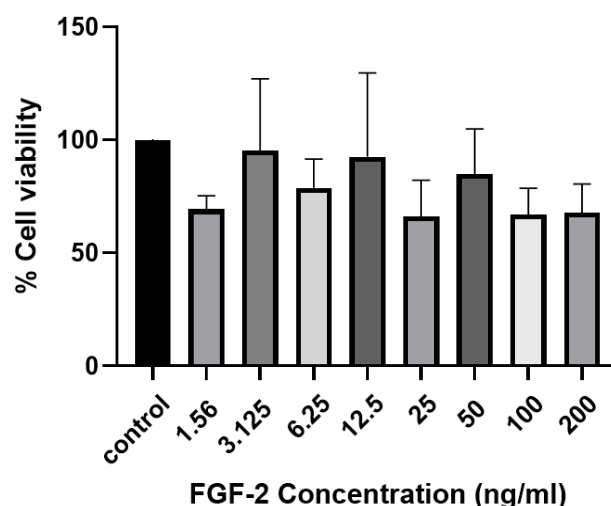
ตอนที่ 6 การปลดปล่อยโปรตีนของไฮโดรเจล

ตอนที่ 7 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาในโครงสร้างของไฮโดรเจล

ตอนที่ 1 การทดสอบความมีชีวิตของเซลล์ด้วยวิธีเอ็มทีที (MTT assay)

1.1.ผลการทดสอบความมีชีวิตของเซลล์ไฟโบรบลาสต์แอล 929 ด้วยวิธีเอ็มทีที

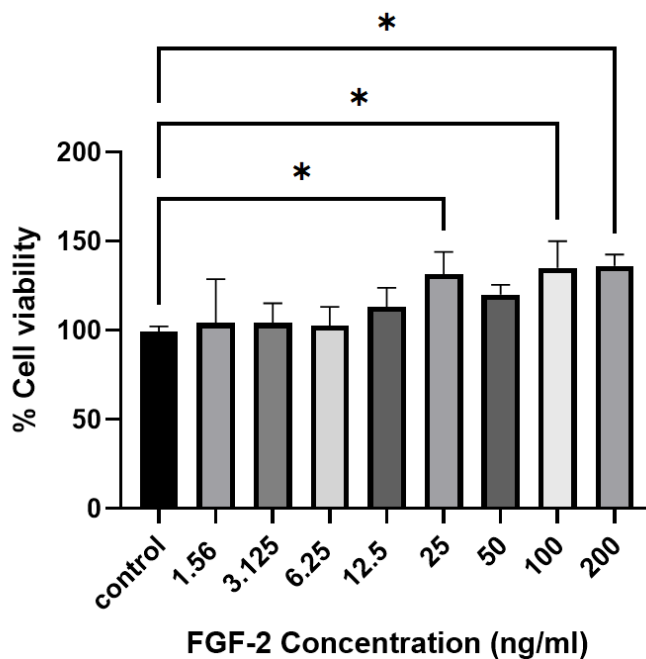
การทดสอบเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์แอล 929 บนจานเลี้ยงเซลล์ขนาด 96 หลุม โดยเติมไฟโบรบลาสต์โกรทแฟคเตอร์ 2 จากพีชในความเข้มข้น 1.56, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 และ 200 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ลงไป แล้วนำมาทดสอบความมีชีวิตของเซลล์ไฟโบรบลาสต์แอล 929 ด้วยวิธีวิเคราะห์เอ็มทีทีใน 48 ชั่วโมง จากผลการทดสอบ เมื่อนำค่าเฉลี่ยร้อยละความมีชีวิตของเซลล์โดยมีกลุ่มควบคุมคือกลุ่มที่ไม่เติมไฟโบรบลาสต์โกรทแฟคเตอร์ 2 พบว่าค่าร้อยละความมีชีวิตของเซลล์เป็น 100% และกลุ่มที่เติมไฟโบรบลาสต์โกรทแฟคเตอร์ 2 ในความเข้มข้น 1.56, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 และ 200 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าค่าร้อยละความมีชีวิตของเซลล์ได้แก่ $69.32 \pm 6.02\%$, $95.34 \pm 31.77\%$, $78.86 \pm 12.75\%$, $95.6 \pm 37.09\%$, $66.14 \pm 16.07\%$, $84.88 \pm 20.05\%$, $67.06 \pm 11.61\%$ และ $67.77 \pm 12.83\%$ ตามลำดับ พบว่าในทุกความเข้มข้นของไฟโบรบลาสต์โกรทแฟคเตอร์สามารถพบความมีชีวิตของเซลล์ไฟโบรบลาสต์แอล 929 ได้ แต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในแต่ละความเข้มข้น (ภาพประกอบ 6)



ภาพประกอบ 6 แผนภูมิแสดงค่าดูดกลืนแสงของเซลล์ไฟโบรบลาสต์แอล 929 ที่มีความเข้มข้นของไฟโบรบลาสต์โกรทแฟคเตอร์ 2 ที่แตกต่างกันใน 48 ชั่วโมง

1.2.ผลการทดสอบความมีชีวิตของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเอ็นยิดปริทันต์ในมนุษย์ด้วยวิธีเอ็มทีที (MTT assay)

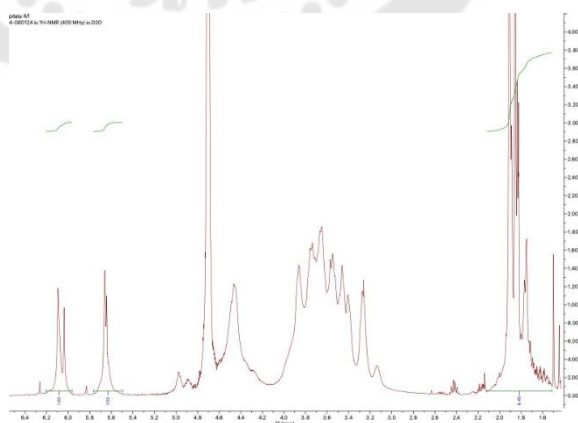
การทดสอบเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเอ็นยิดปริทันต์ในมนุษย์บนจานเลี้ยงเซลล์ขนาด 96 หลุม โดยเติมไฟโบรบลาสต์โกรทแฟคเตอร์ 2 จากพีซีในความเข้มข้น 1.56, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 และ 200 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ลงไป แล้วนำมาทดสอบความมีชีวิตของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเอ็นยิดปริทันต์ในมนุษย์ ด้วยวิธีวิเคราะห์เอ็มทีที ใน 48 ชั่วโมง จากผลการทดสอบ เมื่อนำค่าเฉลี่ยร้อยละความมีชีวิตของเซลล์โดยมีกลุ่มควบคุมคือกลุ่มที่ไม่เติมไฟโบรบลาสต์โกรทแฟคเตอร์ 2 พบว่าค่าร้อยละความมีชีวิตของเซลล์เป็น 100% และกลุ่มที่เติมไฟโบรบลาสต์โกรทแฟคเตอร์ 2 ในความเข้มข้น 1.56, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 และ 200 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าค่าร้อยละความมีชีวิตของเซลล์ได้แก่ $104.19 \pm 24.53\%$, $104.25 \pm 10.93\%$, $102.75 \pm 10.54\%$, $113.19 \pm 10.73\%$, $131.56 \pm 12.47\%$, $120.06 \pm 5.46\%$, $135.06 \pm 15.09\%$ และ $136.19 \pm 6.41\%$ ตามลำดับ พบว่าในทุกความเข้มข้นของไฟโบรบลาสต์โกรทแฟคเตอร์สามารถพบความมีชีวิตของเซลล์ไฟโบรบลาสต์แอล 929 ได้ และมีค่าเฉลี่ยของค่าร้อยละความมีชีวิตของเซลล์มากกว่ากลุ่มควบคุม จากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่ากลุ่มความเข้มข้นที่ 25, 100 และ 200 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร มีความแตกต่างกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพประกอบ 7)



ภาพประกอบ 7 แผนภูมิแสดงค่าดูดกลืนแสงของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเอ็นยีดปรีทันตีในมนุษย์ที่มีความเข้มข้นของไฟโบรบลาสต์โกรทแฟคเตอร์ 2 ที่แตกต่างกันใน 48 ชั่วโมง เมื่อ * หมายถึงแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ตอนที่ 2 ผลการสังเคราะห์ไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกที่มีการพอลิเมอไรเซชันโดยแสงสีฟ้า

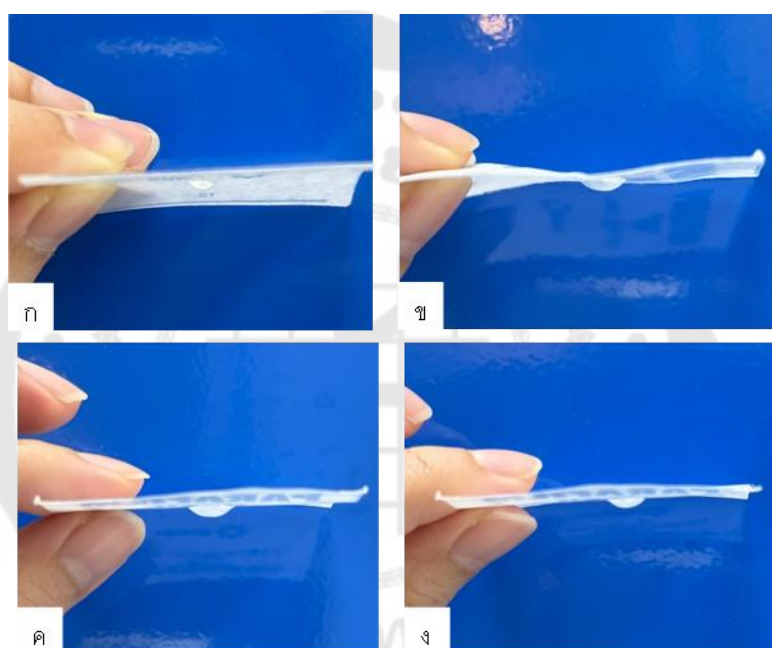
ในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยได้ทำการสังเคราะห์ไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกที่ถูกเมทาคริลเลตเป็นจำนวน 4 ครั้ง โดยทำการทดสอบหาปริมาณการเกิดการปรับปรุงโครงสร้างด้วยวิธีโปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโคปี (ภาพประกอบ 8) พบว่าการสังเคราะห์ 4 ครั้งได้ผลค่าปริมาณการเกิดการปรับปรุงโครงสร้างร้อยละ 100, 78, 84 และ 59 ตามลำดับ ซึ่งเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนดไว้ว่าไฮโดรเจลที่ใช้ในการศึกษาต้องมีค่าปริมาณการเกิดการปรับปรุงโครงสร้างมากกว่าร้อยละ 40



ภาพประกอบ 8 แสดงตัวอย่างผลที่ได้จากการวัดปริมาณการเกิดการปรับปรุงโครงสร้างด้วยวิธีโปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโคปีในการสังเคราะห์ไฮโดรเจล

ตอนที่ 3 ระยะเวลาในการก่อตัวเป็นเจลของไฮโดรเจล

จากการศึกษาระยะเวลาในการก่อตัวเป็นเจลด้วยการหยดสารละลายไฮโดรเจลที่ได้จากการผสมสารละลายไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกที่ถูกเมทาคริลิต ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร รวมกับสารละลายแอลเอพี ความเข้มข้น 15 มิลลิกรัมต่อลิตร นำมาหยดบนกระดาษพาราฟิล์ม ปริมาตร 50 ไมโครลิตร แล้วบ่มโดยแสงสีฟ้าเป็นระยะเวลา 30, 60, 90 และ 120 วินาที จากนั้นพลิกกระดาษพาราฟิล์มแล้วสังเกต ผลพบว่าเจลทั้ง 4 ช่วงเวลาสามารถก่อตัวเป็นเจลได้ โดยสามารถต้านทานแรงโน้มถ่วงจากน้ำหนักของเจลเองได้มากกว่า 30 วินาที (ภาพประกอบ 9)



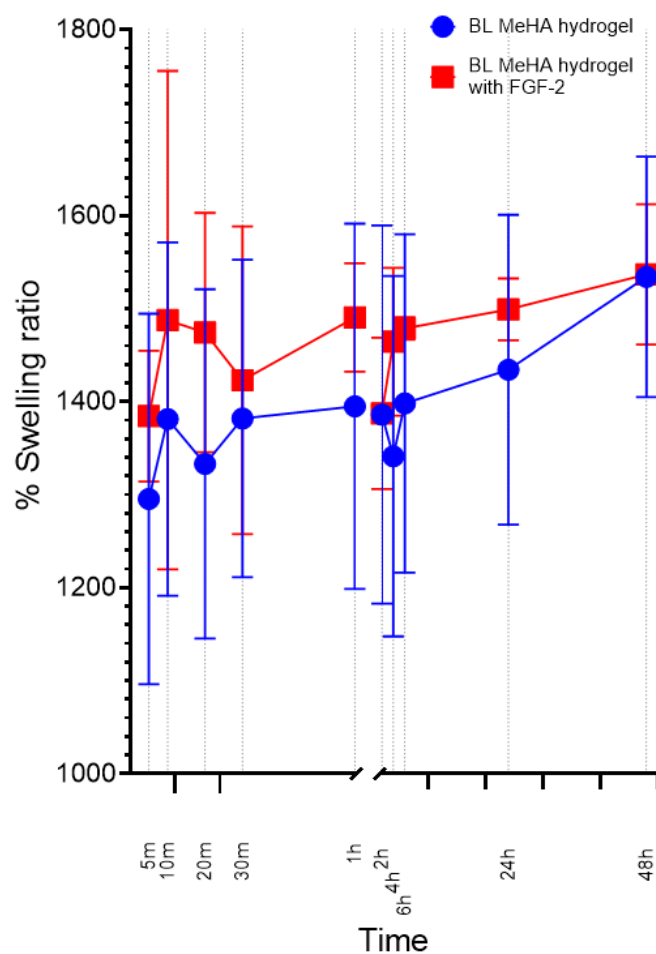
ภาพประกอบ 9 แสดงผลการทดสอบการก่อตัวเป็นเจลในแต่ละช่วงเวลา

(ก) บ่มโดยแสงสีฟ้า 30 วินาที (ข) บ่มโดยแสงสีฟ้า 60 วินาที

(ค) บ่มโดยแสงสีฟ้า 90 วินาที (ง) บ่มโดยแสงสีฟ้า 120 วินาที

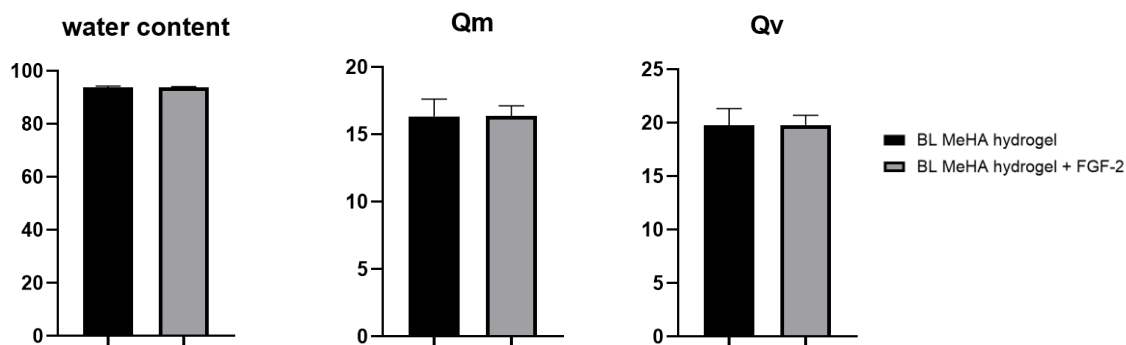
ตอนที่ 4 ผลการทดสอบการพองตัวของไฮโดรเจล

ผลการทดลองพบว่าการพองตัวของไฮโดรเจลกลุ่มที่ผสมโกรทแฟคเตอร์และที่ไม่ผสมโกรทแฟคเตอร์ ในช่วงแรกอย่างรวดเร็วในช่วง 10 นาทีแรก จากนั้นการพองตัวจะเริ่มช้าลง แสดงจากน้ำหนักที่มามากจนครบ 48 ชม. ทั้งสองกลุ่มมีค่าเฉลี่ยอัตราการพองตัวมากกว่า 1200 เปอร์เซ็นต์ และหากเทียบอัตราการพองตัวของไฮโดรเจลในกลุ่มที่ผสมโกรทแฟคเตอร์นั้นจะมีแนวโน้มมากกว่ากลุ่มที่ไม่ผสมโกรทแฟคเตอร์เล็กน้อย (ภาพประกอบ 10)



ภาพประกอบ 10 แสดงสัดส่วนการพองตัวของไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกที่ถูกเมทาคริลิตตามช่วงระยะเวลาที่ซังน้ำหนักหลังแช่ PBS ในหน่วยชั่วโมง

และพบว่าไฮโดรเจลในกลุ่มที่ผสมโกรทแฟคเตอร์และกลุ่มที่ไม่ผสมโกรทแฟคเตอร์มีความสามารถในการดูดน้ำเข้าสู่เจล ประมาณร้อยละ 93.88 ± 0.002 และ 93.86 ± 0.004 ตามลำดับ ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกัน ในส่วนของอัตราส่วนการพองตัวเชิงมวล (Qm) และอัตราส่วนการพองตัวเชิงปริมาตร (Qv) เป็นดังนี้ กลุ่มที่ผสมโกรทแฟคเตอร์ Qm $\sim 16.37 \pm 0.75$, Qv $\sim 19.79 \pm 0.91$ กลุ่มที่ไม่ผสมโกรทแฟคเตอร์ Qm $\sim 16.34 \pm 1.29$, Qv $\sim 19.76 \pm 1.58$ (ภาพประกอบ 10) จึงสรุปได้ว่าคุณสมบัติการพองตัวของไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกที่ถูกเมทาคริลิตในกลุ่มที่ผสมโกรทแฟคเตอร์และกลุ่มที่ไม่ผสมโกรทแฟคเตอร์ไม่แตกต่างกัน



ภาพประกอบ 11 แสดงปริมาณน้ำ, อัตราส่วนการพองตัวเชิงมวลและอัตราส่วนการพองตัวเชิงปริมาตรของไฮโดรเจล

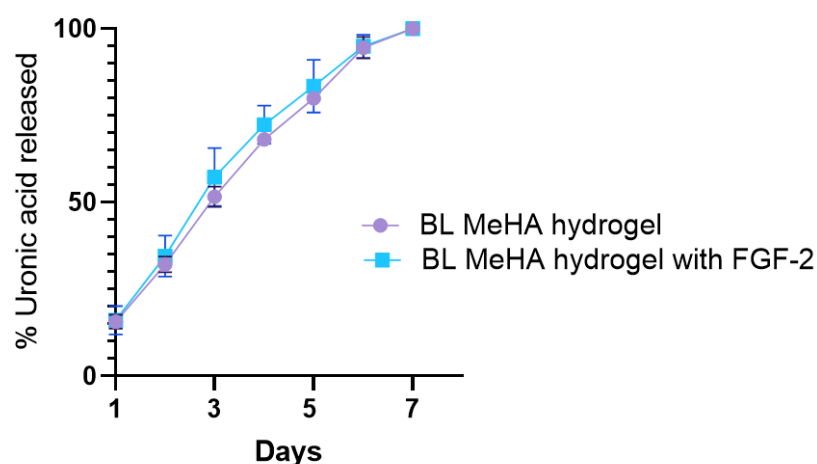
ตอนที่ 5 ผลการสลายตัวของไฮโดรเจล

จากผลการทดลองพบว่าเมื่อมีการใส่ไฮยาลูโรนิก 100 ยูนิต ลงไฮโดรเจลที่ผสมโกรทแฟคเตอร์และไม่ผสมโกรทแฟคเตอร์ สามารถละลายตัวได้หมดในเวลาประมาณ 7 วัน โดยวัดค่าการดูดกลืนแสง (ตาราง 3) ได้ผลดังนี้

ตาราง 2 แสดงค่าดูดกลืนแสงที่วัดได้จากสารละลายไฮยาลูโรนิก 100 ยูนิตในกลุ่มที่ผสมและไม่ผสมโกรทแฟคเตอร์

ระยะเวลาในการเก็บสารละลาย (วัน)	กลุ่มที่ไม่ผสมโกรทแฟคเตอร์	กลุ่มที่ผสมโกรทแฟคเตอร์
1	0.365±0.058	0.365±0.062
2	0.371±0.038	0.403±0.041
3	0.423±0.047	0.466±0.037
4	0.376±0.044	0.352±0.057
5	0.309±0.055	0.289±0.069
6	0.345±0.029	0.295±0.067
7	0.206±0.052	0.198±0.051

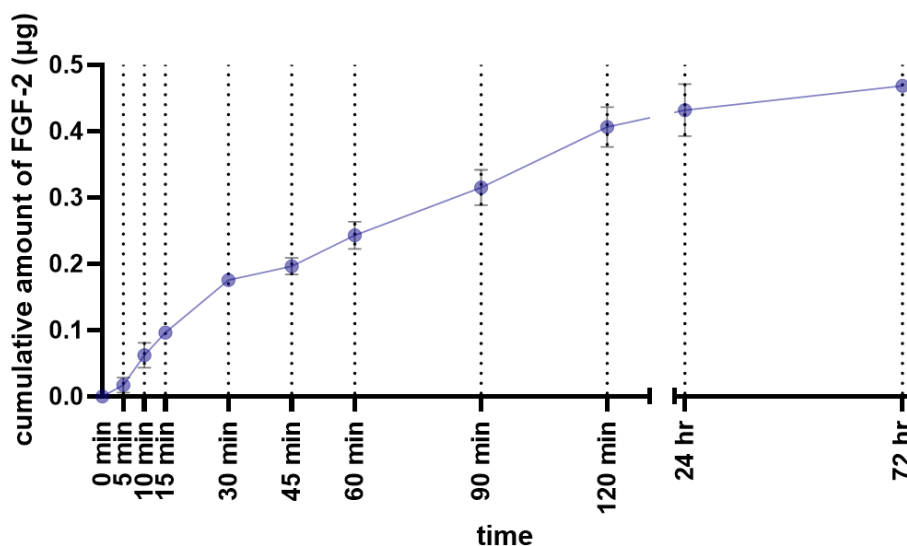
แล้วนำไปเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อหาปริมาณกรดยูโรนิกที่สลายออกมาพบว่ามีค่าใกล้เคียงกันระหว่างกลุ่มที่ผสมโกรทแฟคเตอร์และไม่ผสมโกรทแฟคเตอร์ โดยค่าสะสมของกรดยูโรนิกที่สลายออกมาในวันที่ 1,2,3,4,5,6 และ 7 ของการทดลอง กลุ่มที่ผสมโกรทแฟคเตอร์ได้แก่ $16.01 \pm 4.13\%$, $34.55 \pm 5.95\%$, $57.25 \pm 8.41\%$, $72.41 \pm 5.54\%$, $83.47 \pm 7.57\%$, $94.92 \pm 3.36\%$ และ 100% อีกกลุ่มที่ไม่ผสมโกรทแฟคเตอร์ได้แก่ $15.62 \pm 2.03\%$, $32.11 \pm 2.26\%$, $51.65 \pm 2.98\%$, $68.11 \pm 1.84\%$, $79.97 \pm 1.20\%$, $94.55 \pm 3.13\%$ และ 100% (ภาพประกอบ 12)



ภาพประกอบ 12 รูปแบบการสลายตัวของไฮโดรเจลโดยคำนวณเป็นค่าร้อยละปริมาณกรดยูโรนิกที่ปล่อยออกมา

ตอนที่ 6 ผลรูปแบบการปลดปล่อยโกรทแฟคเตอร์ในไฮโดรเจล

เมื่อนำสารละลายพีบีเอสที่เก็บได้จากการนำไฮโดรเจลที่ผสมโกรทแฟคเตอร์มาแช่ในสารละลายพีบีเอส ที่ระยะเวลา 5,10,15,30,45,60,90,120, 24 ชั่วโมง และ 72 ชั่วโมง มาทดสอบหาปริมาณโกรทแฟคเตอร์ที่ปลดปล่อยออกมาจากไฮโดรเจล โดยใช้สารละลาย Coomassie brilliant blue แล้วมาวัดค่าดูดกลืนแสง พบว่ามีค่าโกรทแฟคเตอร์สะสมอยู่ที่ $3.47 \pm 2.25\%$, $12.47 \pm 3.78\%$, $19.27 \pm 0.46\%$, $35.13 \pm 1.47\%$, $39.33 \pm 2.54\%$, $48.6 \pm 4.10\%$, $63 \pm 5.39\%$, $81.27 \pm 6.02\%$, $86.4 \pm 7.83\%$ และ $93.73 \pm 0.3\%$ ตามลำดับ ในช่วง 30 นาทีแรกมีการปลดปล่อยของโกรทแฟคเตอร์อย่างรวดเร็ว (initial burst) หลังจากนั้นมีการปลดปล่อยอย่างต่อเนื่อง (sustained release) ในอัตราที่ช้าลงอย่างคงที่ในช่วง 30 ถึง 120 นาที แต่ยังคงมีการปล่อยสารออกมาเรื่อยๆ ตลอดระยะเวลา 72 ชั่วโมงของการทดลอง (ภาพประกอบ 13)

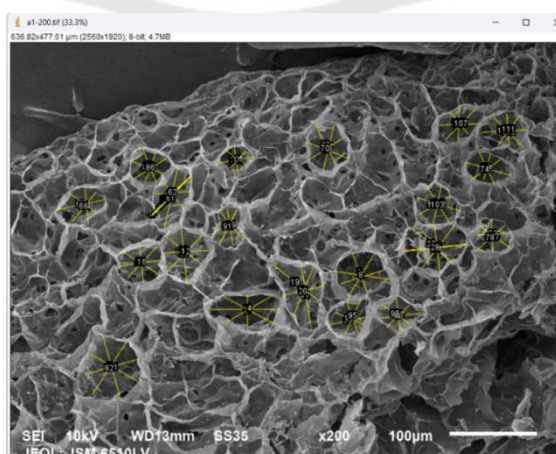


ภาพประกอบ 13 รูปแบบการปลดปล่อยโกรทแฟคเตอร์ของไฮโดรเจลแสดงเป็น
ค่าปริมาณสะสมของไฟโบรบลาสต์โกรทแฟคเตอร์ 2 ใน 72 ชั่วโมง

ตอนที่ 7 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาในโครงสร้างของไฮโดรเจล

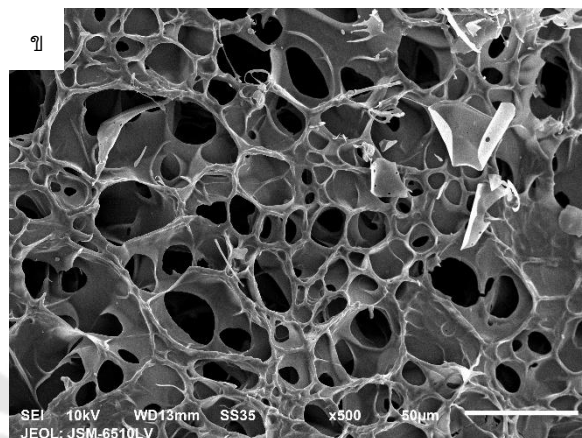
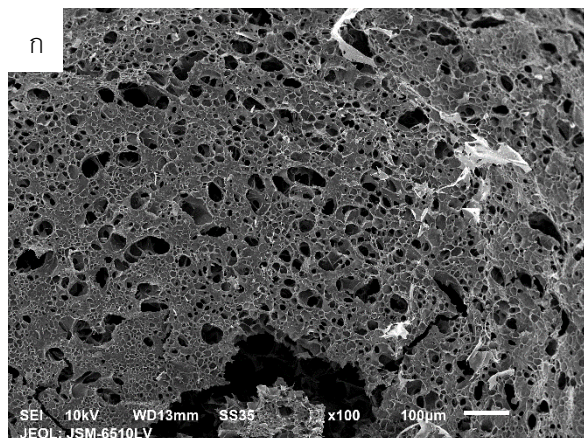
จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายในโครงสร้างของไฮโดรเจลผ่านกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด พบว่าความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางรูพรุนของไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกที่ถูกเมทาคริเลตที่ถูกบ่มโดยแสงสีฟ้าเป็นระยะเวลา 90 วินาที ผ่านโปรแกรม ImageJ (ภาพประกอบ 14) พบว่าค่าเฉลี่ยอยู่ที่ประมาณ 38 และ 45 ไมครอน ในกลุ่มที่ผสมโกรทแฟคเตอร์ และไม่ผสมโกรทแฟคเตอร์ตามลำดับ

พบว่าพื้นผิวของไฮโดรเจลทั้งกลุ่มที่ผสมด้วยโกรทแฟคเตอร์และกลุ่มใส่เพียงสารละลายพีบีเอส มีลักษณะคล้ายคลึงกัน โดยโครงสร้างภายในและพื้นผิวของไฮโดรเจลทั้งสองกลุ่มมีลักษณะเป็นรูพรุน (porous formation) และมีความไม่สม่ำเสมอของรูพรุนโดยทั่วไป (ภาพประกอบ 15-18)



ภาพประกอบ 14 แสดงตัวอย่างการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางรูพรุนของไฮโดรเจล
ด้วยโปรแกรม ImageJ

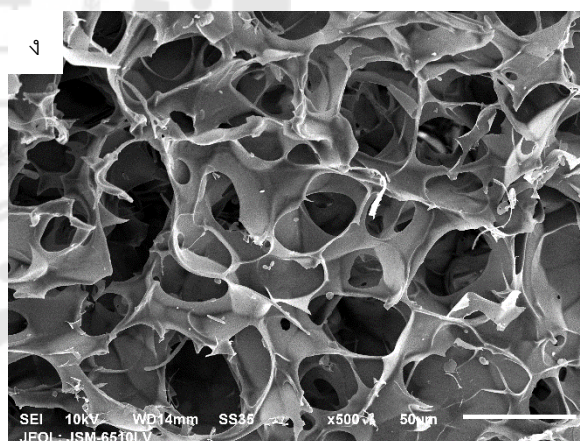
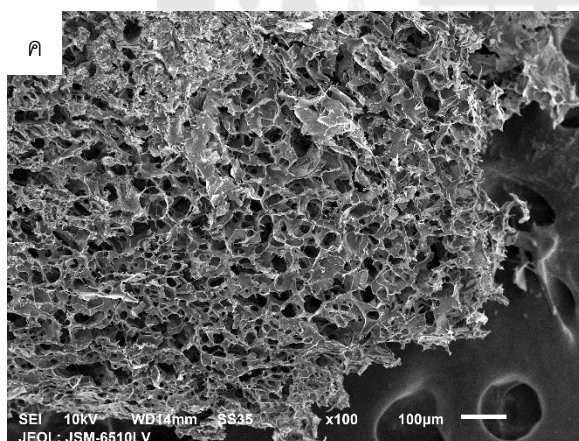
ภาพส่วนพื้นผิว



ภาพประกอบ 15 ภาพส่วนพื้นผิว กลุ่มที่ผสมโกรทแฟคเตอร์

(ก) กำลังขยาย 100 เท่า (surface 100X)

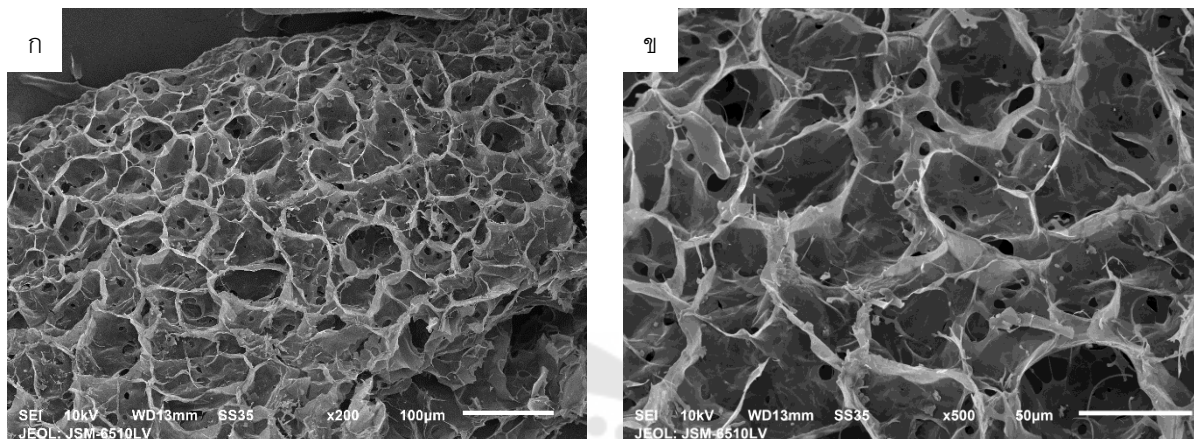
(ข) กำลังขยาย 500 เท่า (surface 500X)



ภาพประกอบ 16 ภาพส่วนพื้นผิว กลุ่มที่ไม่ผสมโกรทแฟคเตอร์

(ค) กำลังขยาย 100 เท่า (surface 100X) (ง) กำลังขยาย 500 เท่า (surface 500X)

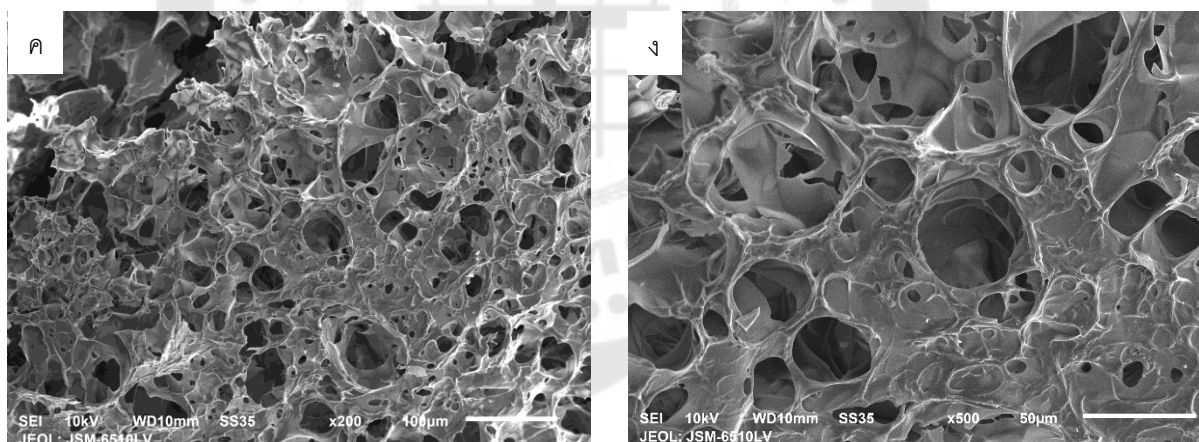
ภาพตัดขวาง



ภาพประกอบ 17 ภาพตัดขวางกลุ่มที่ผสมโกรทแฟคเตอร์

(ก) กำลังขยาย 200 เท่า (internal cross section 200X)

(ข) กำลังขยาย 500 เท่า (internal cross section 500X)



ภาพประกอบ 18 ภาพตัดขวางกลุ่มที่ไม่ผสมโกรทแฟคเตอร์

(ค) กำลังขยาย 200 เท่า (internal cross section 200X)

(ง) กำลังขยาย 500 เท่า (internal cross section 500X)

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผลและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาผลของไฟโบรบลาสต์โกรทแฟคเตอร์ 2 ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกันต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์แอล 929 และเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเอ็นอีดีปริทันต์ในมนุษย์ โดยใช้วิธีวิเคราะห์ความมีชีวิตของเซลล์คือเอ็มทีที และการศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพ ได้แก่ โครงสร้างการสลายตัว และรูปแบบการปลดปล่อยโกรทแฟคเตอร์ของไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกที่มีการพอลิเมอไรเซชันโดยแสงสีฟ้าที่ผสมไฟโบรบลาสต์โกรทแฟคเตอร์ 2 แบ่งหัวข้อการสรุปผลดังนี้

1. สรุปผลการวิจัย
2. อภิปรายผล
3. ข้อเสนอแนะ

สรุปผลการศึกษาวิจัย

ความเข้มข้นที่ต่างกันของไฟโบรบลาสต์โกรทแฟคเตอร์ 2 ไม่พบผลต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไฟโบรบลาสต์แอล 929 แต่กลับส่งผลต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเอ็นอีดีปริทันต์ในมนุษย์ โดยพบว่าที่ความเข้มข้น 25, 100 และ 200 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ส่งผลให้เซลล์มีการเพิ่มจำนวนอย่างมีนัยสำคัญที่ 48 ชั่วโมงของการทดลองเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p < 0.05$) จึงสามารถสรุปได้ว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของไฟโบรบลาสต์โกรทแฟคเตอร์ 2 คือ 25 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และคุณสมบัติทางกายภาพของไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกที่มีการพอลิเมอไรเซชันโดยแสงสีฟ้าที่ผสมไฟโบรบลาสต์โกรทแฟคเตอร์ 2 ไม่มีการเปลี่ยนแปลงแม้มีการผสมโกรทแฟคเตอร์โดยมีการพองตัวที่ดี สามารถสลายตัวได้ในระยะเวลา 7 วัน และมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่เหมาะสม โดยมีรูพรุน เส้นผ่านศูนย์กลางรูพรุนเหมาะสมกับการเจริญเติบโตของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ อีกทั้งรูปแบบการปลดปล่อยของโกรทแฟคเตอร์ มีลักษณะการปลดปล่อยอย่างรวดเร็วในช่วง 30 นาทีแรก และมีการปลดปล่อยอย่างต่อเนื่องในอัตราที่ช้าลงหลังจากนั้น

อภิปรายผล

ไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกเป็นโครงร่างทางชีวภาพที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย นำไปใช้ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อ เนื่องจากมีคุณสมบัติที่โดดเด่นหลายประการ เช่น มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพสูง คุณสมบัติทางกายภาพที่สามารถปรับแต่งได้ มีความสามารถในการนำส่งสารและย่อย

สลายได้ เป็นต้น^(11, 73, 74) ทางผู้วิจัยจึงมีความมุ่งหมายในการพัฒนาไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกที่มีการพอลิเมอไรเซชันโดยแสงสีฟ้าให้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ทางคลินิกได้ในอนาคต อันนำมาซึ่งประโยชน์สูงสุดของผู้ป่วย

การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ผู้วิจัยเริ่มจากการทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสม ผลที่ได้จากการทดสอบความมีชีวิตของเซลล์ทั้งสองชนิดกับความเข้มข้นที่แตกต่างกันของไฟโบรลาสต์โกรทแฟคเตอร์ 2 ด้วยวิธีวิเคราะห้เอ็มทีที เป็นการศึกษาที่นิยมใช้กัน ซึ่งจะเกิดกระบวนการดังกล่าวกับเซลล์ที่มีชีวิตอยู่โดยการวัดปริมาณการเปลี่ยนแปลงของสีจากสีเหลืองของเอ็มทีทีเป็นผลิตภัณฑ์ม่วงของฟอร์มาซาน (formazan) ที่ไม่ละลายน้ำแต่สามารถละลายได้ใน dimethyl sulfoxide (DMSO) สารละลายสีที่ได้จะถูกวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร⁽⁷⁵⁾

ผลในการศึกษาค้นคว้าพบว่าค่าร้อยละความมีชีวิตของเซลล์ของไฟโบรลาสต์แอล 929 ในทางสถิติพบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในทุกกลุ่ม และผลการศึกษาค่าร้อยละความมีชีวิตของเซลล์ไฟโบรลาสต์ของเอ็นอีบีปริทันต์ในมนุษย์ มีค่าเฉลี่ยในกลุ่มที่เติมไฟโบรลาสต์โกรทแฟคเตอร์ 2 จากพืชที่มากกว่าร้อยละ 100 ซึ่งในความเข้มข้นที่ 25, 100 และ 200 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าร้อยละความมีชีวิตมากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นั้นหมายถึงความเข้มข้นที่กล่าวมาอาจส่งผลให้เซลล์มีการเจริญเติบโตหรือมีชีวิตที่เพิ่มขึ้น คล้ายการศึกษาค้นคว้าอื่นที่พบว่า FGF-2 สามารถกระตุ้นให้เกิดการเจริญเติบโตในเซลล์เอ็นอีบีปริทันต์ในมนุษย์⁽⁷⁶⁾ นอกจากนี้ยังได้มีการทดลองนำไฟโบรลาสต์โกรทแฟคเตอร์ 2 จากพืชที่ความเข้มข้น 2 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรมาทดสอบกับเซลล์ต้นกำเนิดจากเส้นเอ็นปริทันต์ของมนุษย์ (human periodontal ligament stem cells; hPDLSCs) มีค่าความมีชีวิตของเซลล์มากกว่ากลุ่มที่ไม่ใส่โกรทแฟคเตอร์⁽⁷¹⁾

จากผลการทดลองความเข้มข้นของโกรทแฟคเตอร์ที่เพิ่มขึ้น (dose-dependent) ไม่ส่งผลให้ค่าร้อยละความมีชีวิตของเซลล์นั้นเพิ่มขึ้น คล้ายคลึงกับการทดลองในปี 2018 เพื่อศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของเบสิคไฟโบรลาสต์โกรทแฟคเตอร์ (bFGF) และอีจีเอฟ (EGF) ต่อเซลล์ไฟโบรลาสต์ในการฟื้นฟูเนื้อเยื่อฟันฉีงูชิงกราน โดยใช้ความเข้มข้นที่ 1, 10 และ 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ทดสอบวันที่ 1 ถึง 7 ผลการศึกษาค้นคว้าพบช่วงวันที่ 6 และ 7 ในกลุ่มความเข้มข้นที่เหมาะสมของเบสิคไฟโบรลาสต์โกรทแฟคเตอร์และอีจีเอฟ คือ 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เนื่องจากค่าความมีชีวิตของเซลล์เพิ่มขึ้นสูงสุด แม้ว่าความเข้มข้นที่ 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร จะมีความเข้มข้นมากกว่าแต่ไม่ได้ส่งผลให้ค่าความมีชีวิตสูงกว่ากลุ่ม 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร⁽⁷⁰⁾ และการศึกษาในปี 2019 มีการนำเบสิคไฟโบรลาสต์โกรทแฟคเตอร์ ที่ความเข้มข้น 10, 25, 50

และ 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร มาทดสอบกับ hPDLSCs ในวันที่ 3 และวัดค่าความดูดกลืนแสง พบว่า ที่ความเข้มข้น 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร มีการกระตุ้นให้เกิดการเจริญเติบโตได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ส่วนในกลุ่มความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรไม่แตกต่างจากกับควบคุม⁽⁷⁷⁾ แต่บางการศึกษาแสดงให้เห็นว่าปริมาณของโกรทแฟคเตอร์ส่งผลต่อความมีชีวิตของเซลล์ด้วย โดยนำไฟโบร بلاสต์โกรทแฟคเตอร์ 2 ที่ความเข้มข้น 0.1, 1, 20 และ 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร มาทดสอบกับเซลล์ MC3T3-E1 เพื่อดูค่าความมีชีวิตในวันที่ 2 ของการทดลองพบว่า กลุ่มความเข้มข้นที่ 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร แตกต่างกับกลุ่มที่ไม่ใส่อย่างมีนัยสำคัญ⁽⁷⁸⁾ จากการทบทวนวรรณกรรมแสดงให้เห็นว่าค่าความเข้มข้นของโกรทแฟคเตอร์ที่เคยนำมาทดสอบมีหลากหลายมาก ดังนั้นทางผู้วิจัยจึงได้เลือกใช้ค่าความเข้มข้นของไฟโบร بلاสต์โกรทแฟคเตอร์ 2 ที่ 1.56, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 และ 200 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร โดยให้ครอบคลุมความเข้มข้นที่ 1-100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ที่บริษัทผู้ผลิตแนะนำ

การศึกษาค้นหาความเข้มข้นที่เหมาะสม (optimal concentration) ของโกรทแฟคเตอร์ ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการเจริญเติบโตและการทำงานของเซลล์พร้อมทั้งหลีกเลี่ยงผลข้างเคียงไม่พึงประสงค์ที่อาจเกิดขึ้น อีกทั้งยังช่วยประหยัดค่าใช้จ่ายของโกรทแฟคเตอร์ เนื่องด้วยการใส่โกรทแฟคเตอร์ปริมาณที่มากอาจส่งผลเสียต่อเซลล์ทำให้ เซลล์เจริญเติบโตเร็วเกินไป (overgrowth) จนนำไปสู่ภาวะขาดสารอาหารหรือเกิดเซลล์ตาย (apoptosis) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Velazquez และคณะ นำโกรทแฟคเตอร์ชนิดไอจีเอฟหนึ่ง (IGF-1) มาทดสอบ ที่ความเข้มข้น 100 และ 1000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรกับเอมบริโอของวูพบว่า ในโกรทแฟคเตอร์ปริมาณที่สูงมีการตายของเซลล์และส่งผลต่อโครงสร้างของเอมบริโออีกด้วย⁽⁷⁹⁾ จากผลการทดลองจึงกล่าวได้ว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของไฟโบร بلاสต์โกรทแฟคเตอร์ 2 สำหรับเซลล์ไฟโบร بلاสต์ของเอ็นยัดปริทันต์ในมนุษย์ คือ 25 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรซึ่งเป็นค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ทำให้ค่าร้อยละความมีชีวิตของเซลล์แตกต่างกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ

ผลการทดลองที่แตกต่างของเซลล์ไฟโบร بلاสต์แอล 929 และเซลล์ไฟโบร بلاสต์ของเอ็นยัดปริทันต์ในมนุษย์ซึ่งเป็นเซลล์ของมนุษย์ เนื่องมาจากเซลล์ไฟโบร بلاสต์แอล 929 นั้นเป็นเซลล์ไลน์ที่มาจากหนูให้ผลการตอบสนองที่แตกต่างจากเซลล์ไฟโบร بلاสต์ของเอ็นยัดปริทันต์ในมนุษย์ซึ่งเป็นเซลล์ของมนุษย์ ความแตกต่างทางพันธุกรรมส่งผลให้เซลล์มีกลไกการตอบสนองต่อสิ่งกระตุ้นภายนอกแตกต่างกัน ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาความเป็นพิษของผงแกนไทเทเนียมไดออกไซด์ต่อเซลล์ไฟโบร بلاสต์แอล 929 และเซลล์ไฟโบร بلاสต์ของเอ็นยัดปริทันต์ในมนุษย์

พบว่าเซลล์ไฟโบร بلاสต์ของเอ็นยี่ดปริพันธ์ในมนุษย์มีความทนทานต่อความเป็นพิษของผงสแกนมากกว่าเซลล์ไฟโบร بلاสต์แอล 929⁽⁸⁰⁾

ต่อมาเป็นการศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพของไฮโดรเจลจากกรดไฮยาโลโรนิกที่มีการพอลิเมอไรเซชันโดยแสงสีฟ้าที่ผสมไฟโบร بلاสต์โกรทแฟคเตอร์ 2 การศึกษาครั้งนี้ใช้วิธีสังเคราะห์ไฮโดรเจลในการศึกษาของ Chaopanitcharoen และคณะ จากนั้นทำการบ่มโดยแสงสีฟ้าเป็นระยะเวลา 90 วินาที อ้างอิงจากการศึกษาข้างต้น⁽¹⁴⁾ ได้ทำการสังเคราะห์ทั้งหมด 4 ครั้ง โดยผลการสังเคราะห์ไฮโดรเจลที่ได้ค่าปริมาณการเกิดการปรับปรุงของโครงสร้างของไฮโดรเจลจากกรดไฮยาโลโรนิกที่ถูกเมทาคริลเลตจากการสังเกตสอปโรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปคโตรสโคปี มีค่าดังนี้ 100%, 78%, 84% และ 59% ตามลำดับ โดยมีผลในการสังเคราะห์ครั้งแรกใกล้เคียงกับการศึกษาของ Jivacharoen และคณะ⁽¹⁵⁾ ที่ได้ค่าปริมาณการเกิดการปรับปรุงที่ 100% ในขณะที่ครั้งที่เหลือได้น้อยกว่า โดยการศึกษาของ Chaopanitcharoen และคณะ⁽¹⁴⁾ ได้ค่าปริมาณการเกิดการปรับปรุงที่ 42-76% และ Leewisutthikul และคณะ⁽¹⁶⁾ ได้ค่าปริมาณการเกิดการปรับปรุงที่ 30-64% ผลการทดลองแสดงให้เห็นในการสังเคราะห์ไฮโดรเจลแต่ละครั้งได้ค่าปริมาณการเกิดการปรับปรุงที่แตกต่างกัน โดยค่าปริมาณการเกิดการปรับปรุงนั้นขึ้นกับการสังเคราะห์ไฮโดรเจลเพราะมีความไวในขั้นตอนนี้ ทั้งปัจจัยเรื่องการควบคุมอุณหภูมิ การควบคุมความเป็นกรดต่างในระหว่างที่ปฏิกิริยากำลังดำเนินไป เป็นต้น

การศึกษาคูณสมบัติการก่อตัวเป็นเจล งานวิจัยของ Chaopanitcharoen และคณะ ใช้วิธีการทดสอบหลอดกลับหัว (inverted tube test) โดยใช้สารละลายไฮโดรเจลปริมาตร 500 ไมโครลิตรใส่เอฟเพนดอร์ฟ จากนั้นทำการบ่มโดยแสงสีฟ้า ว่าเป็นระยะเวลา 30 วินาทีเนื่องด้วยวิธีนี้อาจจะมีแรงตึงผิวระหว่างไฮโดรเจลที่ก่อตัวสมบูรณ์แล้วกับพื้นผิวของหลอดเอฟเพนดอร์ฟ ส่งผลให้ทางผู้วิจัย เลือกใช้พาราฟิล์มเป็นอุปกรณ์ในการทดสอบเนื่องจากสามารถสังเกตการก่อตัวได้ชัดเจนและลดแรงตึงผิวด้านข้างจากเอฟเพนดอร์ฟ โดยใช้สารละลายไฮโดรเจลปริมาตร 50 ไมโครลิตร ต่อหนึ่งหยด หยดลงบนพาราฟิล์ม ฉายแสงระยะห่างประมาณ 1 เซนติเมตร ผลการศึกษาพบว่า ในทุกระยะเวลาฉายแสงที่ 30,60,90 และ 120 วินาที ส่งผลให้เกิดการก่อตัวเป็นเจลได้ สามารถต้านน้ำหนักของตัวเจลเองได้นานมากกว่า 30 วินาทีโดยไม่ตกลงมา เมื่อเทียบระยะก่อตัวเป็นเจลในการครอสลิงค์ให้เกิดพอลิเมอไรเซชันจากการบ่มโดยแสงและสารเคมีจะพบว่า การเกิดครอสลิงค์จากสารเคมีใช้เวลานานมากกว่า ยกตัวอย่างการศึกษาของ Trakiattikul และคณะ ในปี ค.ศ. 2018⁽¹²⁾ และ Areevijit และคณะ ในปี ค.ศ. 2019⁽¹³⁾ ที่ทำการทดลองโดยใช้สารครอสลิงค์ คือ ดีทีที พบว่าระยะเวลาในการก่อตัวเป็นเจลอยู่ระหว่าง 15-30 นาที

ในการศึกษาส่วนใหญ่ มักผสมโกรทแฟกเตอร์กับสารละลายไฮโดรเจลก่อนที่จะเกิดกระบวนการพอลิเมอไรเซชัน ซึ่งเป็นวิธีที่ง่ายที่สุด⁽⁸¹⁾ ยกตัวอย่างเช่น การศึกษาในปี ค.ศ.2017 ของ Maturavongsadit และคณะ มีการผสมบีเอสเอ (Bovine Serum Albumin; BSA) โดยมักใช้การเกิดปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชัน จากวิธีอื่นที่ไม่ใช่การใช้แสง อาทิเช่น ใช้สารประกอบสังเคราะห์ดีทีที โดยปฏิกิริยาครอสลิงค์ของไฮโดรเจลใช้ปฏิกิริยาไธออลอินคลิก (thiol-ene click reaction) ซึ่งเป็นปฏิกิริยาที่ไม่มีผลข้างเคียงต่อโปรตีน⁽⁵⁰⁾ จึงไม่ส่งผลกับโกรทแฟกเตอร์ ทั้งนี้ต้องพิจารณาในหลายปัจจัยว่าสามารถผสมโกรทแฟกเตอร์ไปก่อนหรือหลังกระบวนการพอลิเมอไรเซชัน เช่น ชนิดของปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชัน คุณสมบัติของโกรทแฟกเตอร์ เป็นต้น

โดยวิธีการนำโกรทแฟกเตอร์เข้าสู่โครงร่างทางชีวภาพ มีหลายวิธีได้แก่ 1.การโหลดโดยตรง (direct loading) 2.เชื่อมต่อโกรทแฟกเตอร์ด้วยพันธะโควาเลนต์ (Covalently Binding Growth Factors) 3.การใช้ระบบนำพา (Carrier Systems) 4.ปฏิกิริยาไฟฟ้าสถิต (Electrostatic Interaction)⁽⁸²⁾ หรือสามารถแบ่งเป็นการนำโกรทแฟกเตอร์เข้าสู่โครงร่างทางชีวภาพก่อนก่อตัวเป็นเจลและหลังการก่อตัวเป็นเจล⁽⁸³⁾ ซึ่งวิธีที่เลือกใช้คือการนำไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์ 2 โหลดโดยตรงภายหลังการก่อตัวเป็นเจล โดยในการทดลองผู้วิจัยได้นำไฮโดรเจลที่มีการพอลิเมอไรเซชันแล้วไปแช่แห้งแบบเยือกแข็งก่อนแล้วจึงนำมาผสมกับโกรทแฟกเตอร์ โดยไฮโดรเจลที่แช่แห้งนั้นจะดูดซับโกรทแฟกเตอร์มาไว้ในโครงร่างเอง อาศัยหลักการแพร่กระจาย (diffusion) เนื่องจากมีข้อดี คือ เป็นวิธีที่ง่าย สามารถควบคุมปริมาณโกรทแฟกเตอร์ที่ผสมเข้าไปได้ ไม่รบกวนการทำให้เกิดปฏิกิริยาครอสลิงค์อีกด้วย

ไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกผ่านกระบวนการพอลิเมอไรเซชันโดยแสง (BL MeHA hydrogel) มีสาร LAP ซึ่งเป็นสารเริ่มต้นปฏิกิริยาโดยแสง (photoinitiator) ก่อให้เกิดอนุมูลอิสระ การเลือกวิธีการนำโกรทแฟกเตอร์มาผสมในไฮโดรเจลก่อนหรือหลังการเกิดพอลิเมอไรเซชัน จำเป็นต้องพิจารณาอย่างรอบคอบ เนื่องจากมีหลายปัจจัยที่อาจส่งผลกระทบต่อทั้งกระบวนการสร้างไฮโดรเจลและคุณสมบัติของโกรทแฟกเตอร์ กระบวนการพอลิเมอไรเซชันโดยแสงอาศัยการสร้างอนุมูลอิสระจากสารเริ่มต้นปฏิกิริยาโดยแสง เมื่อสัมผัสกับแสง เช่น แสงสีฟ้า อนุมูลอิสระจะเข้าทำปฏิกิริยากับหมู่ฟังก์ชันที่ไวต่อปฏิกิริยา ในที่นี้คือหมู่เมทาคริลเลตบนสายพอลิเมอร์ของกรดไฮยาลูโรนิก ทำให้เกิดการครอสลิงค์และนำไปสู่การก่อตัวเป็นโครงร่างไฮโดรเจล หากมีการผสมโกรทแฟกเตอร์ลงไปก่อนเกิดการพอลิเมอไรเซชัน อาจนำไปสู่ปฏิกิริยาไม่พึงประสงค์ อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นอาจทำปฏิกิริยากับกรดอะมิโนบางชนิดในโครงสร้างโปรตีนของโกรทแฟกเตอร์ เช่น ซิสเทอีน (- Cys) แทนที่จะทำปฏิกิริยากับหมู่ฟังก์ชันของพอลิเมอร์ ซึ่งจะส่งผลให้อัตราการเกิด

พอลิเมอร์เซชันช้าลงหรือเจลไม่สามารถก่อตัวได้สมบูรณ์ นอกจากนี้มีการศึกษาพบว่าอนุโมลอิสระมีส่วนในการทำลายโครงสร้างและการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของโกรทแฟคเตอร์⁽⁸⁴⁾ อีกทั้งแสงสีฟ้าสามารถมีผลกระทบต่อโปรตีนหรือโกรทแฟคเตอร์ โดยเหนี่ยวนำให้เกิดความเสียหายทั้งโครงสร้างและคุณสมบัติทางชีวภาพได้เหมือนกัน^(85, 86)

ในการโหลดโกรทแฟคเตอร์เข้าสู่โครงร่างชีวภาพโดยตรงด้วยการนำไฮโดรเจลมาแช่โกรทแฟคเตอร์ ส่วนใหญ่รูปแบบการปลดปล่อยโกรทแฟคเตอร์ปริมาณมากออกมาในช่วงแรก (initial burst) จากนั้นค่อยๆ ลดลง ส่งผลให้ไม่สามารถควบคุมการปลดปล่อยของโกรทแฟคเตอร์ได้ อัตราการปลดปล่อยจากไฮโดรเจลส่วนใหญ่ขึ้นอยู่กับการแพร่กระจายของโกรทแฟคเตอร์ผ่านช่องทางน้ำ (aqueous channels) ที่มีอยู่ในโครงร่างของไฮโดรเจล^(82, 83) ซึ่งตรงกับผลงานวิจัยรูปแบบการปลดปล่อยโกรทแฟคเตอร์ในไฮโดรเจลที่พบว่าในช่วง 30 นาทีแรกมีการปลดปล่อยของโกรทแฟคเตอร์อย่างรวดเร็ว (initial burst) หลังจากนั้นมีการปลดปล่อยอย่างต่อเนื่อง (sustained release) ในอัตราที่ช้าลงอย่างคงที่ในช่วง 30 ถึง 120 นาที แต่ยังคงมีการปล่อยสารออกมาเรื่อยๆ ตลอดระยะเวลา 72 ชั่วโมง ของการทดลอง ในวันแรกของการทดลองโกรทแฟคเตอร์มีการปลดปล่อยไปถึง 86.4% สอดคล้องกับงานทบทวนวรรณกรรมอย่างเป็นระบบของ Caballé-Serrano และคณะ ในปี 2019 พบว่าในขั้นตอนการปลูกกระดูกหรือเนื้อเยื่อในการทำรากเทียมมีการใช้เยื่อเมมเบรนที่สามารถย่อยสลายได้นำไปแช่ในโกรทแฟคเตอร์แล้วทำการแช่แห้งแบบเยือกแข็งหรือผสมในพอลิเมอร์ก่อนการระเหย โดยส่วนใหญ่มีการปลดปล่อยโกรทแฟคเตอร์มี 2 ระยะ ได้แก่ ระยะแรกมีการปลดปล่อยปริมาณมากในช่วงต้นประมาณ 1 วัน และระยะต่อมา มีการปลดปล่อยช้าลง⁽⁸⁷⁾ เช่นเดียวกับการศึกษา ในปีค.ศ. 2017 Maturavongsadit และคณะได้ศึกษาการปลดปล่อยของบีเอสเอในไฮโดรเจลในสารเชื่อมโยงที่แตกต่างกัน พบว่ามีการปลดปล่อยบีเอสเอออกมาในช่วงแรกอย่างรวดเร็ว จากนั้นอัตราการปลดปล่อยจะช้าลงในทุกชนิดของไฮโดรเจล⁽⁵⁰⁾

มีความพยายามพัฒนาวิธีนำส่งสารโกรทแฟคเตอร์อื่นๆ เช่น การดัดแปลงทางเคมีของโกรทแฟคเตอร์เพื่อเพิ่มการยึดติดกับพอลิเมอร์⁽⁸⁸⁾ หรือสร้างระบบอนุภาคนาโน/ไมโครสเฟียร์ (Nanoparticles/Microspheres) เนื่องด้วยข้อจำกัดของโกรทแฟคเตอร์ ได้แก่ อายุการออกฤทธิ์สั้น ความเสถียรต่ำ การถูกยับยั้งอย่างรวดเร็วโดยเอนไซม์ภายใต้สภาวะทางสรีรวิทยา และสลายตัวง่าย^(88, 89) เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของโกรทแฟคเตอร์ให้ทำงานได้ดีขึ้น รวมถึงยังมีการออกแบบและปรับปรุงโครงร่างทางชีวภาพ เช่น ไฮโดรเจลที่ตอบสนองต่อสิ่งเร้า (Stimuli-responsive hydrogel) ไฮโดรเจลที่มีความแข็งแรง (Tough hydrogel) เป็นต้น⁽⁹⁰⁾ โดยโครงร่างจะทำหน้าที่กักเก็บ ปกป้อง และควบคุมการปลดปล่อยโกรทแฟคเตอร์

ในการทดลองเพื่อศึกษารูปแบบการปลดปล่อยของโกรทแฟคเตอร์นั้นเราได้ใช้ค่าความเข้มข้นของไฟโบรบลาสต์โกรทแฟคเตอร์ 2 อยู่ที 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร เนื่องจากวิธีวิเคราะห์โปรตีน Coomassie Bradford ซึ่งมีความไวต่อโปรตีน สามารถตรวจพบความเข้มข้นของโปรตีนได้ในช่วง 1-10 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ส่งผลให้ผู้วิจัยเลือกความเข้มข้นที่มากกว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมประมาณ 400 เท่า ดังนั้นในอนาคตหากมีการทดลองเพิ่มเติมอาจแนะนำให้ใช้ความเข้มข้นที่ 25 นาโนกรัมต่อมิลลิตร แล้วใช้การวิเคราะห์โปรตีนรูปแบบอื่นที่สามารถ ตรวจโปรตีนที่มีค่าน้อยได้ เช่น เอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนต์แอสเซย์ (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay; ELISA) หรือ การวิเคราะห์โปรตีนด้วยสารเรืองแสง (Fluorescent Protein Assays) เป็นต้น

ในคุณสมบัติด้านการพองตัวของไฮโดรเจลจะพบว่าความสามารถในการดูดน้ำของทั้งกลุ่มที่ผสมและไม่ผสมโกรทแฟคเตอร์มีค่ามากกว่าร้อยละ 90 ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Chaopanitcharoen และคณะ⁽¹⁴⁾ เมื่อพิจารณาค่าอัตราส่วนการพองตัวเชิงมวล (Qm) และเชิงปริมาตร (Qv) พบว่าทั้งกลุ่มที่ผสมและไม่ผสมโกรทแฟคเตอร์ ค่าอัตราส่วนการพองตัวเชิงมวลและเชิงปริมาตรไม่แตกต่างกัน ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่า การผสมโกรทแฟคเตอร์ในไฮโดรเจลไม่ได้เปลี่ยนแปลงคุณสมบัติการพองตัวของไฮโดรเจล และทั้งสองกลุ่มมีลักษณะในการพองตัวอย่างรวดเร็ว เมื่อไฮโดรเจลมีการพองตัวได้มาก แสดงว่าไฮโดรเจลมีความสามารถในการกักเก็บน้ำไว้ได้สูง ซึ่งส่งผลให้เป็นโครงร่างที่เหมาะสมนำไปใช้ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อต่อไป เมื่อเปรียบเทียบ ค่าอัตราส่วนการพองตัวเชิงมวลและเชิงปริมาตรกับการศึกษาอื่นพบว่าในการศึกษาของ Maturavongsadit P. และคณะ ในปี 2016⁽⁴⁹⁾ และ Trakiattikul N. และคณะในปี 2018⁽¹²⁾ ที่มีการสังเคราะห์ไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูนิคที่ถูกเมทาคริลेटโดยใช้สารครอสลิงค์ คือ ดีทีที ทั้งสองกลุ่มมีค่า Qm และ Qv ที่แตกต่างกัน โดยค่า Qm = 40 และ Qv = 50, Qm = 9-11 และ Qv = 16-18 ตามลำดับ และของ Chaopanitcharoen และคณะ⁽¹⁴⁾ ที่ระยะเวลาบ่มโดยแสง 90 วินาที มีค่า Qm = 14.45 และ Qv = 25.21 ซึ่งแม้จะเป็นไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิคเหมือนกัน แต่ขั้นตอนการสังเคราะห์ สารที่ใช้ครอสลิงค์ หรือลำดับขั้นตอนอื่นมีความแตกต่างกัน ส่งผลให้ค่า Qm, Qv มีค่าที่แตกต่างกัน

คุณสมบัติด้านการสลายตัวของไฮโดรเจลจะพบว่ากลุ่มที่ผสมและไม่ผสมโกรทแฟคเตอร์สามารถสลายตัวได้หมดโดยใช้ระยะเวลา 7 วัน เหมือนกันทั้งสองกลุ่ม ในสารละลายไฮยาลูโรนิเดส 100 ยูนิต ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นการจำลองสภาวะทางชีวภาพ (biomimetic conditions) ที่ใกล้เคียงกับร่างกายมนุษย์มากที่สุด ซึ่งการสามารถสลายตัวได้หมดเป็นคุณสมบัติ

ของโครงร่างที่เหมาะสม เพื่อลดการเกิดการอักเสบ หรือการก่อตัวของพังผืด ที่อาจเกิดขึ้นเมื่อมีวัสดุแปลกปลอมตกค้างอยู่ในร่างกายเป็นเวลานาน และเพื่อให้เนื้อเยื่อใหม่ที่สร้างขึ้นมาสามารถเข้ามาแทนที่โครงร่างที่สลายตัวไปได้อย่างสมบูรณ์⁽⁹¹⁾ โดยการสลายตัวของแต่ละชนิดของโครงร่างใช้ระยะเวลาที่แตกต่างกัน บางชนิดใช้เวลาชั่วโมงหรือวันหรืออาทิตย์ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับวัสดุของโครงร่างชีวภาพ ความหนาแน่นของการครอสลิงค์ ชนิดและความเข้มข้นของสารครอสลิงค์ หรือเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อย เป็นต้น^(92, 93) ยกตัวอย่างการศึกษาในปี ค.ศ.2020 โดย Snetkov และคณะ ได้ทดลองนำ ที่กรดไฮยาลูโรนิก (HA) มีน้ำหนักของโมเลกุล และความเข้มข้นของกรดไฮยาลูโรนิกที่มีการเมทาคริเลต (MeHA) แตกต่างกันไปทดสอบเรื่องการสลายตัวด้วยสารละลายไฮยาลูโรนิกเดส 100 ยูนิตต่อมิลลิลิตร พบว่าในกลุ่มที่มีน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิก 50, 350 และ 1100 กิโลดาลตัน ที่ความเข้มข้นของกรดไฮยาลูโรนิกที่มีการเมทาคริเลต 2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก (wt%) ซึ่งการสลายตัวในกลุ่มที่มีน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกต่างกัน กลับได้ผลใกล้เคียงกัน คือสลายภายใน 1 วัน ในขณะที่ในกลุ่มที่มีน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิก 50 กิโลดาลตัน แต่มีความเข้มข้นที่ 2, 5, 10 และ 20 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก พบว่ามีการสลายตัวที่เวลา 1 วัน, 7 วัน 18 วัน และ 38 วัน ตามลำดับ จึงสรุปได้ว่าปริมาณความเข้มข้นของกรดไฮยาลูโรนิกที่มีการเมทาคริเลตในการสังเคราะห์ไฮโดรเจล มีผลต่อการสลายตัว⁽⁹⁴⁾ ผลการสลายตัวในการศึกษาครั้งนี้ใช้ระยะเวลา 7 วัน ซึ่งใกล้เคียงกับการศึกษาของ Chaopanitcharoen และคณะ พบว่าไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกที่บ่มโดยแสงสีฟ้าที่เวลา 90 วินาที ใช้เวลาสลายตัวทั้งหมด 5 วัน⁽¹⁴⁾ หรือการศึกษาของ Maturavongsadit P. และคณะในปี 2017 ซึ่งพบว่า ไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกที่มีการเมทาคริเลตและมีการใช้สารครอสลิงค์เป็นดีทีที พบว่าเมื่อใส่สารละลายไฮยาลูโรนิกเดส 100 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ไฮโดรเจลมีการสลายตัวภายใน 2 วัน โดยที่ใน 24 ชั่วโมงแรกพบปริมาณกรดยูโรนิกที่สลายออกมาประมาณ 65%⁽⁵⁰⁾

ในส่วนของสัญญาณทางกายภาพของไฮโดรเจลชนิดนี้ พบค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางขนาดประมาณ 38 ไมครอน และ 45 ไมครอน ในกลุ่มที่ผสมโกรทแฟกเตอร์และไม่ผสมโกรทแฟกเตอร์ตามลำดับ อีกทั้งยังมีความไม่สม่ำเสมอของรูพรุน เมื่อเทียบกับการศึกษาของ Chaopanitcharoen และคณะ⁽¹⁴⁾ ที่มีค่าเส้นผ่านศูนย์กลาง 105 ไมครอน ซึ่งมีขนาดกว้างกว่าประมาณ 2.7 เท่า และในไฮโดรเจลที่ได้รับการบ่มแสงสีฟ้ามาเป็นระยะเวลา 90 วินาที มีพื้นผิวเป็นเนื้อเดียวกัน เนื่องจากการเตรียมไฮโดรเจลที่ต่างกันโดยผู้วิจัยที่มีการนำไฮโดรเจลที่เกิดการพอลิเมอไรเซชันเป็นเจลแล้วนำไปแช่แห้งแบบเยือกแข็งอีกรอบได้เป็นไฮโดรเจลแห้ง ก่อนนำมาผสมโกรทแฟกเตอร์ ก่อนจะผ่านกระบวนการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

โดยต้องมีการแช่แห้งแบบเยือกแข็งอีกหนึ่งรอบ ต่างจากการศึกษาของ Chaopanitcharoen และคณะ ที่มีการแช่แห้งแบบเยือกแข็งเพียงครั้งเดียว โดยการแช่แห้งแบบเยือกแข็งนั้นทำให้เกิดเป็นกระบวนการที่สร้างรูพรุนในไฮโดรเจลผ่านการก่อตัวและการระเหิดของผลึกน้ำแข็ง ทำให้เกิดการยุบตัวของโครงสร้างพอลิเมอร์⁽⁹⁵⁾ จึงส่งผลให้เส้นผ่านศูนย์กลางไฮโดรเจลของผู้วิจัยมีขนาดเล็กกว่า มีการศึกษาที่สอดคล้องกัน ในปี ค.ศ. 2020 Chi และคณะ มีการทดสอบนำไฮโดรเจลจากแป้งสองชนิดมาทำการแช่แห้งแบบเยือกแข็งเพื่อดูผลกระทบต่อโครงสร้าง ผลพบว่าการแช่แห้งแบบเยือกแข็งทำให้โครงสร้างระดับจุลภาคของเจลเปลี่ยนแปลงไป คือ มีขนาดช่องว่าง (mesh) เล็กลง มีโครงสร้างที่ไม่เป็นระเบียบมากขึ้น⁽⁹⁶⁾ อีกทั้งยังมีการศึกษาเกี่ยวกับการสร้างโครงร่างอะกาโรสที่มีรูพรุนโดยเปรียบเทียบวิธีแช่แห้งแบบเยือกแข็ง ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าอัตราการเย็นตัวในกระบวนการแช่แห้งแบบเยือกแข็งมีผลอย่างมากต่อขนาดและความสม่ำเสมอของรูพรุน หากมีอัตราการเย็นตัวเร็วกว่าจะได้รูพรุนที่มีความสม่ำเสมอมากกว่า⁽⁹⁷⁾ ขนาดของรูพรุนที่ยังมีผลต่อการแบ่งตัว ยึดติดและการเคลื่อนที่ของเซลล์ การส่งถ่ายสารอาหารและของเสีย มีการศึกษาที่ทำการทดลองแต่ละช่วงขนาดของรูพรุนของโครงร่างทางชีวภาพหลากหลายชนิด ส่งผลให้ทราบว่าทุกขนาดของรูพรุนมีความสำคัญต่อเซลล์หรือเนื้อเยื่อที่แตกต่างกัน⁽⁹⁸⁾ ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูก รูพรุนขนาดใหญ่ มากกว่า 300 ไมครอน ให้พื้นที่สำหรับการเจริญเติบโตของกระดูกเข้าสู่โครงสร้าง และการสร้างหลอดเลือด ส่วนรูพรุนขนาดเล็ก 20-40 ไมครอน ช่วยเพิ่มความสามารถในการดูดซึมของเหลวของโครงสร้างกระดูก ซึ่งช่วยเพิ่มปริมาณและความหลากหลายของเซลล์ที่ผ่านรูพรุนขนาดเล็กเหล่านี้^(99, 100) ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่าโครงทแพคเตอร์ที่ผสมในไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกที่พอลิเมอไรเซชันโดยแสงสีฟ้า ไม่ได้ส่งผลคุณสมบัติทางกายภาพของไฮโดรเจลเปลี่ยนแปลงไป และยังนับเป็นโครงร่างที่เหมาะสมในการนำไปพัฒนาเพื่อใช้ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อต่อไปในอนาคต

ข้อเสนอแนะในการทำวิจัยครั้งต่อไป

เนื่องจากทางผู้วิจัยมีวัตถุประสงค์ในการพัฒนาไฮโดรเจลที่มีการพอลิเมอร์เชื่อมโดยแสงสีฟ้าเพื่อนำไปใช้ทางคลินิก ดังนั้นควรมีการบูรณาการนำทั้งสามองค์ประกอบ ได้แก่ ไฮโดรเจล โกรทแฟคเตอร์ และเซลล์ หรือในสัตว์ทดลอง เพื่อทดสอบดูประสิทธิภาพของไฮโดรเจลที่ผสม โกรทแฟคเตอร์ และการตอบสนองของเซลล์



บรรณานุกรม

1. Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science*. 1993;260(5110):920-6.
2. Caddeo S, Boffito M, Sartori S. Tissue Engineering Approaches in the Design of Healthy and Pathological In Vitro Tissue Models. *Front Bioeng Biotechnol*. 2017;5:40.
3. Wang L, Lazebnik M, Detamore MS. Hyaline cartilage cells outperform mandibular condylar cartilage cells in a TMJ fibrocartilage tissue engineering application. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2009;17(3):346-53.
4. Abou Neel EA, Chrzanowski W, Salih VM, Kim H-W, Knowles JC. Tissue engineering in dentistry. *J Dent*. 2014;42(8):915-28.
5. Rogers GF, Greene AK. Autogenous Bone Graft: Basic Science and Clinical Implications. *Journal of Craniofacial Surgery*. 2012;23(1):323-7.
6. Kowalczewski CJ, Saul JM. Biomaterials for the Delivery of Growth Factors and Other Therapeutic Agents in Tissue Engineering Approaches to Bone Regeneration. *Front Pharmacol*. 2018;9:513.
7. Giannoudis PV, Dinopoulos H, Tsiridis E. Bone substitutes: an update. *Injury*. 2005;36 Suppl 3:S20-7.
8. Kumar P, Vinitha B, Fathima G. Bone grafts in dentistry. *J Pharm Bioallied Sci*. 2013;5(Suppl 1):S125-7.
9. Oliveira ÉR, Nie L, Podstawczyk D, Allahbakhsh A, Ratnayake J, Brasil DL, et al. Advances in Growth Factor Delivery for Bone Tissue Engineering. *Int J Mol Sci*. 2021;22(3):1480.
10. Zhang Y, Yu T, Peng L, Sun Q, Wei Y, Han B. Advancements in Hydrogel-Based Drug Sustained Release Systems for Bone Tissue Engineering. *Front Pharmacol*. 2020;11:622.
11. Chircov C, Grumezescu AM, Bejenaru LE. Hyaluronic acid-based scaffolds for tissue engineering. *Rom J Morphol Embryol*. 2018;59(1):71-6.
12. Trakiattikul N, Dhanesuan N, Luckanagul JA, Rungsiyanont S. The development of mannitol/BSA methacrylated hyaluronic acid hydrogels as an injectable drug

- delivery platform. *SWU Dent J.* 2018;11:41-54.
13. 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.
 14. Chaopanitcharoen P, Dhaneuan N, Luckanagul JA, S. R. The development of blue light activated methacrylated hyaluronic acid hydrogel for drug delivery system. *Thai J Pharm Sci.* 2023;47(4):4.
 15. Jivacharoen T. The biocompatibility of L929 fibroblast and hyaluronic acid based hydrogel polymerized by blue light. [Internet]. Bangkok: srinakharinwirot university; 2022 [2023 Oct 10]. <http://ir-ithesis.swu.ac.th/dspace/handle/123456789/2359>
 16. Leewisutthikul P. The biocompatibility of blue light activated methacrylated hyaluronic acid hydrogel with MC3T3-E1 mouse osteoblastic cell line [Internet]. Bangkok: Srinakharinwirot University; 2023 [2023 Oct 10]. <http://ir-ithesis.swu.ac.th/dspace/handle/123456789/2668>
 17. Novais A, Chatzopoulou E, Chaussain C, Gorin C. The Potential of FGF-2 in Craniofacial Bone Tissue Engineering: A Review. *Cells.* 2021;10(4).
 18. Yun YR, Won JE, Jeon E, Lee S, Kang W, Jo H, et al. Fibroblast growth factors: biology, function, and application for tissue regeneration. *J Tissue Eng.* 2010;1:218142.
 19. Mabilieu G, Aguado E, Stancu IC, Cincu C, Baslé MF, Chappard D. Effects of FGF-2 release from a hydrogel polymer on bone mass and microarchitecture. *Biomaterials.* 2008;29(11):1593-600.
 20. Kobayashi N, Miyaji H, Sugaya T, Kawanami M. Bone augmentation by implantation of an FGF2-loaded collagen gel-sponge composite scaffold. *J Oral Tissue Eng.* 2010;8:91-101.
 21. Zhang C, Wang J, Xie Y, Wang L, Yang L, Yu J, et al. Development of FGF-2-loaded electrospun waterborne polyurethane fibrous membranes for bone regeneration. *Regenerative Biomaterials.* 2021;8(1).
 22. Shanmugaraj B, Chandran J, Isaac B, Phoolcharoen W. Plant Molecular Farming: A Viable Platform for Recombinant Biopharmaceutical Production. *Plants (Basel).*

2020;9(7).

23. Jia J, Wilson W, Karmaker A, Nishimura A, Otsuka H, Ohara K, et al. Applications of Plant-Made Fibroblast Growth Factor for Human Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells Dev.* 2024;33(3-4):57-66.
24. Poudel SB, Min CK, Lee JH, Shin YJ, Kwon TH, Jeon YM, et al. Local supplementation with plant-derived recombinant human FGF2 protein enhances bone formation in critical-sized calvarial defects. *J Bone Miner Metab.* 2019;37(5):900-12.
25. Velnar T, Bailey T, Smrkolj V. The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. *J Int Med Res.* 2009;37(5):1528-42.
26. Midwood KS, Williams LV, Schwarzbauer JE. Tissue repair and the dynamics of the extracellular matrix. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004;36(6):1031-7.
27. Martin P. Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. *Science.* 1997;276(5309):75-81.
28. Broughton G, Janis JE, Attinger CE. Wound healing: an overview. *Plast Reconstr Surg.* 2006;117(7 Suppl):1e-S-32e-S.
29. Boukovalas S, Aliano KA, Phillips LG, Norbury WB. Wound Healing Townsend CM, editor. *Sabiston Textbook of Surgery : The Biological Basis of Modern Surgical Practice.* 21st ed. St. Louis: Elsevier; 2021. 119-49.
30. Pastar I, Stojadinovic O, Yin NC, Ramirez H, Nusbaum AG, Sawaya A, et al. Epithelialization in Wound Healing: A Comprehensive Review. *Adv Wound Care (New Rochelle).* 2014;3(7):445-64.
31. Reinke JM, Sorg H. Wound repair and regeneration. *Eur Surg Res.* 2012;49(1):35-43.
32. 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.
33. Udeabor SE, Heselich A, Al-Maawi S, Alqahtani AF, Sader R, Ghanaati S. Current Knowledge on the Healing of the Extraction Socket: A Narrative Review. *Bioengineering (Basel).* 2023;10(10). eng. 2023/10/28.
34. Mhanna R, Hasan A. Introduction to tissue engineering Hasan A, editor. *Tissue*

- engineering for artificial organs: regenerative medicine, smart diagnostics and personalized medicine. Weinheim: Wiley; 2017. p.1-34.
35. Hutmacher DW. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials*. 2000;21(24):2529-43.
 36. Almouemen N, Kelly HM, O'Leary C. Tissue Engineering: Understanding the Role of Biomaterials and Biophysical Forces on Cell Functionality Through Computational and Structural Biotechnology Analytical Methods. *Comput Struct Biotechnol J*. 2019;17:591-8.
 37. Koons GL, Diba M, Mikos AG. Materials design for bone-tissue engineering. *Nat Rev Mater*. 2020;5(8):584-603.
 38. Wolfe PS, Sell SA, Bowlin GL. Natural and Synthetic Scaffolds Pallua N, Suscheck CV, editors. *Tissue Engineering*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2011. p.41-67.
 39. Howard D, Buttery LD, Shakesheff KM, Roberts SJ. Tissue engineering: strategies, stem cells and scaffolds. *J Anat*. 2008;213(1):66-72.
 40. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006;126(4):663-76.
 41. d'Aquino R, De Rosa A, Lanza V, Tirino V, Laino L, Graziano A, et al. Human mandible bone defect repair by the grafting of dental pulp stem/progenitor cells and collagen sponge biocomplexes. *Eur Cell Mater*. 2009;18:75-83.
 42. Sui Y, Zhang S, Li Y, Zhang X, Hu W, Feng Y, et al. Generation of functional salivary gland tissue from human submandibular gland stem/progenitor cells. *Stem Cell Res Ther*. 2020;11(1):127.
 43. Oh JK, Drumright R, Siegwart DJ, Matyjaszewski K. The development of microgels/nanogels for drug delivery applications. *Prog Polym Sci*. 2008;33(4):448-77.
 44. Jiang Y, Chen J, Deng C, Suuronen EJ, Zhong Z. Click hydrogels, microgels and nanogels: emerging platforms for drug delivery and tissue engineering. *Biomaterials*. 2014;35(18):4969-85.

45. Ganji F, Vasheghani Farahani S, Vasheghani-Farahani E. Theoretical Description of Hydrogel Swelling: A Review. *Iran Polym J.* 2010;19:375-98.
46. Varaprasad K, Raghavendra GM, Jayaramudu T, Yallapu MM, Sadiku R. A mini review on hydrogels classification and recent developments in miscellaneous applications. *Mater Sci Eng C.* 2017;79:958-71.
47. Zhu Z, Wang YM, Yang J, Luo XS. Hyaluronic acid: a versatile biomaterial in tissue engineering. *Plast Aesthet Res.* 2017;4:219.
48. Pereira I, Rodrigues C, Rodrigues A, Oliveira M, Gama M. Injectable hydrogels as a delivery system for bone regeneration Rodrigues L, Mota M, editors. *Bioinspired Materials for Medical Applications.* Cambridge (UK): Woodhead Publishing; 2017. p.241-71.
49. 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.
50. 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.
51. Maitra J, Shukla V. Cross-linking in hydrogels : a review. *Am J Polym Sci.* 2014;4:25-31.
52. Khunmanee S, Jeong Y, Park H. Crosslinking method of hyaluronic-based hydrogel for biomedical applications. *J Tissue Eng.* 2017;8:2041731417726464.
53. Choi JR, Yong KW, Choi JY, Cowie AC. Recent advances in photo-crosslinkable hydrogels for biomedical applications. *BioTechniques.* 2019;66(1):40-53.
54. Mane S. Effect of Chemical Crosslinking on Properties of Polymer Microbeads: A Review. *Can Chem Trans.* 2016;3:473-85.
55. Plikus MV, Wang X, Sinha S, Forte E, Thompson SM, Herzog EL, et al. Fibroblasts: Origins, definitions, and functions in health and disease. *Cell.* 2021;184(15):3852-72.
56. Darby IA, Laverdet B, Bonté F, Desmoulière A. Fibroblasts and myofibroblasts in

- wound healing. *Clin Cosmet Investig Dermatol*. 2014;7:301-11.
57. McAnulty RJ. Fibroblasts and myofibroblasts: Their source, function and role in disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007;39(4):666-71.
 58. Darby IA, Hewitson TD. Fibroblast Differentiation in Wound Healing and Fibrosis. *International Review of Cytology*. 257. San Diego, CA: Academic Press; 2007. 143-79.
 59. Chen F, Bi D, Cao G, Cheng C, Ma S, Liu Y, et al. Bone morphogenetic protein 7-transduced human dermal-derived fibroblast cells differentiate into osteoblasts and form bone in vivo. *Connect Tissue Res*. 2018;59(3):223-32.
 60. Abdal-Wahab M, Abdel Ghaffar KA, Ezzatt OM, Hassan AAA, El Ansary MMS, Gamal AY. Regenerative potential of cultured gingival fibroblasts in treatment of periodontal intrabony defects (randomized clinical and biochemical trial). *J Periodontal Res*. 2020;55(3):441-52.
 61. Huang Y, Tang Y, Zhang R, Wu X, Yan L, Chen X, et al. Role of periodontal ligament fibroblasts in periodontitis: pathological mechanisms and therapeutic potential. *J Transl Med*. 2024;22(1):1136.
 62. Perona R. Cell signalling: growth factors and tyrosine kinase receptors. *Clin Transl Oncol*. 2006;8(2):77-82.
 63. Devescovi V, Leonardi E, Ciapetti G, Cenni E. Growth factors in bone repair. *Chir Organi Mov*. 2008;92(3):161-8.
 64. Benington L, Rajan G, Locher C, Lim LY. Fibroblast Growth Factor 2-A Review of Stabilisation Approaches for Clinical Applications. *Pharmaceutics*. 2020;12(6).
 65. Cochran DL, Oh TJ, Mills MP, Clem DS, McClain PK, Schallhorn RA, et al. A Randomized Clinical Trial Evaluating rh-FGF-2/ β -TCP in Periodontal Defects. *J Dent Res*. 2016;95(5):523-30.
 66. Shim K, Saima F, Eom YW. High Dose of FGF-2 Induced Growth Retardation via ERK1/2 De-phosphorylation in Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cells. *Biomed Sci Lett*. 2017;23:49-56.
 67. Eom YW, Oh JE, Lee JI, Baik SK, Rhee KJ, Shin HC, et al. The role of growth factors in

- maintenance of stemness in bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014;445(1):16-22.
68. Yoshinaga Y, Maruo N, Ohgi K, Yamato H, Tsuchimochi N, Nakagami M, et al. Recombinant human fibroblast growth factor-2 promotes surgical-wound healing in the rat gingiva. *J Dent Sci.* 2025.
69. Yanagita M, Kojima Y, Kubota M, Mori K, Yamashita M, Yamada S, et al. Cooperative effects of FGF-2 and VEGF-A in periodontal ligament cells. *J Dent Res.* 2014;93(1):89-95.
70. Jia YY, Zhou JY, Chang Y, An F, Li XW, Xu XY, et al. Effect of Optimized Concentrations of Basic Fibroblast Growth Factor and Epidermal Growth Factor on Proliferation of Fibroblasts and Expression of Collagen: Related to Pelvic Floor Tissue Regeneration. *Chin Med J (Engl).* 2018;131(17):2089-96.
71. Rattanapisit K, Jantimaporn A, Kaewpungsup P, Shanmugaraj B, Pavasant P, Namdee K, et al. Plant-Produced Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) Promotes Cell Proliferation and Collagen Production. *Planta Med Int Open.* 2020;07:e150-e7.
72. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72(1):248-54.
73. Hwang HS, Lee CS. Recent Progress in Hyaluronic-Acid-Based Hydrogels for Bone Tissue Engineering. *Gels.* 2023;9(7).
74. Collins MN, Birkinshaw C. Hyaluronic acid based scaffolds for tissue engineering - A review. *Carbohydrate Polymers.* 2013;92(2):1262-79.
75. López-García J, Lehocký M, Humpolíček P, Sába P. HaCaT Keratinocytes Response on Antimicrobial Atelocollagen Substrates: Extent of Cytotoxicity, Cell Viability and Proliferation. *J Funct Biomater.* 2014;5(2):43-57.
76. An S, Huang X, Gao Y, Ling J, Huang Y, Xiao Y. FGF-2 induces the proliferation of human periodontal ligament cells and modulates their osteoblastic phenotype by affecting Runx2 expression in the presence and absence of osteogenic inducers. *Int J Mol Med.* 2015;36(3):705-11.

77. Kang W, Liang Q, Du L, Shang L, Wang T, Ge S. Sequential application of bFGF and BMP-2 facilitates osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells. *J Periodontal Res*. 2019;54(4):424-34.
78. Park JB. Effects of fibroblast growth factor 2 on osteoblastic proliferation and differentiation by regulating bone morphogenetic protein receptor expression. *J Craniofac Surg*. 2011;22(5):1880-2.
79. Velazquez MA, Hermann D, Kues WA, Niemann H. Increased apoptosis in bovine blastocysts exposed to high levels of IGF1 is not associated with downregulation of the IGF1 receptor. *Reproduction*. 2011;141(1):91-103.
80. Oberoi G, Müller A, Moritz A, Shokoohi-Tabrizi HA, Kurzmann C, Agis H. Titanium dioxide-based scanning powder can modulate cell activity of oral soft tissue - Insights from in vitro studies with L929 cells and periodontal fibroblasts. *J Prosthodont Res*. 2020;64(1):34-42.
81. Wang Z, Wang Z, Lu WW, Zhen W, Yang D, Peng S. Novel biomaterial strategies for controlled growth factor delivery for biomedical applications. *NPG Asia Mater*. 2017;9(10):e435.
82. Silva AK, Richard C, Bessodes M, Scherman D, Merten OW. Growth factor delivery approaches in hydrogels. *Biomacromolecules*. 2009;10(1):9-18.
83. Meissner S, Raos B, Svirskis D. Hydrogels can control the presentation of growth factors and thereby improve their efficacy in tissue engineering. *Eur J Pharm Biopharm*. 2022;181:1-21.
84. Lin CC, Sawicki SM, Metters AT. Free-Radical-Mediated Protein Inactivation and Recovery during Protein Photoencapsulation. *Biomacromolecules*. 2008;9(1):75-83.
85. Schöneich C. Photo-Degradation of Therapeutic Proteins: Mechanistic Aspects. *Pharm Res*. 2020;37(3):45.
86. Hipper E, Lehmann F, Kaiser W, Hübner G, Buske J, Blech M, et al. Protein photodegradation in the visible range? Insights into protein photooxidation with respect to protein concentration. *Int J Pharm X*. 2023;5:100155.

87. Caballé-Serrano J, Abdeslam-Mohamed Y, Munar-Frau A, Fujioka-Kobayashi M, Hernández-Alfaro F, Miron R. Adsorption and release kinetics of growth factors on barrier membranes for guided tissue/bone regeneration: A systematic review. *Arch Oral Biol.* 2019;100:57-68.
88. Ren X, Zhao M, Lash B, Martino MM, Julier Z. Growth Factor Engineering Strategies for Regenerative Medicine Applications. *Front Bioeng Biotechnol.* 2020;7:446. English.
89. Guan N, Liu Z, Zhao Y, Li Q, Wang Y. Engineered biomaterial strategies for controlling growth factors in tissue engineering. *Drug Deliv.* 2020;27(1):1438-51.
90. Choi H, Choi WS, Jeong JO. A Review of Advanced Hydrogel Applications for Tissue Engineering and Drug Delivery Systems as Biomaterials. *Gels.* 2024;10(11):693.
91. Aishwarya BK, V R, Singh N, Mathew L, Dhamija K, Fallah M, et al. Biodegradable Polymer Biomaterials for Tissue Engineering Applications: A Critical Review. *E3S Web Conf.* 2024;529.
92. Tous E, Ifkovits JL, Koomalsingh KJ, Shuto T, Soeda T, Kondo N, et al. Influence of Injectable Hyaluronic Acid Hydrogel Degradation Behavior on Infarction-Induced Ventricular Remodeling. *Biomacromolecules.* 2011;12(11):4127-35.
93. Jeon O, Song SJ, Lee KJ, Park MH, Lee SH, Hahn SK, et al. Mechanical properties and degradation behaviors of hyaluronic acid hydrogels cross-linked at various cross-linking densities. *Carbohydr Polym.* 2007;70(3):251-7.
94. Snetkov P, Zakharova K, Morozkina S, Olekhovich R, Uspenskaya M. Hyaluronic Acid: The Influence of Molecular Weight on Structural, Physical, Physico-Chemical, and Degradable Properties of Biopolymer. *Polymers.* 2020;12:1800.
95. Annabi N, Nichol JW, Zhong X, Ji C, Koshy S, Khademhosseini A, et al. Controlling the porosity and microarchitecture of hydrogels for tissue engineering. *Tissue Eng Part B Rev.* 2010;16(4):371-83.
96. Chi C, Li X, Zhang Y, Miao S, Chen L, Li L, et al. Understanding the effect of freeze-drying on microstructures of starch hydrogels. *Food Hydrocoll.* 2020;101:105509.
97. Guastaferro M, Baldino L, Reverchon E, Cardea S. Production of Porous Agarose-Based Structures: Freeze-Drying vs. Supercritical CO(2) Drying. *Gels.* 2021;7(4).

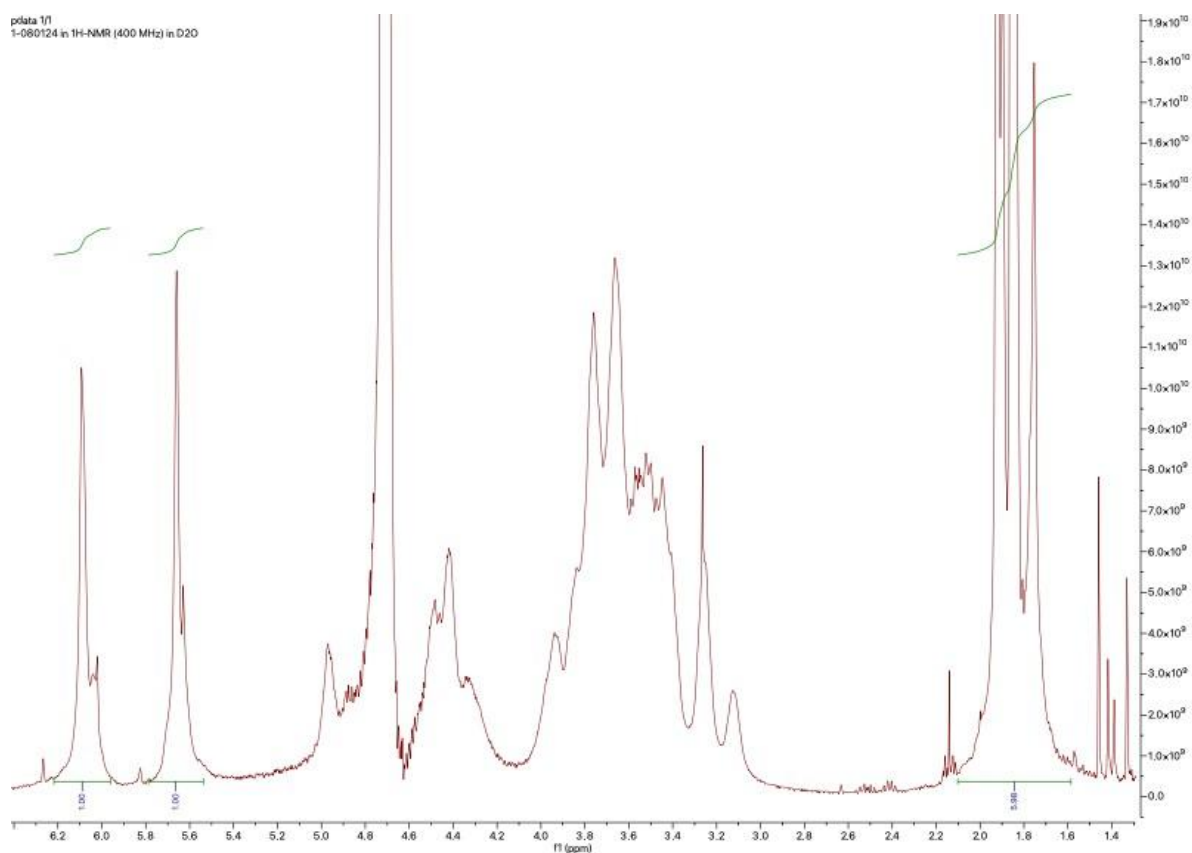
98. Mukasheva F, Adilova L, Dyussenbinov A, Yernaimanova B, Abilev M, Akilbekova D. Optimizing scaffold pore size for tissue engineering: insights across various tissue types. *Front Bioeng Biotechnol.* 2024;12:1444986.
99. Yadav P, Beniwal G, Saxena KK. A review on pore and porosity in tissue engineering. *Mater Today Proc.* 2021;44:2623-8.
100. Loh QL, Choong C. Three-dimensional scaffolds for tissue engineering applications: role of porosity and pore size. *Tissue Eng Part B Rev.* 2013;19(6):485-502.



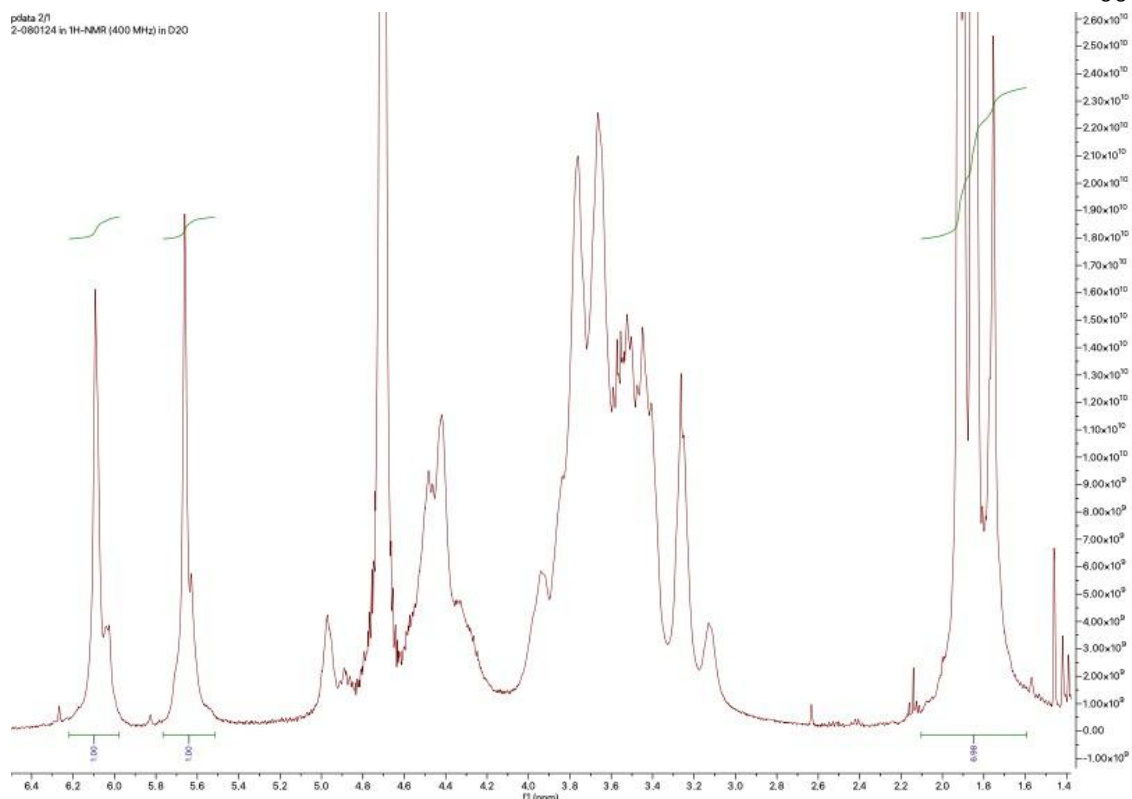


ภาคผนวก

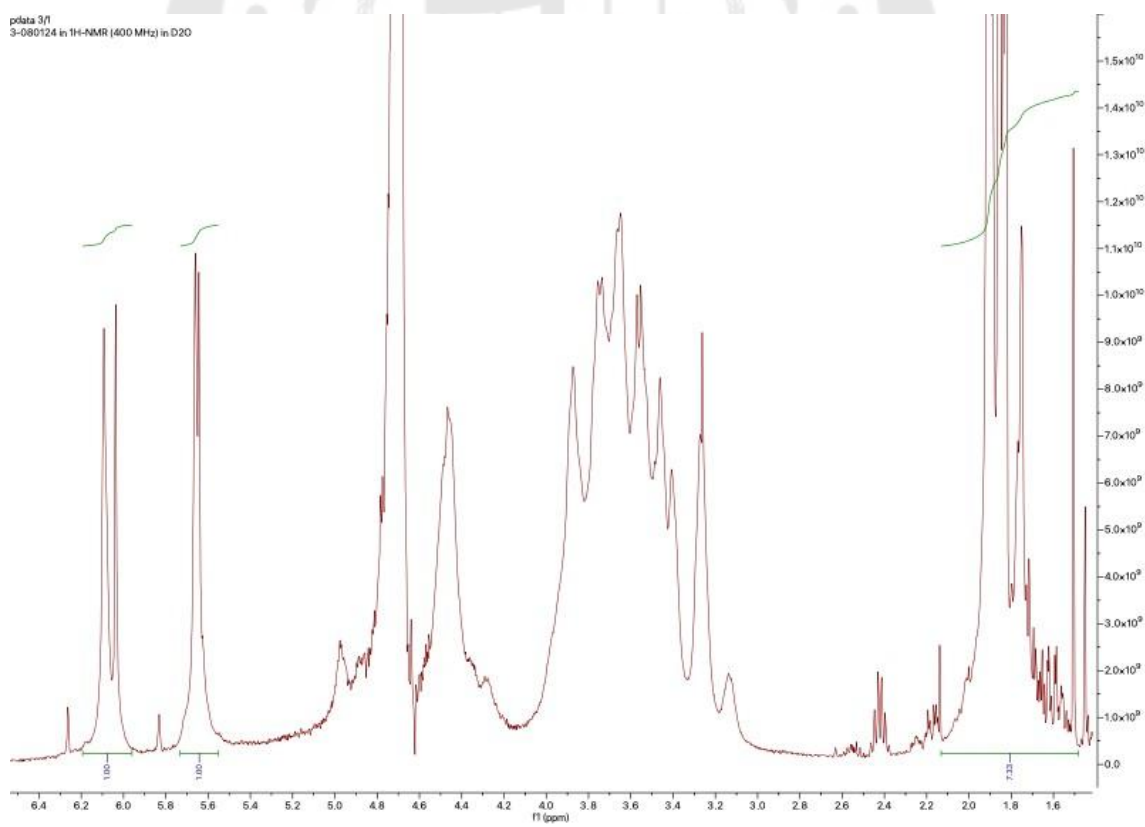
ค่า degree of modification ของไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกที่ถูกเมทาคริเลต



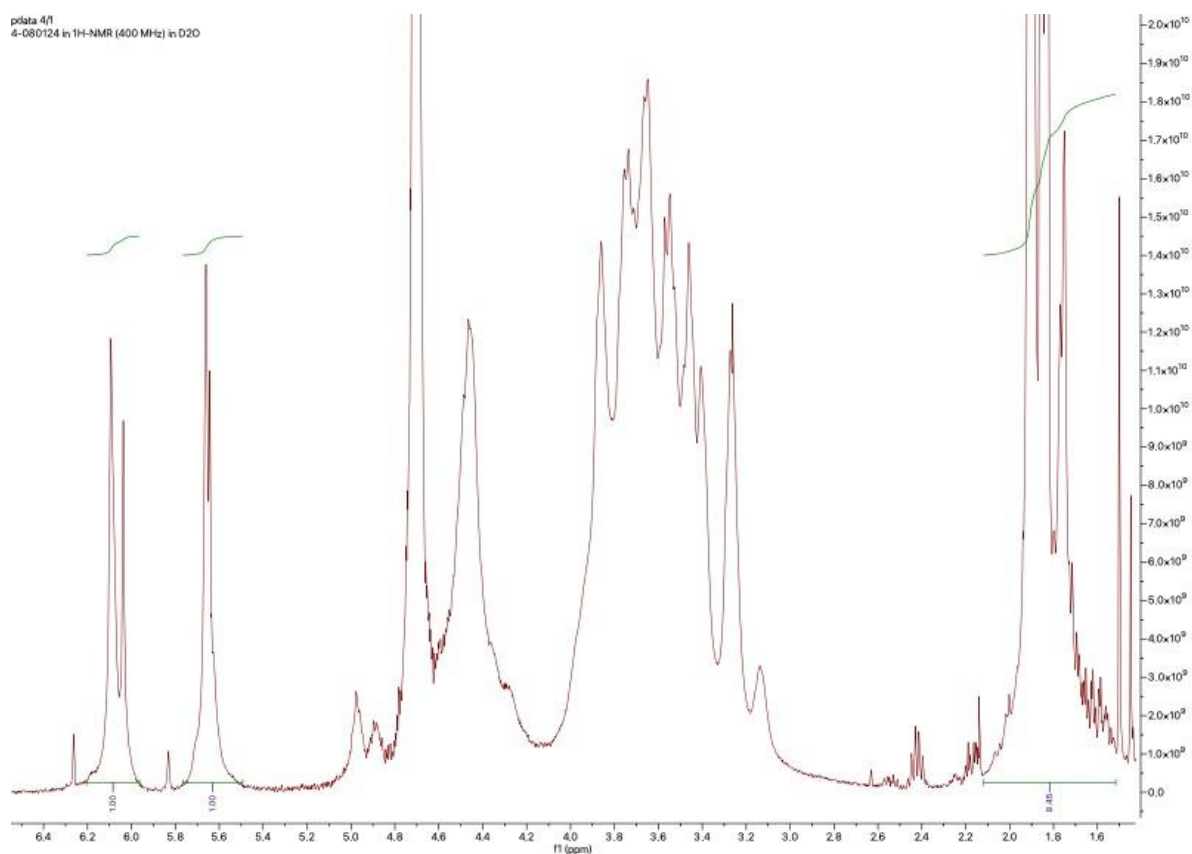
ภาพประกอบ ก ผลการสังเคราะห์ครั้งที่ 1 : ค่าปริมาณการเกิดการปรับปรุง คือ 100



ภาพประกอบ ข ผลการสังเคราะห์ครั้งที่ 2 : ค่าปริมาณการเกิดการปรับปรุง คือ 78



ภาพประกอบ ค ผลการสังเคราะห์ครั้งที่ 3 : ค่าปริมาณการเกิดการปรับปรุง คือ 84



ภาพประกอบ ง ผลการสังเคราะห์ครั้งที่ 4 : ค่าปริมาณการเกิดการปรับปรุง คือ 59

หนังสือรับรองจริยธรรมการวิจัย



AF19-03-03.1
August, 2023

หนังสือรับรองการยกเว้น หนังสือฉบับนี้ให้ไว้เพื่อแสดงว่า

ชื่อโครงการวิจัย : รูปแบบการปลดปล่อยโกรทแฟคเตอร์ชนิดบีเอ็มพี 2 และไฟโบรลาสตีโกรทแฟคเตอร์ 2 ในไฮโดรเจล
จากกรดไฮยาลูโรนิกที่มีการพอลิเมอร์ไลเซชันโดยแสงสีฟ้า
ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัย : รองศาสตราจารย์ ดร. ทันตแพทย์สรสัณฑ์ รัชสิยานนท์
หน่วยงานต้นสังกัด : คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
หมายเลขรับรอง : SWUEC-661020

คณะกรรมการจริยธรรมสำหรับพิจารณาโครงการวิจัยที่ทำในมนุษย์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ได้พิจารณาแล้ว
ว่าเป็นโครงการที่เข้าข่ายการพิจารณาแบบยกเว้น ตามประกาศมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ หากผู้วิจัยมีความประสงค์จะปรับปรุง
แก้ไขโครงการวิจัยที่เกี่ยวข้องกับระเบียบวิธีวิจัยและกลุ่มประชากรเป้าหมายจะต้องยื่นเสนอโครงการวิจัยใหม่ เพื่อขอรับการ
พิจารณาจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ก่อน และหากดำเนินการเสร็จสิ้นแล้วขอให้ยื่นแจ้งปิดโครงการวิจัยพร้อม
รายงานฉบับสมบูรณ์ หรือสำเนาบทความตีพิมพ์ทางวิชาการต่อคณะกรรมการฯ ทันที โดยหน่วยจริยธรรมและมาตรฐานการวิจัย
จะเก็บเอกสารโครงการวิจัยของท่านเป็นเวลา 3 ปี นับจากวันที่ออกหนังสือรับรอง

วันที่รับรอง : 3 ตุลาคม 2566

วันที่หมดอายุ : 2 ตุลาคม 2569

(ลงชื่อ).....

(แพทย์หญิงสุวิพร ภัทรสุวรรณ)

ประธานคณะกรรมการจริยธรรมสำหรับพิจารณาโครงการวิจัยที่ทำในมนุษย์ (ชุดที่ 1)
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

หน่วยจริยธรรมและมาตรฐานการวิจัย
อาคารนวัตกรรม ศ.ดร.สาโรช บัวศรี ชั้น 17
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
โทร. 02-649-5000 ต่อ 17503, 17506 โทรสาร 02-204-2590

ภาพประกอบ จ เอกสารรับรองจริยธรรมโครงการวิจัยที่เข้าข่ายพิจารณาแบบยกเว้น
จากคณะกรรมการจริยธรรมสำหรับพิจารณาโครงการวิจัยที่ทำในมนุษย์ มหาวิทยาลัย
ศรีนครินทรวิโรฒ หมายเลขรับรอง SWUEC-661020

ประวัติผู้เขียน

