



การศึกษาความเข้ากันได้ทางชีวภาพของไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกแบบฉีดที่ดัดแปลงแล้ว
ร่วมกับสารแมนนิทอลและบีเอสเอต่อเซลล์กระดูกขาพ้น เพื่อพัฒนาเป็นระบบนำส่งยา
BIOCOMPATIBILITY STUDY OF MODIFIED INJECTABLE HYALURONIC ACID
HYDROGEL WITH MANNITOL/BSA TO ALVEOLAR BONE CELLS FOR DRUG DELIVERY
SYSTEM DEVELOPMENT

ขวัญหทัย อาริวิจิตร

การศึกษาความเข้ากันได้ทางชีวภาพของไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกแบบฉีดที่
ดัดแปลงแล้วร่วมกับสารแมนนิทอลและบีเอสเอต่อเซลล์กระดูกเข้าฟัน เพื่อพัฒนาเป็น
ระบบนำส่งยา



ปริญญานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาการช่องปากและแม็กซิลโลเฟเชียล
คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ปีการศึกษา 2562
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

BIOCOMPATIBILITY STUDY OF MODIFIED INJECTABLE HYALURONIC ACID
HYDROGEL WITH MANNITOL/BSA TO ALVEOLAR BONE CELLS FOR DRUG
DELIVERY SYSTEM DEVELOPMENT



A Thesis Submitted in partial Fulfillment of Requirements
for MASTER OF SCIENCE (Oral and Maxillofacial Sciences)
Faculty of Dentistry Srinakharinwirot University

2019

Copyright of Srinakharinwirot University

ปริญญานิพนธ์

เรื่อง

การศึกษาความเข้ากันได้ทางชีวภาพของไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกแบบฉีดที่ดัดแปลงแล้วร่วมกับ
สารแมนนิทอลและบีเอสเอต่อเซลล์กระดูกเข้าฟัน เพื่อพัฒนาเป็นระบบนำส่งยา

ของ

ขวัญหทัย อารีวิจิตร

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาการช่องปากและแม็กซิลโลเฟเชียล

ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ฉัตรชัย เอกปัญญาสกุล)

คณะกรรมการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์

..... ที่ปรึกษาหลัก

(รองศาสตราจารย์ ดร.สรสัณห์ รังสิยานนท์)

..... ประธาน

(รองศาสตราจารย์ ดร.นันทา สารชนะกิจ)

..... ที่ปรึกษาร่วม

(รองศาสตราจารย์ ดร.นิรดา ธเนศวร)

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภัทราญ แต่บรรพกุล)

..... ที่ปรึกษาร่วม

(อาจารย์ ดร.จิตติมา ลัคนากุล)

ชื่อเรื่อง	การศึกษาความเข้ากันได้ทางชีวภาพของไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกแบบชนิดที่ดัดแปลงแล้วร่วมกับสารแมนนิทอลและปีเอสเอต่อเซลล์กระดูกเข้าฟัน เพื่อพัฒนาเป็นระบบนำส่งยา
ผู้วิจัย	ขวัญหทัย อารีวิจิตร
ปริญญา	วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต
ปีการศึกษา	2562
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. สรสิทธิ์ รังสิยานนท์

ปริมาณและคุณภาพของกระดูกเป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อความสำเร็จในการรักษาทางทันตกรรมรากเทียม ในปัจจุบันพบว่าวัสดุที่ใช้ในการปลูกถ่ายกระดูกยังมีข้อจำกัดบางประการ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวัสดุทางชีวภาพได้แก่ ระบบขนส่งสารชนิดไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกแบบชนิดที่ดัดแปลงแล้วร่วมกับสารแมนนิทอลและปีเอสเอในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน เพื่อพัฒนาในการใช้เป็นระบบนำส่งโกรทแฟกเตอร์ที่มีฤทธิ์กระตุ้นการสร้างกระดูก โดยศึกษาถึงความเข้ากันได้ทางชีวภาพกับเซลล์กระดูกเข้าฟันมนุษย์ ซึ่งเพาะเลี้ยงแบบ 3 มิติ และประเมินความมีชีวิตด้วยชุดทดสอบเรซาชูริน การสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการสร้างโปรตีนคอลลาเจนชนิดที่ 1 ด้วยวิธีการทางอิมมูโนฮิสโตเคมี จากการวิจัยพบว่า เซลล์กระดูกเข้าฟันมนุษย์ที่นำมาศึกษาโดยการเพาะเลี้ยงในเมทาโครเลตไฮยาลูโรนิกไฮโดรเจลที่ผสมน้ำตาลแมนนิทอลและโปรตีนปีเอสเอใน 4 อัตราส่วน สามารถมีชีวิตอยู่และเพิ่มจำนวนได้ในวันที่ 1, 3, 7, 10 และ 14 โดยมีค่าเฉลี่ยอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ไม่น้อยกว่ากลุ่มควบคุม โดยมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์เป็นรูปกลมในส่วนบนของไฮโดรเจลและมีรูปร่างรี ยาวในส่วนด้านล่างใกล้กับจานเพาะเลี้ยงเซลล์ โดยทั้ง 4 อัตราส่วนเซลล์ยังคงสามารถสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส และโปรตีนคอลลาเจนชนิดที่ 1 ได้ สรุปว่าไฮโดรเจลชนิดเมทาโครเลตจากกรดไฮยาลูโรนิกแบบชนิดที่ดัดแปลงแล้วร่วมกับสารแมนนิทอลและปีเอสเอทั้ง 4 อัตราส่วน มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพกับเซลล์กระดูกเข้าฟันมนุษย์ และมีแนวโน้มที่จะพัฒนาเพื่อนำส่งโกรทแฟกเตอร์ สำหรับงานด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูกในอนาคตต่อไป

คำสำคัญ : ความเข้ากันได้ทางชีวภาพ กรดไฮยาลูโรนิก ไฮโดรเจล เซลล์กระดูกเข้าฟัน

Title	BIOCOMPATIBILITY STUDY OF MODIFIED INJECTABLE HYALURONIC ACID HYDROGEL WITH MANNITOL/BSA TO ALVEOLAR BONE CELLS FOR DRUG DELIVERY SYSTEM DEVELOPMENT
Author	KWANHATAI AREEVIJIT
Degree	MASTER OF SCIENCE
Academic Year	2019
Thesis Advisor	Associate Professor Sorasun Rungsiyanonte , Ph.D.

The quality and quantity of bone play a major role in the success of dental implant treatment. Recently, bone grafting materials have reached some limitations. This study aimed to evaluate the biocompatibility of proprietary drug delivery material, injectable methacrylated hyaluronic acid hydrogel incorporated with different ratios of mannitol and BSA (Man/BSA MeHA), to human alveolar bone cells. The three-dimensionally encapsulated cell culture was evaluated with the resazurin cell viability test, alkaline phosphatase activity assay, immunohistochemistry test for collagen type-I synthesis and cell morphology. The results showed that the encapsulated cells were viable in all four ratios of Man/BSA MeHA hydrogel and the cell numbers increased by day one, three, seven, ten and fourteen and the average proliferation rate was not less than the control group. The morphology test showed round shape cells at the upper portion of the hydrogel and spindle shape at the lower portion of hydrogel next to the culture plate. All four groups could express enzyme alkaline phosphatase and collagen type-I. In conclusion, four ratios of Man/BSA MeHA hydrogel were biocompatibility with primary human alveolar bone cells and may be a promising vehicle for future growth factor delivery systems for bone tissue engineering.

Keyword : Biocompatibility Hyaluronic acid Hydrogel Alveolar bone cell

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาวิจัยและจัดทำปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยดีเนื่องจากได้รับความช่วยเหลือและความกรุณาอย่างดียิ่งจากคณาจารย์ และบุคคลหลายท่าน ผู้วิจัยมีความซาบซึ้งและขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ทพญ. ดร. นิรดา ธเนศวร และ ภญ. ดร. จิตติมา ลัคนากุล อาจารย์ที่ปรึกษาพร้อม และรองศาสตราจารย์ ทพ. ดร. สรสิทธิ์ รังสิยานนท์ อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก ประธานผู้ควบคุมปริญญานิพนธ์สำหรับคำแนะนำในการทำวิจัย การจัดทำปริญญานิพนธ์ และการแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ

ขอขอบพระคุณคณะเภสัชศาสตร์ และศูนย์เครื่องมือวิจัยทางเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับการเชื้อเพื่อสถานที่ห้องปฏิบัติการ ตลอดจนวัสดุและอุปกรณ์ทั้งหมดที่ใช้ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้

ขอบคุณเจ้าหน้าที่ในภาควิชาวิทยาการเภสัชกรรมและเภสัชอุตสาหกรรม และเจ้าหน้าที่ในศูนย์เครื่องมือวิจัยทางเภสัชศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับความช่วยเหลือและคำแนะนำต่างๆ

ขอบพระคุณศูนย์เครื่องมือวิจัยทางวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ สำหรับการเชื้อเพื่อคำแนะนำในการศึกษาวิจัย สถานที่ห้องปฏิบัติการ ตลอดจนวัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้

ขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อรุณา เจริญสุข ภาควิชาการวัดผลและวิจัยการศึกษา คณะศึกษาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ สำหรับคำแนะนำ และการให้คำปรึกษาด้านการจัดการข้อมูล และการคำนวณทางสถิติ

ขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการสำหรับนักศึกษาหลังปริญญา คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ สำหรับเครื่องมือและคำแนะนำในการศึกษาวิจัยนี้

ท้ายสุดขอกราบขอบพระคุณครอบครัว สำหรับกำลังใจและการสนับสนุนมาโดยตลอดจนสามารถสำเร็จการศึกษาในครั้งนี้ และทำให้ผู้วิจัยได้รับประสบการณ์อันทรงคุณค่า

ขวัญหทัย อารีวิจิตร

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญรูปภาพ	ฎ
บทที่ 1	1
บทนำ.....	1
ภูมิหลัง	1
ความมุ่งหมายของงานวิจัย.....	4
ความสำคัญของการวิจัย	4
ขอบเขตของการวิจัย	5
กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัย.....	5
ตัวแปรที่ศึกษา	5
นิยามศัพท์เฉพาะ	5
กรอบแนวคิดในงานวิจัย.....	6
สมมุติฐานในการวิจัย.....	6
บทที่ 2.....	25
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	25
เซลล์สร้างกระดูก	25
หน้าที่ของเซลล์สร้างกระดูก	27

ต้นกำเนิดของเซลล์สร้างกระดูก.....	27
การตรวจสอบคุณลักษณะของเซลล์สร้างกระดูก	30
งานด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูก	32
ระบบนำส่งสารชนิดไฮโดรเจลจากกระดูกไฮยาโลโรนิกในรูปแบบฉีด	37
บทที่ 3.....	43
วิธีดำเนินการวิจัย.....	43
การกำหนดประชากรและการสุ่มกลุ่มตัวอย่าง.....	43
ประชากร	43
การเลือกกลุ่มตัวอย่าง	43
ขั้นตอนการทดลอง.....	43
การเก็บเกี่ยวและเพาะเลี้ยงเซลล์.....	43
การทดสอบคุณลักษณะเฉพาะของเซลล์.....	44
การเตรียมสารเมทาโครเลตไฮยาโลโรนิกไฮโดรเจล.....	46
การทดสอบความมีชีวิตของเซลล์กระดูกบ่าฟันมนุษย์.....	48
การตรวจดูลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์.....	49
การทดสอบระดับปฏิกิริยาอัลคาไลน์ฟอสฟาเตส	49
การทดสอบการสร้างโปรตีนคอลลาเจนชนิดที่ 1	50
การเก็บรวบรวมข้อมูล	51
การจัดกระทำข้อมูลและการวิเคราะห์ข้อมูล	51
บทที่ 4.....	35
ผลการดำเนินงานวิจัย	35
ผลการเพาะเลี้ยงและทดสอบคุณลักษณะเฉพาะของเซลล์.....	35

ผลการสังเคราะห์เมทาโครเลตไฮยาโลโรนิกไฮโดรเจลและผสมเข้ากับน้ำตาลแมนนิทอลและโปรตีนบีเอสเอ.....	36
ผลการทดสอบความมีชีวิตของเซลล์กระดูกเบ้าฟันมนุษย์.....	37
ผลการตรวจดูลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์.....	39
ผลการทดสอบระดับปฏิกิริยาอัลคาไลน์ฟอสฟาเตส.....	39
ผลการทดสอบการสร้างโปรตีนคอลลาเจนชนิดที่ 1.....	42
บทที่ 5.....	44
สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.....	44
สรุปผลการวิจัย.....	44
อภิปรายผลการวิจัย.....	44
ข้อเสนอแนะ.....	49
ภาคผนวก.....	50
บรรณานุกรม.....	63
ประวัติผู้เขียน.....	68

สารบัญตาราง

ตาราง 1 แสดงโมเลกุลที่เป็นตัวชี้วัดของเซลล์สร้างกระดูกที่ระยะต่าง ๆ	28
ตาราง 2 ลำดับไพรเมอร์ที่ใช้ในการวัดการแสดงออกของยีน.....	45
ตาราง 3 แสดงอัตราส่วนของน้ำตาลแมนนิทอลต่อโปรตีนบีเอสเอ	47
ตาราง 4 แสดงระดับการเกิดปฏิกิริยาของการสังเคราะห์สารและระยะเวลาการก่อตัวเป็นเจล....	37
ตาราง 5 ผลทางสถิติของการเปรียบเทียบอัตราการเจริญของเซลล์ในกลุ่มอัตราส่วน 1:1	51
ตาราง 6 ผลทางสถิติของการเปรียบเทียบอัตราการเจริญของเซลล์ในกลุ่มอัตราส่วน 2:1	52
ตาราง 7 ผลทางสถิติของการเปรียบเทียบอัตราการเจริญของเซลล์ในกลุ่มอัตราส่วน 4:1	54
ตาราง 8 ผลทางสถิติของการเปรียบเทียบอัตราการเจริญของเซลล์ในกลุ่มอัตราส่วน 100:1	55
ตาราง 9 ผลทางสถิติของการเปรียบเทียบอัตราการเจริญของเซลล์ในกลุ่มควบคุม	55
ตาราง 10 ผลทางสถิติของการเปรียบเทียบอัตราการสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส	58

สารบัญรูปภาพ

ภาพประกอบ 1 กรอบแนวคิดงานวิจัย	6
ภาพประกอบ 2 แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาของเซลล์สร้างกระดูก	26
ภาพประกอบ 3 แสดงแผนผังการเกิดเซลล์สร้างกระดูก	29
ภาพประกอบ 4 แสดงโครงสร้างของกรดไฮยาลูโรนิก	38
ภาพประกอบ 5 แสดงผลการทดสอบคุณลักษณะของเซลล์	36
ภาพประกอบ 6 แสดงค่าสเปกตรัมของสาร	37
ภาพประกอบ 7 กราฟอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์	38
ภาพประกอบ 8 ภาพแสดงรูปร่างเซลล์จากกล้องจุลทรรศน์หัวกลับ	40
ภาพประกอบ 9 ภาพแสดงรูปร่างเซลล์จากวิธีอิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์	41
ภาพประกอบ 10 กราฟแสดงอัตราการสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส	42
ภาพประกอบ 11 ภาพแสดงการสร้างโปรตีนคอลลาเจนชนิดที่ 1	43

บทที่ 1

บทนำ

ภูมิหลัง

ปัจจุบันสังคมไทยเริ่มเข้าสู่สังคมผู้สูงอายุมากขึ้น ซึ่งอายุที่มากขึ้นนี้สัมพันธ์กับการมี ปัญหาสุขภาพช่องปากมากขึ้นตามมาด้วย โดยจากรายงานผลการสำรวจสภาวะสุขภาพช่องปากของกรมอนามัยในปี 2560 พบว่าปัญหาสุขภาพช่องปากที่สำคัญอย่างหนึ่งในกลุ่มผู้สูงอายุ คือการสูญเสียฟัน มีร้อยละการสูญเสียฟันทั้งปากของผู้ป่วยอายุ 60-74 ปี เท่ากับร้อยละ 8.7 และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องตามอายุที่มากขึ้นจนเมื่ออายุ 80-89 ปี พบการสูญเสียฟันทั้งปาก สูงถึงร้อยละ 31 ส่วนฟันแท้ที่ยังคงเหลือนั้นมักมีปัญหาหรือรอยโรค เช่น โรคฟันผุ โรคปริทันต์ เป็นต้น แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพการบดเคี้ยวที่ลดลงอย่างชัดเจน⁽¹⁾ การทดแทนฟันธรรมชาติที่ได้รับการแนะนำว่ามีประสิทธิภาพที่ดี มีอัตราความสำเร็จสูงถึงร้อยละ 95⁽²⁾ และเป็นที่นิยมในปัจจุบันคือการรักษาโดยการฝังรากเทียมทดแทนฟันที่สูญเสียไป อัตราความสำเร็จของรากฟันเทียมนั้นขึ้นกับการเกิดกระดูกเชื่อมประสาน (osseointegration) โดยมีปัจจัยที่เกี่ยวข้องหลายประการ หนึ่งในปัจจัยที่สำคัญคือคุณภาพและปริมาณของกระดูกที่รองรับรากฟันเทียม ผู้ป่วยส่วนใหญ่ที่มาับการรักษา มักมีปัญหาความพิการของกระดูกร่วมด้วย จึงมีการศึกษาพัฒนาเกี่ยวกับวัสดุที่จะช่วยในการเสริมสร้างกระดูก เพื่อช่วยให้เกิดกระบวนการกระดูกเชื่อมประสานของรากเทียมได้รวดเร็ว และเพิ่มอัตราความสำเร็จของการรักษาโดยการฝังรากเทียมให้สูงขึ้น^(2, 3)

การรักษาโดยการปลูกถ่ายกระดูก (bone graft) นั้นเป็นวิธีที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย และมีวัสดุต่าง ๆ มากมายให้เลือกใช้งาน เช่น การปลูกถ่ายกระดูกโดยใช้เนื้อเยื่อกระดูกในตนเอง (autogenous bone grafts) ซึ่งถือเป็นวิธีมาตรฐานที่มีอัตราความสำเร็จสูงถึงร้อยละ 80-90 มีการต่อต้านจากภูมิคุ้มกันในร่างกายต่ำ มีคุณสมบัติในการเหนี่ยวนำเซลล์สร้างกระดูก (osteinduction) เป็นโครงให้เกิดการยึดเกาะของเซลล์สร้างกระดูกและการสร้างเส้นเลือดใหม่ (osteoconduction) และสามารถสร้างเนื้อเยื่อกระดูกขึ้นได้เอง (osteogenesis) แต่มีข้อเสียคือมีปริมาณจำกัด เกิดความเจ็บปวดของบริเวณที่นำกระดูกทดแทนมา และทำให้ใช้เวลาในการรักษาเพิ่มมากขึ้น⁽³⁻⁵⁾ จึงมีการใช้วัสดุอื่นทดแทน ได้แก่ เนื้อเยื่อปลูกถ่ายเอกพันธุ์ (allografts) เนื้อเยื่อปลูกถ่ายวิวิธพันธุ์ (xenografts) และวัสดุปลูกถ่ายเฉื่อย (alloplastic materials) วัสดุเหล่านี้มีข้อดีในแง่ของปริมาณที่สามารถหาใช้ได้ไม่จำกัด ส่วนใหญ่แล้วมีคุณสมบัติในการเหนี่ยวนำเซลล์สร้าง

กระดูกและเป็นโครงให้เกิดการยึดเกาะของเซลล์สร้างกระดูกและการสร้างเส้นเลือดใหม่ ไม่สามารถสร้างเนื้อเยื่อกระดูกขึ้นได้เองเนื่องจากไม่มีเซลล์สร้างกระดูกอยู่ภายใน ข้อเสียคือ มีโอกาสเกิดการแพร่ส่งผ่านเชื้อโรค เกิดการต่อต้านสิ่งปลูกถ่ายจากภูมิคุ้มกันของร่างกาย การติดเชื้อและวัสดุสังเคราะห์ที่ใช้บางชนิดมีการละลายตัวที่ช้าหรือมีการละลายตัวที่ไม่สมบูรณ์ ทำให้ขัดขวางต่อการเกิดกระดูกเชื่อมประสานได้⁽³⁻⁵⁾ ด้วยข้อจำกัดเหล่านี้ งานทางด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อจึงยังคงถูกศึกษาและพัฒนาอย่างต่อเนื่องโดยมีแนวโน้มที่จะพัฒนาชีววัสดุ (biomaterial) เพื่อใช้ในการเสริมกระดูกแทนการใช้วัสดุปลูกถ่ายกระดูกดังกล่าว⁽⁴⁾

การศึกษาวิจัยงานด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อพบว่า คุณสมบัติในการเหนี่ยวนำเซลล์สร้างกระดูก (osteoinduction) โดยใช้โกรทแฟกเตอร์ (growth factor) มีความสำคัญต่อผลสำเร็จอย่างมาก^(4, 6, 7) เนื่องจากโกรทแฟกเตอร์เป็นปัจจัยที่สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์สร้างกระดูก (osteoprogenitor cell) เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก (osteoblast) และยังช่วยกระตุ้นเซลล์สร้างกระดูกให้เจริญเติบโต และทำงานได้ดียิ่งขึ้น โกรทแฟกเตอร์ที่ถูกนำมาใช้ในการรักษามีหลายชนิด เช่น Fibroblast growth factor-2 และ 9 (FGFs-2,9), Transforming growth factor β 1 (TGF- β 1), Vascular endothelial growth factors (VEGFs), Platelet rich plasma (PRP) และ Bone morphogenetic proteins (BMPs) เป็นต้น^(4, 6-8) ในปัจจุบันมีการศึกษาถึงประโยชน์ในทางคลินิกของการใช้โกรทแฟกเตอร์มากมาย แต่การที่จะผลิตออกมาใช้อย่างแพร่หลายในทางการค้านั้นทำได้น้อยเนื่องจากข้อจำกัดของระบบนำส่งสาร (drug delivery system) รูปแบบการค้ำที่มีใช้อยู่และได้รับการรับรองจากองค์การอาหารและยาแห่งสหรัฐอเมริกา คือ rhBMP-2 และ 7⁽⁷⁾ ในรูปแบบคอลลาเจนฟองน้ำ (absorbable collagen sponge (ACS)) มีความนิยมเนื่องจากเป็นวัสดุธรรมชาติ มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพ สามารถสลายได้ง่ายและเข้าทำปฏิกิริยากับสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ (bioactive molecules) แต่มีข้อเสียคือ เนื่องจากมีลักษณะคล้ายฟองน้ำ วัสดุจึงมีความแข็งแรงต่ำ เมื่อถูกแรงกดจากกล้ามเนื้อทำให้ไม่คงรูป ทำให้ไม่สามารถคาดการณ์และควบคุมอัตราการสลาย และอัตราการปลดปล่อยสารได้ ซึ่งมักพบว่าการปลดปล่อยสาร rhBMP-2 ในระยะแรกของ ACS จะออกมาในปริมาณที่สูงมากและพบปริมาณ rhBMP-2 คงเหลือน้อยกว่าร้อยละ 5 ที่ระยะเวลา 2 สัปดาห์ นอกจากนี้สารคอลลาเจนที่ได้มีต้นกำเนิดมาจากวัว ซึ่งอาจทำให้เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของร่างกายได้^(4, 7, 9) ดังนั้นจึงมีงานวิจัยจำนวนมากที่พยายามศึกษาวิจัยปรับปรุงระบบขนส่งสารที่สามารถนำส่งโกรทแฟกเตอร์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ สามารถรักษาระดับการคงอยู่และปลดปล่อยสารได้อย่างคงที่ มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพ สามารถละลายตัวได้หมดในระยะเวลาที่เหมาะสม และใช้งานง่าย^(7, 9, 10)

ระบบการขนส่งสารชนิดไฮโดรเจล (hydrogel) เป็นระบบขนส่งสารชีวภาพแบบ 3 มิติ ที่มีโครงร่างตาข่าย สามารถกักน้ำหรือสารชีวภาพได้ดี⁽¹¹⁾ ถือเป็นระบบที่ได้รับความนิยม และให้ผลสำเร็จสูงในการนำส่งสารจำพวกโกรทแฟกเตอร์ เนื่องจากสามารถควบคุมการปลดปล่อยสารได้ดี ซึ่งคุณสมบัติขึ้นกับลักษณะโครงสร้าง ชนิดและปริมาณสารเชื่อมโยง (crosslinker) ไฮโดรเจลสามารถสังเคราะห์ได้จากสารหลายชนิด⁽⁷⁾ หนึ่งในรูปแบบที่นิยมได้แก่ กรดไฮยาลูโรนิกไฮโดรเจล รูปแบบฉีด (injectable hyaluronic acid hydrogel) เป็นรูปแบบระบบการนำส่งสารที่มีประสิทธิภาพค่อนข้างดี เนื่องจากคุณสมบัติที่มีกรดไฮยาลูโรนิกเป็นองค์ประกอบหลักซึ่งมีความเข้ากันได้ทางชีวภาพสูง มีการตอบสนองโดยภูมิคุ้มกันในร่างกายต่ำ มีการสลายตัวได้ดีและสามารถเติมสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเข้าไปได้ (bioactive molecules) การใช้งานในรูปแบบฉีดทำให้ใช้งานได้ง่าย นำมาปรับใช้ได้โรคหลายรูปแบบเนื่องจากสามารถเติมเต็มและเคลื่อนไปตามรูปร่างความพิการต่าง ๆ ได้ นอกจากนี้ยังถือเป็นวิธีที่สามารถลดความรุนแรงและราคาค่าใช้จ่ายในการรักษาได้ จึงมีการนำมาใช้งานอย่างแพร่หลาย เช่น ใช้ในการรักษาโรคเกี่ยวกับกระดูกและข้อ ใช้ในการนำส่งยา สารพันธุกรรม (DNA plasmids) เซลล์ และนำส่งโกรทแฟกเตอร์หลายชนิดโดยเฉพาะ BMP-2^(6, 7, 10) ปัจจุบันมีผู้ศึกษาวิจัยและนำไปปรับปรุงสูตรให้ดีขึ้น Maturavongsadit และคณะในปี 2016⁽¹²⁾ และ 2017⁽¹³⁾ ได้พัฒนาระบบนำส่งสารจากเมทาโครเลตไฮยาลูโรนิกไฮโดรเจล (methacrylated hyaluronic acid hydrogel (MeHA hydrogel)) เพื่อใช้ในการนำส่งเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์ โดยศึกษาถึงสารเชื่อมโยงชนิดต่าง ๆ ที่ใช้ในการเชื่อมต่อก่อนของ MeHA ให้เกิดโครงสร้างแบบร่างแห โดยเปรียบเทียบกับสารเชื่อมโยงไดไธโอรีทอล (dithiotreitol crosslinked (DTT)) เนื่องจากสารเชื่อมโยงชนิดนี้สามารถก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ได้เมื่อใช้ในปริมาณมาก ส่งผลให้การปรับปรุงสูตรของระบบนำส่งสารทำได้ค่อนข้างยาก แล้วนำมาตรวจสอบคุณสมบัติทางกายภาพ อัตราการปลดปล่อยโปรตีนโดยใช้ Bovine serum albumin (BSA) ซึ่งเป็นโปรตีนที่ผลิตจากวัว มีขนาดโมเลกุลเล็ก เสถียร และมักใช้เป็นโปรตีนต้นแบบในการศึกษาวิจัย รวมทั้งศึกษาความเข้ากันได้ทางชีวภาพกับเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์ จากการศึกษาพบว่าสารเชื่อมโยงที่มีโครงสร้างและความเข้มข้นต่างกัน ส่งผลต่อคุณสมบัติทางกายภาพของไฮโดรเจลที่ต่างกันออกไป แต่ยังคงมีโครงสร้างและคุณสมบัติทางกายภาพที่เหมาะสม สามารถก่อตัวเป็นเจลภายในเนื้อเยื่อได้ มีคุณสมบัติการปลดปล่อยโปรตีน Bovine serum albumin (BSA) ในรูปแบบค่อยๆปลดปล่อยออกมาทีละน้อย เมทาโครเลตไฮยาลูโรนิกไฮโดรเจลที่เชื่อมโยงโดยใช้สารไดไธโอรีทอลนั้น มีระดับการมีชีวิตอยู่

ของเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์มากกว่าร้อยละ 70 และมีระดับการมีชีวิตอยู่ของเซลล์นานที่สุดเมื่อเทียบกับสารเชื่อมโยงกลุ่มอื่น

การศึกษาของนพพันธ์และคณะในปี 2018⁽¹⁴⁾ ได้พัฒนาระบบนำส่งสารจากเมทาโครเลตไฮยาโลโรนิกไฮโดรเจล^(12, 13) โดยเติมน้ำตาลแมนนิทอล (mannitol) ซึ่งเข้ามามีบทบาทในการเป็นส่วนเติมยา (excipient) ช่วยในการควบคุมความเข้มข้นและควบคุมการปลดปล่อยสารได้ดียิ่งขึ้น⁽¹⁵⁾ ทำการศึกษาถึงอัตราส่วนของน้ำตาลแมนนิทอลต่อโปรตีนบีเอสเอที่มีผลต่อคุณสมบัติทางกายภาพของเมทาโครเลตไฮยาโลโรนิกไฮโดรเจลดัดแปลงในรูปแบบฉีด โดยโปรตีนบีเอสเอถูกใช้เป็นตัวแทนของยาที่เป็นสารโปรตีนหรือเปปไทด์ พบว่าน้ำตาลแมนนิทอลสามารถใช้เป็นสารเพิ่มปริมาณยา โดยอัตราส่วนของน้ำตาลแมนนิทอลที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้มีการปลดปล่อยโปรตีนบีเอสเอออกมาได้เร็วขึ้นด้วย นอกจากนี้ยังสามารถปรับเพิ่มลดอัตราส่วนของน้ำตาลแมนนิทอลต่อโปรตีนบีเอสเอได้โดยไม่รบกวนต่อคุณสมบัติทางกายภาพของเมทาโครเลตไฮยาโลโรนิกไฮโดรเจลดัดแปลงในรูปแบบฉีด

เพื่อความสมบูรณ์ในการพัฒนาระบบขนส่งสารชนิดเมทาโครเลตไฮยาโลโรนิกไฮโดรเจลดัดแปลงในรูปแบบฉีดร่วมกับน้ำตาลแมนนิทอลและโปรตีนบีเอสเอ ที่ผ่านการทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพแล้ว ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้จึงนำสูตรที่ได้รับการพัฒนามาทดสอบเพื่อศึกษาถึงความเข้ากันได้ทางชีวภาพ (biocompatibility) กับเซลล์กระดูกเบ้าฟันมนุษย์ (human alveolar bone cells)

ความมุ่งหมายของงานวิจัย

ในการวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยได้ตั้งความมุ่งหมายไว้ดังนี้

1. เพื่อทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพระหว่างเมทาโครเลตไฮยาโลโรนิกไฮโดรเจลดัดแปลงในรูปแบบฉีดร่วมกับน้ำตาลแมนนิทอลและโปรตีนบีเอสเอต่อเซลล์กระดูกเบ้าฟันมนุษย์

ความสำคัญของการวิจัย

เป็นการพัฒนาวัสดุทางชีวภาพเพื่อใช้ในงานด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูก และสามารถนำไปใช้ประโยชน์ทางคลินิกเพื่อรักษาผู้ป่วยที่มีปัญหาความพิการของกระดูกในงานทันตกรรมด้านอื่น ๆ ต่อไป ตัวอย่างเช่น ใช้ในการเร่งการสร้างกระดูกในงานทันตกรรมรากเทียม หรืองานศัลยกรรมปริทันต์ เป็นต้น

ขอบเขตของการวิจัย

กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัย

เซลล์กระดูกเบ้าฟันมนุษย์

ตัวแปรที่ศึกษา

1. ตัวแปรอิสระ แบ่งเป็นดังนี้

1.1 เมทาโครเลตไฮยาลูโรนิกไฮโดรเจลดัดแปลงในรูปแบบฉีดที่ผสมน้ำตาลแมนนิทอลและโปรตีนบีเอสเอใน 4 อัตราส่วน

2. ตัวแปรตาม ได้แก่

2.1 ความมีชีวิตของเซลล์ (cell viability)

2.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ (cell morphology)

2.3 ระดับปฏิกิริยาอัลคาไลน์ฟอสฟาเตส (alkaline phosphatase activity)

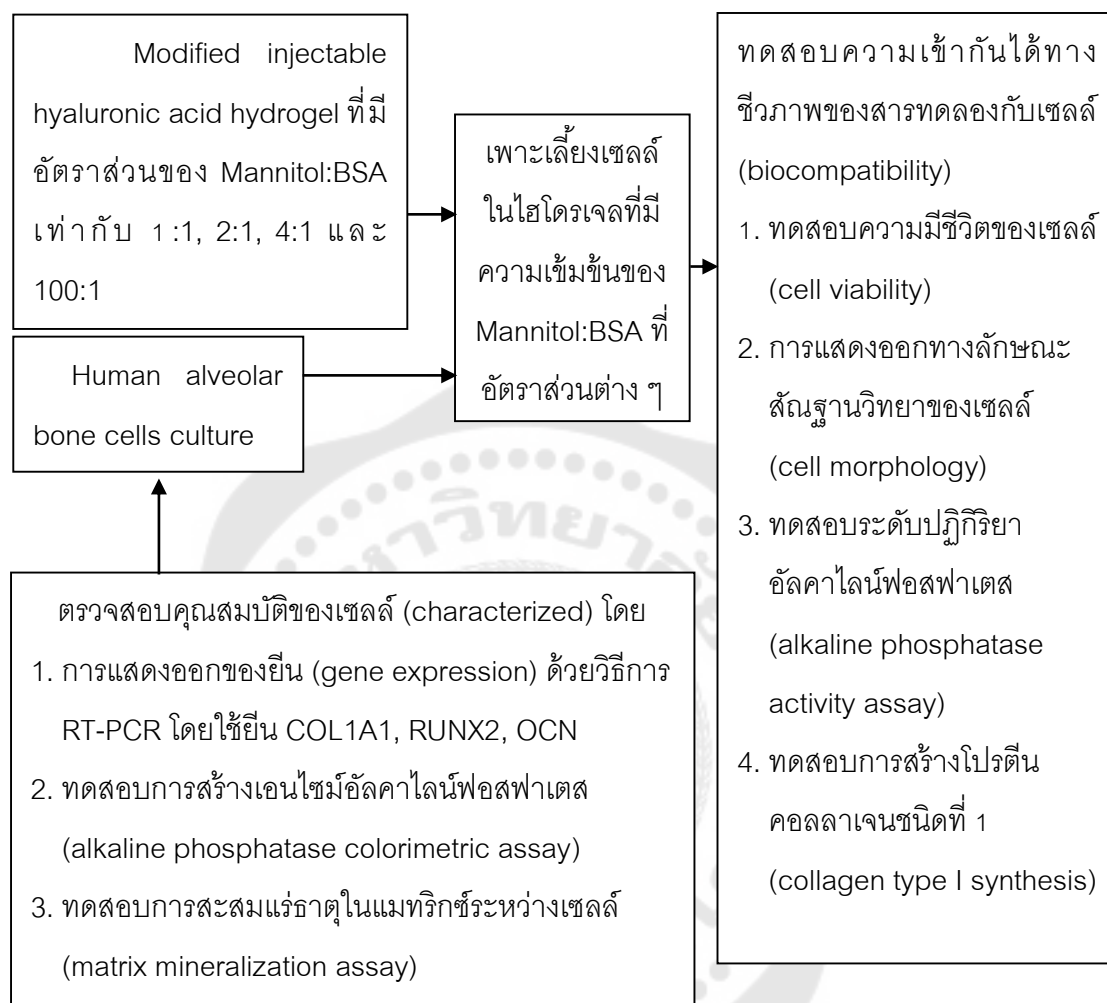
2.4 การสร้างโปรตีนคอลลาเจนชนิดที่ 1 (collagen type-I synthesis)

นิยามศัพท์เฉพาะ

1. Modified injectable hyaluronic acid hydrogel หมายถึง ระบบนำส่งสารชนิดไฮโดรเจลที่ผลิตจากกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้รับการปรับปรุงสูตร โดยเติม Methacrylic anhydride เป็นเมทาโครเลตไฮยาลูโรนิก (MeHA) และทำการเชื่อมโยงด้วยไดไธโอเทรียล (dithiotreitol crosslinked (DTT)) เกิดเป็นเมทาโครเลตไฮยาลูโรนิกไฮโดรเจล ซึ่งสามารถนำมาใช้ได้ในรูปแบบฉีด เป็นรูปแบบของระบบการนำส่งสารที่มีประสิทธิภาพสูง เข้ากับเนื้อเยื่อได้ดี ใช้ในการนำส่งสารต่าง ๆ เช่น เซลล์ ยา โปรตีนชนิดต่าง ๆ เป็นต้น

2. Human alveolar bone cells หมายถึง เซลล์กระดูกเบ้าฟันมนุษย์ ที่ได้รับการเก็บเกี่ยวจากบริเวณขากรรไกรของมนุษย์ และมีคุณสมบัติในการเพิ่มจำนวน และสร้างเนื้อเยื่อกระดูกได้

กรอบแนวคิดในงานวิจัย



ภาพประกอบ 1 กรอบแนวคิดงานวิจัย

สมมุติฐานในการวิจัย

เมทาโครเลตไฮยาโลโรนิกไฮโดรเจลดัดแปลงในรูปแบบจืดที่ผสมน้ำตาลแมนนิทอลและโปรตีนบีเอสเอใน 4 อัตราส่วน มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพกับเซลล์กระดูกเบ้าฟันมนุษย์

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในการวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยได้ศึกษาเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง และได้นำเสนอตามหัวข้อต่อไปนี้

1. เซลล์สร้างกระดูก (Osteoblast)
2. งานด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูก
3. ระบบนำส่งสารชนิดไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกในรูปแบบฉีด

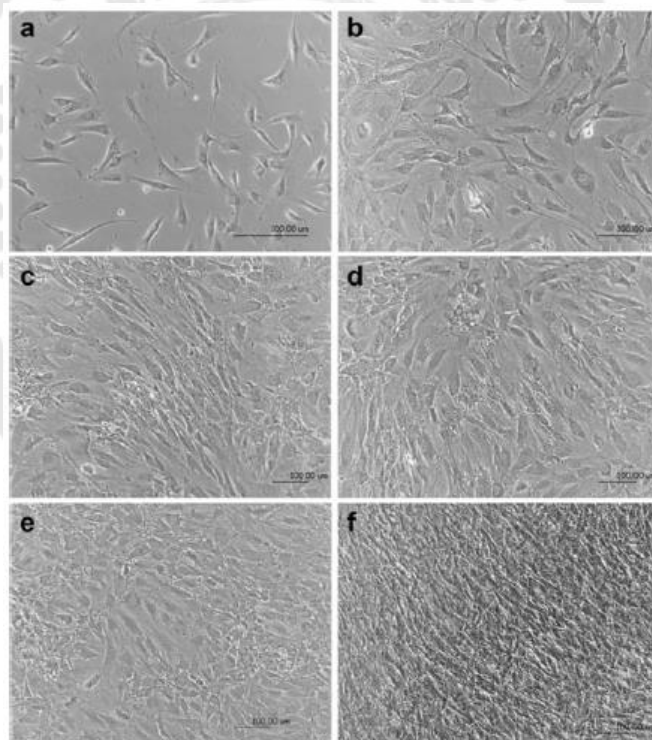
เซลล์สร้างกระดูก (Osteoblast)

กระดูกเป็นโครงสร้างแข็งทำหน้าที่ปกป้องอวัยวะภายในที่สำคัญของร่างกาย เป็นที่อยู่ของไขกระดูก และเป็นแหล่งที่อุดมด้วยแร่ธาตุ โกรทแฟคเตอร์และไซโตไคน์ชนิดต่าง ๆ มีคุณสมบัติพิเศษในการงอกใหม่ ซ่อมแซมตัวเองได้เมื่อเกิดการบาดเจ็บ และมีกระบวนการปรับรูปร่างกระดูก (bone remodeling) เกิดขึ้นเพื่อคงความแข็งแรง ตอบสนองต่อความเสียหายระดับไมโคร (micro damage) ตลอดช่วงชีวิต^(16, 17) โดยเกิดขึ้นจากกระบวนการหลัก ๆ 3 กระบวนการ ได้แก่ กระบวนการสร้างกระดูก (osteogenesis), การเปลี่ยนแปลงรูปร่างกระดูก (modeling) และการปรับรูปร่างเพื่อการคงรูปและเพิ่มความแข็งแรง (remodeling) กระบวนการทั้งหมดนี้ถูกควบคุมด้วยการทำงานของเซลล์สร้างกระดูก (osteoblast) ซึ่งทำงานร่วมกับเซลล์สลายกระดูก (osteoclast) เป็น Bone multicellular unit⁽¹⁶⁾

เซลล์สร้างกระดูกมีลักษณะเป็นเซลล์ที่มีนิวเคลียสเดี่ยว (mononucleated) มีรูปร่างแบนราบ หรือรูปลูกบาศก์ (cuboidal shape) ขึ้นกับช่วงของการเจริญเติบโตของเซลล์ อยู่รอบผิวกระดูกที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นมาใหม่^(16, 17) Edyta และคณะในปี 2016⁽¹⁸⁾ ได้ศึกษาถึงลักษณะของเซลล์สร้างกระดูกขณะอยู่ในกระบวนการสร้างกระดูก โดยทำการเก็บเกี่ยวขึ้นกระดูกจากการผ่าตัดข้อหัวเข่า แล้วนำมาเพาะเลี้ยง พบว่าในช่วงแรกที่เซลล์กำลังอยู่ในช่วงการยึดเกาะ (adhesion) และช่วงการเพิ่มจำนวนเซลล์ (proliferation) ประมาณ 7-9 วันแรก เซลล์จะมีลักษณะรี ยาว คล้ายเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (fibroblast-like cell) เมื่อถึงวันที่ 14 -17 ของการเพาะเลี้ยง ลักษณะพื้นฐานของเซลล์เริ่มเปลี่ยนเป็นรูปลูกบาศก์ และเมื่อถึงวันที่ 21 เซลล์จะมีลักษณะยาวขึ้น ซึ่งตรงกับ

ช่วงแรกและช่วงท้ายของการเจริญเติบโตเต็มที่ (early and late maturation stage) ของเซลล์สร้างกระดูก (ภาพประกอบ 2)

เมื่อแมทริกซ์ของกระดูก (bone matrix) ล้อมรอบเซลล์สร้างกระดูกแล้ว เซลล์สร้างกระดูกจะกลายเป็นเซลล์กระดูก (osteocytes) ฝังในเนื้อกระดูกและมีส่วนเชื่อมโยงแต่ละเซลล์ถึงกันเพื่อถ่ายทอดสารต่าง ๆ เซลล์สร้างกระดูกที่อยู่ผิวสัมผัสกับเยื่อหุ้มกระดูกจะค่อย ๆ เฉื่อยลง (inert) หรือเกิดกระบวนการตายของเซลล์ (apoptosis) เมื่อเซลล์สร้างกระดูกที่เจริญเติบโตเต็มที่ที่มีปริมาณน้อยลงแล้ว จะมีการสร้างและพัฒนาของเซลล์สร้างกระดูกใหม่เกิดขึ้นจากเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ (mesenchymal progenitor cells) ตามมา เซลล์สร้างกระดูกนั้นมียุ่ตลอดช่วงชีวิต แต่การทำงานจะเด่นที่สุดในช่วงที่ตัวอ่อนมีการสร้างโครงร่างกระดูกและเจริญเติบโต ในผู้ใหญ่เซลล์สร้างกระดูกจะถูกกระตุ้นให้การทำงานเมื่อต้องการซ่อมสร้างหรือมีบาดแผลเกิดที่กระดูก⁽¹⁶⁾



ภาพประกอบ 2 แสดงลักษณะพื้นฐานวิทยาของเซลล์สร้างกระดูก โดย (a) หลังการเพาะเลี้ยงที่เวลา 24 ชั่วโมง, วันที่ 7 (b), วันที่ 9 (c), วันที่ 14 (d), วันที่ 17 (e) และวันที่ 21 (f)

ที่มา : Wrobel E, Leszczynska J, Brzoska E. The Characteristics of Human Bone-Derived Cells (HBDCS) during osteogenesis in vitro. Cellular & Molecular Biology Letters. 2016; 21: 26.

หน้าที่ของเซลล์สร้างกระดูก (osteoblast function)

1. สร้างเนื้อเยื่อกระดูก โดยการสังเคราะห์และหลั่งโปรตีนที่สำคัญออกมาสู่แมทริกซ์นอกเซลล์ (extracellular matrix) มีการแสดงออกของยีนที่จำเป็นและเพียงพอต่อการกระตุ้นให้เกิดการสะสมแร่ธาตุ (mineralization) ที่แมทริกซ์นอกเซลล์ เซลล์สร้างกระดูกจะสะสม osteoid เฉพาะในแมทริกซ์ที่มีการสะสมแร่ธาตุ (pre-existing mineralized matrix) อยู่ก่อน แล้วยึดเกาะกับแมทริกซ์นั้นด้วย $\beta 1$ integrins เกิดโครงสร้างชั้นเดียวที่เชื่อมกันด้วย cadherins เมื่อเซลล์สร้างกระดูกถูกกระตุ้นจะหลั่งโปรตีนที่ประกอบด้วยโปรตีนคอลลาเจน (collagenic protein) ร้อยละ 90 ซึ่งโปรตีนที่พบได้มากที่สุดคือโปรตีนคอลลาเจนชนิดที่ 1 (type I collagen) พบได้มากถึงร้อยละ 97 มีหน้าที่เป็นโครงข่ายสามมิติช่วยในการควบคุมกระบวนการสะสมแร่ธาตุ นอกจากนี้ยังมีโปรตีนคอลลาเจนชนิดที่ 5 (type V collagen) ร้อยละ 3 และโปรตีนที่ไม่ใช่คอลลาเจน (non-collagenic protein) อีกร้อยละ 10 เช่น osteocalcin ร้อยละ 20 (ถือเป็นโปรตีนที่มีปริมาณมากเป็นอันดับ 2 รองจากคอลลาเจนชนิดที่ 1), osteonectin ร้อยละ 20, bone sialoproteins ร้อยละ 12, proteoglycans ร้อยละ 10, osteopontin, fibronectin และ bone morphogenic proteins เป็นต้น^(16, 18, 19)

2. ควบคุมการเปลี่ยนแปลงของเซลล์สลายกระดูก โดยมียีน M-CSf และ RANKL เป็นยีนควบคุมหลักผ่านเซลล์สร้างกระดูก นอกจากนี้เซลล์สร้างกระดูกยังสามารถควบคุมการแสดงออกของ chemo attractants เช่น CCL8, CCL6 และ CCL12 โดยการส่งสัญญาณ calcineurin/NFAT กระตุ้นให้เกิดการรวมกลุ่มกันของเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สลายกระดูก และส่งผลให้กระบวนการสลายกระดูกเกิดขึ้นได้⁽¹⁹⁾

3. ไขกระดูก กระดูก และระบบประสาท มีส่วนในการควบคุมสมดุลของ hematopoietic stem cells (HSCs)⁽¹⁹⁾

ต้นกำเนิดของเซลล์สร้างกระดูก^(16, 17, 19)

กระบวนการซ่อมสร้างกระดูกนั้นเกิดขึ้นได้ 2 ลักษณะ ได้แก่ อินทราเมมเบรนัส (intramembranous ossification) และ การสร้างกระดูกเอนโดคอนดรอล (endochondral ossification) เซลล์สร้างกระดูกที่มีต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อเอ็กโทเดิร์มจากระบบประสาท (neural ectoderm) และจากเซลล์ต้นฉบับเซลล์สร้างกระดูกชนิดมีเซนไคม์ (mesenchymal progenitor cells) โดยตรง ทำหน้าที่สร้างกระดูกส่วนกะโหลกศีรษะ ใบหน้า และกระดูกโพลาร้างบางส่วนผ่านขบวนการสร้างกระดูกแบบอินทราเมมเบรนัส ส่วนเซลล์ที่มีต้นกำเนิดผ่าน intermediate class ของ perichondral cells หรือเกิดการจากบวม (hypertrophic) ของเซลล์สร้างกระดูกก่อน

(chondrocyte) เมื่อได้รับอิทธิพลจากฮอร์โมนของต่อมไร้ท่อ (paracrine) จะสามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก และมีการสร้างกระดูกแบบเอนโดคอนดรอลได้ (ภาพประกอบ 3)

เซลล์ต้นกำเนิดหลักของเซลล์สร้างกระดูก คือ เซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์ (mesenchymal stromal cells (MSCs)) ซึ่งมีความสามารถในการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ได้หลายชนิด ได้แก่ เซลล์กล้ามเนื้อ เซลล์สร้างกระดูก เซลล์สร้างกระดูกอ่อน และเซลล์ไขมัน โดยการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ชนิดใดนั้นถูกกำหนดโดย transcriptional regulators ที่ทำให้เกิดการแสดงออกที่แตกต่างกัน เช่น MyoD มีผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กล้ามเนื้อ, Sox9 กระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์สร้างกระดูกอ่อน หรือ Runx2 (Cbfa1) ทำให้เกิดการพัฒนามาเป็นเซลล์สร้างกระดูก เป็นต้น (ภาพประกอบ 3)

เมื่อ Runx2 ถูกกระตุ้น ทำให้เซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์มีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ที่เรียกว่า preosteoblast จากนั้นจะผ่านระยะการเปลี่ยนแปลง (differentiation) ของเซลล์สร้างกระดูกซึ่งแบ่งเป็น 3 ช่วง ในแต่ละช่วงนั้นจะมีการแสดงออกของโมเลกุลที่เป็นตัวชี้วัด (molecule markers) แตกต่างกันไป (ตาราง 1)

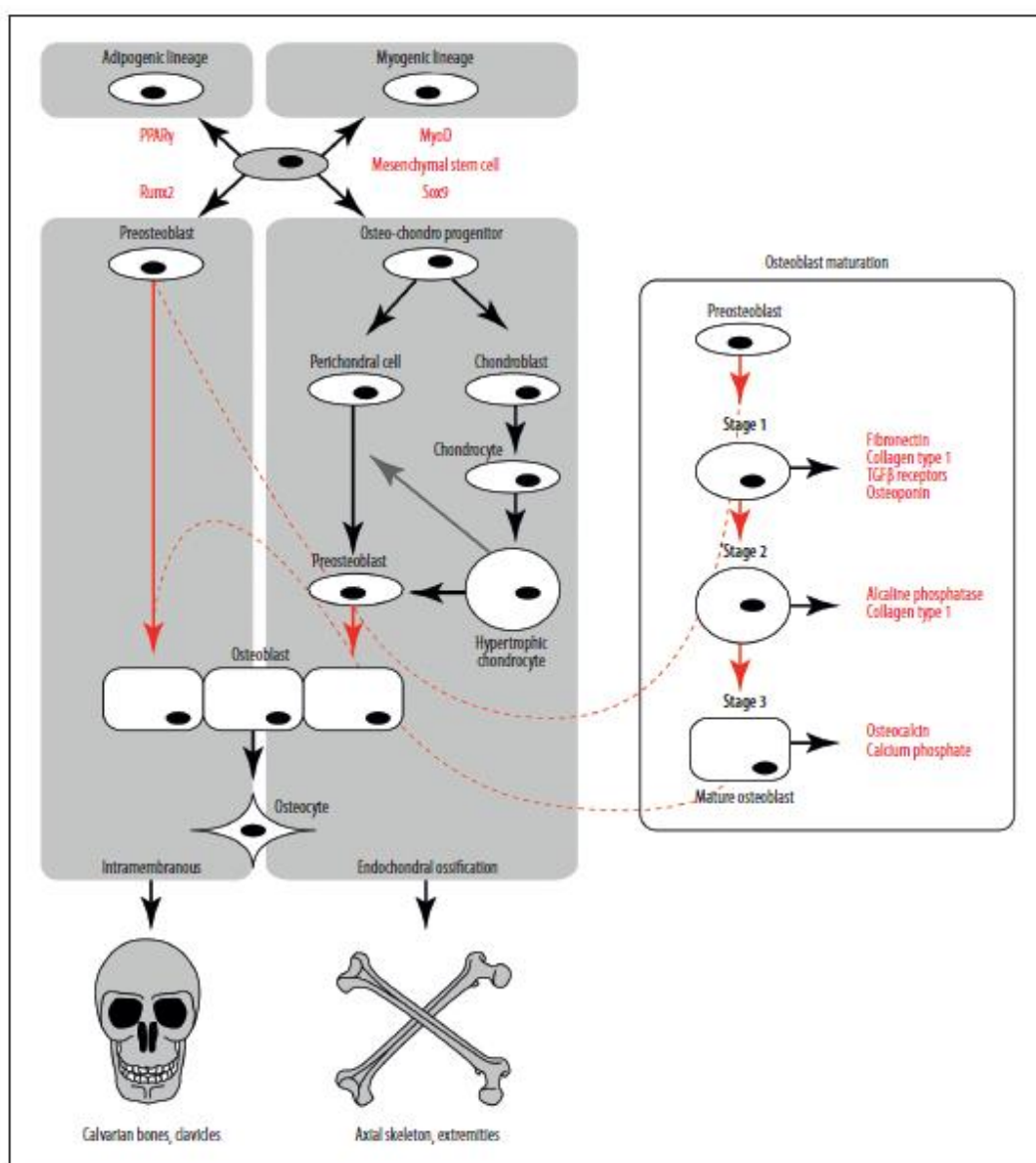
1. ช่วงที่ 1 การแบ่งตัวเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ (proliferation) สามารถพบการแสดงออกของ fibro-nectin, collagen, TGFb receptor 1 และ osteopontin
2. ช่วงที่ 2 หยุดการแบ่งเซลล์ เริ่มมีการเปลี่ยนแปลงไปของเซลล์ (differentiation) มีการหลั่งสารเข้าสู่แมทริกซ์นอกเซลล์ เช่น ALP และ Col I
3. ช่วงที่ 3 การสะสมแร่ธาตุ เกิดขึ้นเมื่อโครงร่างอินทรีย์ (organic scaffold) ในแมทริกซ์นอกเซลล์อุดมไปด้วย osteocalcin ซึ่งช่วยกระตุ้นให้แร่ธาตุต่าง ๆ เข้ามาสะสมภายในแมทริกซ์ ในช่วงนี้พบว่าเซลล์จะมีลักษณะเป็นรูปลูกบาศก์

ตาราง 1 แสดงโมเลกุลที่เป็นตัวชี้วัดของเซลล์สร้างกระดูกที่ระยะต่าง ๆ

MSC	Immature Osteoprogenitor	Mature Osteoprogenitor	Preosteoblast	Differentiated osteoblast	Osteocyte
Alkaline Phosphatase (ALP)	-	+	++	+++	-
Phex	-	-	-	+++	+++
Osteocalcin (OCN)	-	-	-	- → +++	-
Osteopontin (OPN)	-/+	-/+	- → +	- → +++	- → +++
Runx2	+	+	++	+++	+++
Osterix	-	-	++	++	?
Collα1	-	++	++	++	-
Bone sialoprotein (BSP)	- ↔ +++	++ ↔ -	- → +++	- → +++	- → +++

-, no detectable expression; -/+, ++, +++, expression ranging from detectable to very high; - → +++, heterogenous expression in individual cells.

ที่มา : Huang W, Yang S, Shao J, Li Y-P. Signaling and transcriptional regulation in osteoblast commitment and differentiation. *Front Biosci.* 2007; 12: 3068-92.



ภาพประกอบ 3 แสดงแผนผังการเกิดเซลล์สร้างกระดูก

ที่มา : Rutkovskiy A, Stensløkken K-O, Vaage IJ. Osteoblast Differentiation at a Glance. *Medical Science Monitor Basic Research.* 2016; 22: 95-106

การตรวจสอบคุณลักษณะของเซลล์สร้างกระดูก (Osteoblast characterization)

เซลล์กระดูกมนุษย์นั้นสามารถเก็บเกี่ยวได้จากหลายแหล่งในร่างกาย เช่น กระดูกไขกระดูก เยื่อหุ้มกระดูก และเนื้อเยื่อไขมัน แต่ผลผลิตของเซลล์ที่ได้มาจากแหล่งต่าง ๆ นั้นมีความแตกต่างกันทั้งในด้านความสามารถในการเพิ่มจำนวนเซลล์ และศักยภาพในการเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างกระดูก ปัจจุบันพบว่ากระดูกขากรรไกรมนุษย์สามารถใช้เป็นแหล่งเก็บเกี่ยวและเพาะเลี้ยงเซลล์ที่มีศักยภาพในการเหนี่ยวนำให้เป็นเซลล์สร้างกระดูกได้ดี เกิดพยาธิสภาพต่อบริเวณที่เก็บน้อย และเซลล์ที่ได้มีความเหมาะสมต่อการศึกษาและนำมาใช้งานด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูกในงานทันตกรรม เช่น งานด้านปริทันตวิทยา และการซ่อมแซมกระดูกบริเวณขากรรไกรและใบหน้า (maxillofacial tissue engineering-based bone repair) มากกว่าการใช้เซลล์กระดูกที่เก็บเกี่ยวจากบริเวณอื่น⁽²⁰⁾ อย่างไรก็ตามขึ้นกระดูกที่เก็บเกี่ยวและเพาะเลี้ยงจากกระดูกภายในช่องปากนั้น สามารถพบเซลล์ได้หลายชนิด เช่น เซลล์สร้างกระดูก เซลล์ไฟโบรบลาสต์ เซลล์เนื้อเยื่อปริทันต์ และเซลล์สร้างเคลือบรากฟัน (cementoblast) เป็นต้น⁽²¹⁾ ดังนั้นวิธีการเก็บ เพาะเลี้ยงและการตรวจสอบคุณลักษณะของเซลล์ก่อนนำมาใช้งาน จึงมีผลสำคัญต่อการศึกษาพัฒนางานด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูกในมนุษย์มาก

การตรวจสอบคุณลักษณะของเซลล์สร้างกระดูกนั้นมีหลายวิธี เช่น

1. การทดสอบระดับปฏิกิริยาอัลคาไลน์ฟอสฟาเตส (alkaline phosphatase assay) โดยเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสเป็นเอนไซม์ที่สามารถพบได้ทั่วไป สร้างได้จากตับ ลำไส้ และกระดูก ในเซลล์สร้างกระดูกนั้นเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสเป็นเอนไซม์ที่อยู่ภายนอกเซลล์ จับอยู่ที่พื้นผิวเซลล์ ทำหน้าที่เติมหมู่ฟอสเฟตเพื่อช่วยให้เกิดการสะสมแร่ธาตุที่เมทริกซ์นอกเซลล์ สลาย inorganic pyrophosphate ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ยับยั้งการสะสมแร่ธาตุในกระดูก จึงสามารถใช้บ่งชี้ถึงการทำงานของเซลล์สร้างกระดูกได้ แต่ไม่ใช่วิธีการที่จำเพาะเจาะจง เนื่องจากอาจพบเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสในเซลล์เนื้อเยื่อปริทันต์ และเซลล์สร้างเนื้อฟัน (odontoblast) ด้วย (17, 21)

2. การตรวจหาโปรตีนที่สร้างจากเซลล์สร้างกระดูก เช่น osteonectin, osteocalcin, bone sialoprotein และโปรตีนคอลลาเจนชนิดที่ 1 เป็นต้น⁽²¹⁾

- 2.1 Osteonectin เป็นโปรตีนชนิดที่ไม่ใช่คอลลาเจน สามารถจับกับโปรตีนคอลลาเจนชนิดที่ 1 ช่วยให้เกิดการก่อตัวและคงตัวของผลึกในการสะสมแร่ธาตุที่เมทริกซ์นอกเซลล์ สามารถพบในเซลล์สร้างกระดูก เซลล์ไฟโบรบลาสต์ และเซลล์สร้างเนื้อฟันได้⁽²¹⁾

2.2 Osteocalcin หรือ bone gamma-carboxyglutamic acid (gla) protein (BGP) เป็นโปรตีนชนิดที่ไม่ใช่คอลลาเจนที่มีปริมาณมากที่สุดในแมทริกซ์ osteocalcin ถูกสังเคราะห์และหลังจากเซลล์สร้างกระดูก ควบคุมด้วยวิตามินดีโดยเฉพาะ 1,25-dihydroxyvitamin D ร่วมกับวิตามินเค ซึ่งจะมีการปรับเปลี่ยนสายโปรตีนโดยเกิดกระบวนการคาร์บอกซิเลชัน (carboxylation) ขึ้นที่กรดกลูตามิก (glutamic acid) ในสายโปรตีน ซึ่งมีความสำคัญต่อการจับตัวและการสะสมของไฮดรอกซีอะพาไทต์ (hydroxyapatite) ในแมทริกซ์นอกเซลล์ osteocalcin เป็นโปรตีนที่ได้รับการยอมรับว่าสามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ที่มีความไว (sensitive) และมีความจำเพาะ (specific) เพื่อบอกถึงการทำงานของเซลล์สร้างกระดูกได้สูง และจากการศึกษาในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ หรือเซลล์เนื้อเยื่อปริทันต์ไม่พบการสังเคราะห์โปรตีน osteocalcin และ bone sialoprotein ร่วมด้วย^(17, 21, 22)

2.3 โปรตีนคอลลาเจน เป็นโปรตีนชนิดที่พบได้มากที่สุดถึงร้อยละ 90 ของปริมาณสารอินทรีย์ในแมทริกซ์ ช่วยเป็นโครงร่างและเสริมความแข็งแรงให้แก่แมทริกซ์ของกระดูก สามารถพบปริมาณคอลลาเจนได้มากขึ้นสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของการสร้างกระดูก สามารถตรวจวัดได้จากการย้อมสี เช่น Sirius red dye และส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ หรือการตรวจด้วยวิธีอิมมูโนไซโตเคมี (Immunocytochemistry) โดยโปรตีนคอลลาเจนชนิดที่มักพบในเซลล์สร้างกระดูกมากกว่าร้อยละ 90 คือ โปรตีนคอลลาเจนชนิดที่ 1 กรณีเซลล์ชนิดอื่น เช่น เซลล์ไฟโบรบลาสต์ โปรตีนคอลลาเจนที่พบได้มากมักเป็นชนิดที่ 3 เป็นต้น^(17, 18, 21)

3. การทดสอบการสะสมแร่ธาตุในแมทริกซ์ระหว่างเซลล์ (matrix mineralization assay) ใช้เพื่อทดสอบความสามารถในการเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างเนื้อเยื่อกระดูก ซึ่งเป็นหนึ่งในคุณสมบัติและหน้าที่ของเซลล์สร้างกระดูก สามารถทำการทดสอบได้หลายวิธี เช่น การย้อมสี Alizarin red และ Von kossa stain เป็นต้น^(20, 21)

4. การแสดงออกของยีนโดยติดตามจากการแสดงออกของโมเลกุลที่เป็นตัวชี้วัด (molecule markers) เซลล์สร้างกระดูก เช่น

4.1 Runx2 (PEBP2aA, CBFA1) เป็นหนึ่งใน Runt-related factors (Runx) อยู่ในตระกูลของ transcription factors การแสดงออกของยีน Runx2 สามารถพบได้ที่ต่อมไทมัส อัณฑะ และพบมากในเนื้อเยื่อกระดูกและกระดูกอ่อนที่มีการสะสมแคลเซียม ไม่พบในสมอง หัวใจ ปอด ทางเดินอาหาร หรือตับ ยีน Runx2 ถือเป็นตัวบ่งชี้ที่มีความจำเพาะต่อเซลล์สร้างกระดูก โดยยีน Runx2 เป็นจุดเริ่มต้นในการกระตุ้นเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์ให้มีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สร้างกระดูก ควบคุมและกระตุ้นให้เซลล์สร้างกระดูกมีการเจริญเติบโตอย่าง

สมบูรณ์ ในขณะที่เป็นตัวอ่อน (fetus) จะพบการแสดงออกของยีน Runx2 ค่อนข้างมาก และจะลดน้อยลงเมื่อเป็นผู้ใหญ่ ในการสร้างกระดูกนั้นจะพบยีน Runx2 มีการแสดงออกมากใน 2 ช่วง ได้แก่ ขณะที่เซลล์ออกจากระยะ preosteoblasts เริ่มมีการสะสมแมทริกซ์นอกเซลล์ และขณะที่เซลล์อยู่ในระยะการเจริญสูงสุด (late maturation) นอกจากนี้พบว่ายีน Runx2 มียีนเป้าหมาย (target gene) ได้แก่ osteocalcin, osteopontin, bone sialoprotein, osteoprotegerin, RANKL, โปรตีนคอลลาเจนชนิดที่ 1 (Colla1) และยีนอื่น ๆ อีกมากมาย ทำให้เมื่อมีการทดลองนำยีน Runx2 ในหนูทดลองออกบางส่วน (heterozygous knockout) พบว่าหนูทดลองมีการสร้างกระดูกที่ผิดปกติไปหากนำยีนออกหมด (homozygous knockout) พบว่าไม่สามารถเกิดการสะสมแร่ธาตุที่กระดูกได้ ทำให้หนูทดลองตายตั้งแต่อายุเกิดเนื่องจากเกิดการยุบตัวของทรวงอกจากกระดูกที่โครงสร้างไม่ได้^(16, 19)

4.2 กลุ่มยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์โปรตีนที่จำเพาะต่อเซลล์สร้างกระดูก เช่น ยีนที่ควบคุม alkaline phosphatase (ALP), osteocalcin (OC), osteopontin (OP), osteonectin (ON), bone sialoprotein (BSP) และโปรตีนคอลลาเจนชนิดที่ 1 (Colla1) ซึ่งจะพบมีการแสดงออกในแต่ ละช่วงของการเจริญของเซลล์สร้างที่แตกต่างกันออกไป (ตาราง 1)^(18, 19, 23)

งานด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูก

การรักษาโดยการปลูกถ่ายกระดูก (bone graft) นั้นเป็นวิธีที่ใช้กันอย่างแพร่หลายเพื่อทดแทนหรือซ่อมสร้างกระดูกที่สูญเสียไป⁽⁶⁾ ซึ่งมีวัสดุต่าง ๆ มากมายให้เลือกใช้งาน เช่น การปลูกถ่ายกระดูกโดยใช้เนื้อเยื่อกระดูกในตนเอง (autogenous bone grafts) ซึ่งถือเป็นวิธีมาตรฐานที่มีอัตราความสำเร็จสูงถึงร้อยละ 80-90 มีการต่อต้านจากภูมิคุ้มกันในร่างกายต่ำ มีคุณสมบัติในการเหนี่ยวนำเซลล์สร้างกระดูก (osteinduction) เป็นโครงให้เกิดการยึดเกาะของเซลล์สร้างกระดูกและการสร้างเส้นเลือดใหม่ (osteoconduction) และสามารถสร้างเนื้อเยื่อกระดูกขึ้นได้เอง (osteogenesis) แต่มีข้อเสียคือมีปริมาณจำกัด มีบริเวณที่ทำการผ่าตัดอย่างน้อย 2 บริเวณ เกิดความเจ็บปวดของบริเวณที่นำกระดูกทดแทนมา อาจเกิดความเสียหายหรือภาวะแทรกซ้อนหลังการผ่าตัดได้มากและทำให้ใช้เวลาในการรักษาเพิ่มมากขึ้น⁽³⁻⁶⁾ จึงมีการใช้วัสดุอื่นทดแทน ได้แก่ เนื้อเยื่อปลูกถ่ายเอกพันธุ์ (allografts) ซึ่งเป็นเทคนิคที่ถูกนำมาใช้บ่อยเป็นอันดับที่ 2⁽⁶⁾ เนื้อเยื่อปลูกถ่ายวิวิธพันธุ์ (xenografts) และวัสดุปลูกถ่ายเฉื่อย (alloplastic materials) วัสดุเหล่านี้มีข้อดีในแง่ของปริมาณที่สามารถหาใช้ได้ไม่จำกัด ส่วนใหญ่แล้วมีคุณสมบัติในการเหนี่ยวนำเซลล์สร้างกระดูกและเป็นโครงให้เกิดการยึดเกาะของเซลล์สร้างกระดูกและการสร้างเส้นเลือดใหม่ ไม่

สามารถสร้างเนื้อเยื่อกระดูกขึ้นได้เองเนื่องจากไม่มีเซลล์สร้างกระดูกอยู่ภายใน ข้อเสียคือ มีโอกาสเกิดการแพร่ส่งผ่านเชื้อโรค เกิดการต่อต้านสิ่งปลูกถ่ายจากภูมิคุ้มกันของร่างกาย การติดเชื้อและวัสดุสังเคราะห์ที่ใช้บางชนิดมีการละลายตัวที่ช้าหรือมีการละลายตัวที่ไม่สมบูรณ์ ทำให้ขัดขวางต่อการเกิดกระดูกเชื่อมประสานได้⁽³⁻⁵⁾

งานด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อจึงถูกศึกษาและพัฒนาขึ้น โดยมีเป้าหมายเพื่อพัฒนาวิธีการรักษาที่สามารถกำจัดข้อจำกัดดังกล่าวได้^(4, 6) โดยงานด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อนั้นต้องอาศัยความร่วมมือทั้งจากนักวิทยาศาสตร์ วิศวกร และความรู้ทางด้านการแพทย์เพื่อที่จะสามารถประสบความสำเร็จในการสร้างชีววัสดุทดแทนกระดูกที่มีคุณสมบัติในการซ่อมแซมและสร้างเนื้อเยื่อกระดูกได้ ซึ่งงานด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อมีองค์ประกอบสำคัญหลายประการดังนี้^(4, 7, 8)

1. เซลล์ (cell) เนื่องจากการสร้างเนื้อเยื่อต่าง ๆ นั้นมีต้นกำเนิดมาจากเซลล์ ดังนั้นจึงคาดว่าเซลล์ต้นกำเนิด (stem cell) ซึ่งมีศักยภาพในการสร้างกระดูกได้สูงลงไปจะสามารถมีการซ่อมสร้างเนื้อเยื่อเกิดขึ้นในบริเวณรอยโรคได้ดี โดยเซลล์ต้นกำเนิดนั้นมีคุณสมบัติในการแบ่งตัวใหม่ (self-renew) และเปลี่ยนแปลง (differentiation) ไปเป็นเซลล์อื่นที่ทำงานอย่างเฉพาะเจาะจงได้หลายชนิด ซึ่งในการศึกษาเกี่ยวกับงานซ่อมสร้างเนื้อเยื่อกระดูกมักใช้เซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อที่โตเต็มวัย (adult stem cells) เช่น เซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์ เนื่องจากมีความสามารถในการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ที่สามารถสร้างเนื้อเยื่อกระดูก กระดูกอ่อน ไขมัน กล้ามเนื้อและเส้นประสาทได้ และสามารถเก็บได้จากหลายแหล่งในร่างกาย เช่น ไขสันหลัง เนื้อเยื่อไขมัน กล้ามเนื้อ น้ำคร่ำ รก เยื่อหุ้มกระดูก เป็นต้น⁽⁷⁾ แม้ว่าเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์จะมีศักยภาพสูงในงานวิจัยทางด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูก แต่ความต้องการใช้เซลล์ต้นกำเนิดจากตัวอ่อนมนุษย์ (embryonic stem cell) ยังมีอยู่มากเนื่องจากความสามารถในการพัฒนาไปเป็นเนื้อเยื่อคัพภะ (germ layer) ได้ทั้ง 3 ชั้น ซึ่งทำให้สามารถนำมาทดแทนเนื้อเยื่อชนิดต่าง ๆ ในร่างกายได้หลากหลายมากกว่า อย่างไรก็ตามพบว่ามีข้อจำกัดในแง่ของปริมาณ การคงอยู่ของเซลล์ การปฏิเสธจากระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย และยังต้องพิจารณาถึงแง่ของจริยธรรมในการนำมาศึกษาทดลอง^(7, 8)

2. โกรทแฟคเตอร์ (growth factor) โกรทแฟคเตอร์เป็นโมเลกุลที่มีหน้าที่ในการส่งสัญญาณเพื่อควบคุมการตอบสนองของเซลล์ผ่านหน่วยรับความรู้สึก (receptors) ที่อยู่บนผิวของเซลล์เป้าหมาย การตอบสนองทางชีวภาพที่เกิดขึ้นมากมายจากโกรทแฟคเตอร์นั้นขึ้นกับชนิดของโกรทแฟคเตอร์และเซลล์เป้าหมาย จำนวนเซลล์ ชนิดของหน่วยรับความรู้สึก และลักษณะของ

สัญญาณที่ส่งออกไป โกรทแฟคเตอร์ที่นำมาใช้ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูกนั้นมีหลายชนิด^(7, 24) ได้แก่

2.1 โกรทแฟคเตอร์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างกระดูก (osteogenic factors) ได้แก่ โกรทแฟคเตอร์ในตระกูล transforming growth factor beta (TGF- β) ตัวอย่างเช่น TGF- β s, activins, growth differentiation factors (GDF) และ bone morphogenetic proteins (BMPs) เป็นต้น มีลักษณะของสายโปรตีนที่คล้ายคลึงกันแตกต่างกันเฉพาะลำดับกรดอะมิโนที่อยู่ทาง C-terminal มีบทบาทในการกระตุ้นให้เกิดการสร้างกระดูก ช่วยในการระดมเซลล์มีเซนไคม์ กระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์และสร้างแมทริกซ์นอกเซลล์ โดยเฉพาะโกรทแฟคเตอร์ในกลุ่ม bone morphogenetic proteins (BMPs) ชนิด BMP-2, BMP-4 และ BMP-7⁽⁷⁾ ซึ่งมีผลิตภัณฑ์ที่ได้รับการยอมรับจากองค์การอาหารและยาแห่งสหรัฐอเมริกาในชื่อว่า INFUSE (Medtronic)⁽²⁴⁾

2.2 โกรทแฟคเตอร์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างหลอดเลือด (angiogenic factors) การมีหลอดเลือดเข้ามาเลี้ยงส่งผลให้มีการขนส่งออกซิเจน สารอาหาร โกรทแฟคเตอร์ชนิดต่าง ๆ ช่วยส่งเสริมการสร้างเนื้อเยื่อกระดูก กระดูกอ่อนและเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์ซึ่งเป็นสิ่งจำเป็นต่อสมดุลของการสร้างกระดูกช่วยให้เกิดการซ่อมแซมกระดูกที่เสียหายได้ดี โกรทแฟคเตอร์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างหลอดเลือด ได้แก่ vascular endothelial growth factor (VEGF), platelet-derived growth factor (PDGF), fibroblast growth factor (FGF) และ insulin like growth factor (IGF) เป็นต้น มีการศึกษาถึงการให้ VEGF ร่วมกับโกรทแฟคเตอร์ที่เหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างกระดูก พบว่าโกรทแฟคเตอร์ทั้ง 2 ชนิดทำงานในรูปแบบที่เสริมฤทธิ์กัน ทำให้ส่งเสริมการสร้างกระดูกได้ดียิ่งขึ้น⁽⁷⁾

2.3 โกรทแฟคเตอร์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ (inflammatory factors) กระบวนการหายของบาดแผลประกอบด้วย 3 กระบวนการหลัก ๆ คือ กระบวนการอักเสบ การสร้างเนื้อเยื่อใหม่ (renewal) และการปรับรูปร่างกระดูก (remodeling) การควบคุมกระบวนการอักเสบสามารถทำได้โดยการควบคุมสารก่อการอักเสบ (proinflammatory cytokines) โกรทแฟคเตอร์ที่หลั่งออกมาหลังจากเกิดการบาดเจ็บ หรือการใช้สารต้านการอักเสบ (anti-inflammatory agents) เช่น selective anticytokine therapies, คอร์ติโคสเตียรอยด์ (corticosteroids) และยาต้านการอักเสบชนิดที่ไม่ใช่สเตียรอยด์ (nonsteroidal anti-inflammatory drugs) เป็นต้น จากการศึกษาพบว่าสารก่อการอักเสบ เช่น tumor necrosis factor- α , interleukins, interferon- γ และ prostaglandins มีผลกระตุ้นการเคลื่อนที่และทำให้การเปลี่ยนแปลงไปของเซลล์สร้างกระดูกและ

เซลล์สลายกระดูกได้ นอกจากนี้ยังมีผลกระตุ้นการสร้างเส้นเลือดใหม่และทำให้เกิดการซ่อมแซมของกระดูกขึ้นได้⁽⁷⁾

2.4 โกรทแฟคเตอร์ที่มีผลทั่วร่างกาย (systemic factors) ได้แก่ ฮอร์โมนจากต่อมพาราไทรอยด์ (parathyroid hormone (PTH)), โกรทฮอร์โมน (growth hormone), สเตียรอยด์ (steroids), แคลซิโทนิน (calcitonin) และวิตามินดี ซึ่งมีผลต่อการควบคุมสมดุลของการสร้างและการสลายกระดูกในร่างกาย⁽⁷⁾

3. ระบบนำส่งสาร (vehicle, carrier) การออกแบบระบบนำส่งสารที่เหมาะสมเป็นสิ่งสำคัญต่อการคงสภาพและเชื้อต่อการทำงานของเซลล์ โกรทแฟคเตอร์และโปรตีนชนิดต่าง ๆ ให้มีประสิทธิภาพ โดยคุณลักษณะที่สำคัญของระบบนำส่งสารที่ดี^(4, 7) ได้แก่

1. สามารถรักษาคุณสมบัติทางชีวภาพ และป้องกันสารจากการถูกย่อยสลายได้
2. สามารถนำส่งสาร หรือเซลล์เหล่านั้นให้อยู่เฉพาะที่ได้
3. มีการคงอยู่และปลดปล่อยสารอย่างค่อยเป็นค่อยไปตามกระบวนการหายของบาดแผล
4. ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์เจริญเติบโตและยึดเกาะได้ในทุกทิศทาง
5. สามารถย่อยสลายได้หมดเพื่อเชื้อต่อการฟื้นฟูสภาพของเนื้อเยื่ออย่างเต็มที่
6. มีขนาดรูพรุนที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเซลล์และการสร้างเส้นเลือด
7. ใช้งานง่าย สามารถผ่านการทำให้ปลอดเชื้อได้ง่าย มีความเสถียรตลอดระยะเวลาการเก็บที่เหมาะสม
8. เหมาะสมต่อการผลิตเพื่อการค้า สามารถเพิ่มปริมาณการผลิตและผ่านการตรวจคุณภาพโดยสถาบันที่น่าเชื่อถือ

ระบบขนส่งสารที่ถูกพัฒนามาใช้ในการนำส่งโปรตีนและโกรทแฟคเตอร์มีหลายชนิด โดยแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่^(4, 7) ได้แก่

1. วัสดุที่ผลิตจากแหล่งกำเนิดธรรมชาติ เช่น คอลลาเจน กรดไฮยาลูโรนิก แบ็งไคโตซาน (chitosan) เป็นต้น สามารถสร้างได้จากหลากหลายวิธี เช่น การแช่แข็ง (freezing) หรือ การทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (lyophilization) วัสดุเหล่านี้มีโครงสร้างเหมาะสมสำหรับงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูกเนื่องจากมีความเข้ากันได้ทางชีวภาพสูง สามารถย่อยสลายได้ มีคุณสมบัติคล้ายเมทริกซ์นอกเซลล์ที่เชื้อต่อการเคลื่อนที่ (migration) เพิ่มจำนวน (proliferation) และเปลี่ยนแปลงไปของเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สร้างกระดูก ระบบนำส่งสารชนิดคอลลาเจนเป็น

รูปแบบที่ได้รับความนิยมอย่างมาก⁽⁷⁾ ถูกนำมาใช้เป็นผลิตภัณฑ์ในรูปแบบก้อนฟองน้ำและนำส่ง rhBMP-2 12 มิลลิกรัม ซึ่งเป็นปริมาณที่สูงกว่าปริมาณโปรตีนที่ผลิตในร่างกาย 10 ถึง 100 เท่า ที่เป็นเช่นนี้เนื่องจาก BMP-2 มีค่าครึ่งชีวิตที่สั้น การให้ BMP-2 เสริมจากภายนอกเพียงครั้งเดียว ไม่เพียงพอที่จะสามารถกระตุ้นให้เกิดการเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างกระดูกในมนุษย์ได้^(4, 24) ซึ่งพบว่าคอลลาเจนในรูปแบบก้อนฟองน้ำที่ทำจากเอ็นข้อเท้าของวัว (bovine achilles tendon) ไม่สามารถควบคุมการปลดปล่อยโปรตีนได้ สามารถนำส่งโปรตีน BMP-2 ได้นานประมาณ 2 สัปดาห์ และในช่วง 1 สัปดาห์แรกนั้น มีการปลดปล่อยโปรตีนออกมาในปริมาณมากถึงร้อยละ 60-75 เรียกปรากฏการณ์นี้ว่า initial burst นอกจากนี้พบว่าเซลล์เป้าหมาย เช่น เซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์ ใช้ประโยชน์จากการปลดปล่อยโปรตีนที่เติมเข้าไปเพียงเล็กน้อยเท่านั้น โปรตีน BMP-2 ส่วนที่เหลือเป็นส่วนที่ไม่สามารถควบคุมได้และก่อให้เกิดผลข้างเคียงขึ้น ดังนั้นเพื่อป้องกันการผลข้างเคียงข้างต้น ระบบนำส่งโปรตีน BMP-2 ควรจะสามารถควบคุมการปลดปล่อยสารได้ ทำให้เกิดประสิทธิภาพสูงสุดในการเหนี่ยวนำการสร้างกระดูก ลดปริมาณการใช้โปรตีน BMP-2 ลง ลดผลข้างเคียงและมีราคาเหมาะสมต่อการนำมาใช้ในการรักษาโรค^(7, 24) นอกจากนี้วัสดุที่ผลิตจากธรรมชาติยังมีข้อจำกัดอื่น ๆ เช่น การควบคุมคุณภาพของการผลิต วิธีการทำให้ปราศจากเชื้อ และโอกาสที่จะเกิดปฏิกิริยาต่อระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ซึ่งต้องมีการพัฒนาต่อไป ปัจจุบันมีการนำมาปรับปรุงคุณสมบัติทางกายภาพ โดยปรับปรุงวิธีการเชื่อมโยง (crosslink) หรือการผสมวัสดุอินทรีย์ วัสดุสังเคราะห์เพื่อให้สามารถควบคุมการปลดปล่อยสารได้ดีขึ้น⁽⁷⁾

2. วัสดุอนินทรีย์ (inorganic materials) เช่น เซรามิก (ceramics) เป็นวัสดุที่ถูกนำมาใช้อย่างยาวนานในการทดแทนกระดูก เนื่องจากทนต่อแรงกดได้สูง สามารถย่อยสลายได้ และสามารถเหนี่ยวนำเซลล์สร้างกระดูกได้ แต่ไม่สามารถควบคุมการปลดปล่อยสารได้ ถึงแม้วิธีการเติมโปรตีนลงไปบนผิววัสดุอนินทรีย์นั้นสามารถทำได้โดยง่าย แต่การใช้งานและการปลดปล่อยสารกลับไม่ได้ประสิทธิภาพเท่าที่ควร มีการทดสอบโดยติดตามการปลดปล่อยสาร rhBMP-2 และ recombinant basic FGF พบว่าภายใน 24 ชั่วโมงสารถูกปลดปล่อยออกมาหมด และเซลล์มะเร็งกระดูก (osteogenic sarcoma cells) ไม่สามารถสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสได้ ซึ่งอาจต้องมีการปรับปรุงพื้นผิวเพื่อให้เอื้อต่อการนำส่งโปรตีนมากขึ้นต่อไป⁽⁷⁾

3. วัสดุสังเคราะห์ (synthetic polymers) เช่น Poly α -hydroxy acids, polyanhydrides, polyphosphazenes, polyethylene glycol (PEG), poly ϵ -caprolactone (PCL), polypropylene fumarate (PPF), polyurethanes และ polyphosphate polymers ซึ่งมีข้อดีเหนือวัสดุอื่นคือถูกพัฒนาให้สามารถนำส่งและควบคุมการปลดปล่อยโกรทแฟกเตอร์ได้

ค่อนข้างดี สามารถสังเคราะห์ปรับปรุงสูตรให้มีรูปร่าง และคุณสมบัติทางกายภาพที่เหมาะสมต่อการใช้งานแต่ละชนิดได้ง่าย แต่มีข้อเสียเล็กน้อยในแง่ของตอบสนองต่อกระบวนการอัดเสกของร่างกาย การสลายตัว และการกำจัดออกเนื่องจากเป็นพอลิเมอร์ที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่⁽⁷⁾ ในหลายการศึกษามีการนำระบบขนส่งสารที่ผลิตจากวัสดุสังเคราะห์มาปรับปรุงสูตรโดยเติมวัสดุธรรมชาติหรือวัสดุอนินทรีย์เพื่อให้มีคุณสมบัติในการควบคุมการปลดปล่อยสารจำพวกโกรทแฟกเตอร์ได้ดียิ่งขึ้น^(4, 7)

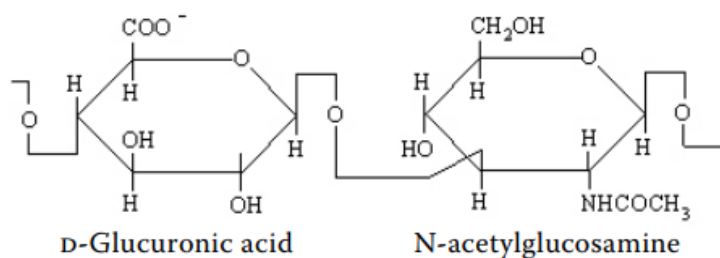
จะเห็นได้ว่ายังไม่มีวัสดุใดที่มีความเหมาะสมและดีที่สุดในการนำมาใช้เป็นระบบนำส่งสารจำพวกโกรทแฟกเตอร์⁽⁷⁾ แต่จากการศึกษาพบว่าวัสดุแต่ละชนิดสามารถนำมาปรับเพื่อให้มีคุณสมบัติที่ดีขึ้นได้ โดยวัสดุธรรมชาติ วัสดุอนินทรีย์และวัสดุสังเคราะห์สามารถนำมาปรับปรุงร่วมกันและทำให้มีคุณสมบัติที่เหมาะสมต่อการใช้งานซ่อมสร้างเนื้อเยื่อกระดูกได้^(4, 7)

ระบบนำส่งสารชนิดไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกในรูปแบบฉีด

ในกลุ่มของชีววัสดุทั้งหมดนี้ ระบบนำส่งสารชนิดไฮโดรเจล ถือเป็นวัสดุที่มีแนวโน้มว่ามีประสิทธิภาพที่ดีในการใช้นำส่งยาและโกรทแฟกเตอร์ชนิดต่าง ๆ ได้⁽¹¹⁾ เนื่องจากไฮโดรเจลเป็นพอลิเมอร์ร่างแห (hydrated polymeric networks) จากโมเลกุลของน้ำที่มีความสามารถในการพองตัวและสามารถกักเก็บน้ำไว้ในตัวเองทำให้เกิดโครงสร้าง 3 มิติที่ได้จากการก่อตัวเป็นเจล มีความนิ่ม ยืดหยุ่นสูง และเข้ากันได้ดีกับเนื้อเยื่อ มีการพัฒนาให้ใช้งานในด้านต่าง ๆ มากมาย เช่น การผลิตคอนแทคเลนส์ การรักษาบาดแผล เป็นระบบนำส่งยา เซลล์ และโปรตีนต่าง ๆ ใช้งานวิศวกรรมเนื้อเยื่อ สามารถนำมาปรับปรุงสูตรโดยเกิดการเชื่อมโยง (cross-linked) ทางเคมีและกายภาพเพื่อพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ไฮโดรเจลชนิดต่าง ๆ ได้อย่างหลากหลาย^(7, 11, 25)

ไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิก (hyaluronic acid hydrogel) เป็นชีววัสดุในกลุ่มที่ผลิตจากแหล่งกำเนิดธรรมชาติ มีกรดไฮยาลูโรนิกเป็นองค์ประกอบหลัก ซึ่งเป็นกลัยโคซอมิโนกลัยแคนมีบทบาทหน้าที่ในการควบคุมพฤติกรรมของเซลล์ ควบคุมการสร้างเนื้อเยื่อ และโครงสร้างของอวัยวะในร่างกาย⁽²⁴⁾

กรดไฮยาลูโรนิกเป็นสารประกอบประเภทพอลิเมอร์ที่ประกอบด้วยหน่วยของ ไดแซ็กคาไรด์ (D-glucuronic และ N-acetylglucosamine) เชื่อมด้วยพันธะ glucuronidic β (1 $\rightarrow$ 3) และ β (1 $\rightarrow$ 4) (ภาพประกอบ 4) เป็นโมเลกุลประจุลบที่มีมวลโมเลกุลตั้งแต่ 5 ถึง 20,000 กิโลดาลตัน มีลักษณะใส มีความสามารถในการอุ้มน้ำสูง และคงความชื้นเหนียวได้⁽²⁴⁾



ภาพประกอบ 4 แสดงโครงสร้างของกรดไฮยาลูโรนิก

ที่มา: J. Necas LB, P. Brauner, J. Kolar. Hyaluronic acid (hyaluronan): a review.

Veterinari Medicina. 53, 2008 (8): 397–411

ไฮโดรเจลที่ผลิตจากกรดไฮยาลูโรนิกมีความเข้ากันได้ดีกับเนื้อเยื่อ สามารถปรับแต่งคุณสมบัติได้ เป็นการเพิ่มประสิทธิภาพและประโยชน์ในการใช้งานได้หลากหลายมากขึ้น

ในปี 2011 Elena และคณะ⁽¹⁰⁾ ได้พัฒนาระบบนำส่งสารไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกเพื่อให้มีรูปแบบการใช้งานที่ง่าย มีความรุนแรงน้อย โดยเลือกใช้รูปแบบฉีดเพื่อนำส่งโปรตีน BMP-2 ปรับปรุงโครงสร้างโดยใช้สารอัลดีไฮด์ (aldehyde modified HA) แล้วใช้ไฮดราไซด์ (hydrazide) เป็นสารเชื่อมโยงเกิดเป็น hydrazone-crosslinked hydrogel ทำการศึกษาถึงคุณสมบัติการปลดปล่อยโปรตีน ความเป็นพิษต่อเซลล์ไฟโบรบลาจากผิวหนังมนุษย์ (human dermal fibroblast) และการเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างเนื้อเยื่อกระดูกในหนูทดลอง ผลการศึกษาพบว่าไฮโดรเจลที่ดัดแปลงแล้วนี้ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ไฟโบรบลาจากผิวหนังมนุษย์ สามารถควบคุมการปลดปล่อยโปรตีน BMP-2 ออกมาได้อย่างต่อเนื่อง โดยยังพบ active BMP-2 ถึงร้อยละ 86 ในวันที่ 28 ของการทดลอง ในการศึกษาโดยการฉีดไฮโดรเจลที่นำส่ง BMP-2 เข้าในชั้นใต้ผิวหนัง (subcutaneous) และชั้นใต้เยื่อหุ้มกระดูก (subperiosteal) บริเวณกะโหลกศีรษะของหนูทดลองพบว่า มีการสร้างเนื้อเยื่อกระดูกเกิดขึ้นได้ภายใน 8 สัปดาห์ หนูทดลองในกลุ่มที่ได้รับการฉีดเข้าชั้นใต้เยื่อหุ้มกระดูกมีการสร้างกระดูกที่ดี โดยปริมาณของกระดูกที่สร้างขึ้นกับระดับความเข้มข้นของโปรตีน BMP-2 นอกจากนี้ยังพบการผสมผสานของเนื้อกระดูกเข้ากับผิวกระดูกเก่าเกิดขึ้นได้ดี ส่วนกลุ่มที่ฉีดเข้าชั้นใต้ผิวหนังนั้น พบว่ามีการสร้างกระดูกน้อยกว่าซึ่งอาจเกิดจากการมีเอนไซม์ย่อยสลายกรดไฮยาลูโรนิก (Hyaluronidase) มากกว่าในชั้นใต้เยื่อหุ้มกระดูก

ในปี 2014 Keegan Bradley Compton และคณะ⁽²⁶⁾ ศึกษาพัฒนาระบบนำส่งสารจากกรดไฮยาลูโรนิกที่ถูกดัดแปลงด้วย 2-aminoethyl methacrylate (AEMA) ที่ขนาดโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิก 18 กิโลดาลตันและ 270 กิโลดาลตัน เชื่อมโยงด้วยระบบแสงยูวี (UV polymerization) เพื่อใช้ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อในด้านการหายของบาดแผล โดยทดสอบ

คุณสมบัติทางกายภาพของสารและความเข้ากันได้ทางชีวภาพต่อเซลล์ต้นกำเนิดเนื้อเยื่อในโพรงฟัน (dental pulp stem cells) แบ่งเป็น 2 ช่วง ได้แก่ การทดสอบความเป็นพิษของ HA-AEMA ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กันต่อเซลล์ด้วยวิธี MTT และทดสอบความมีชีวิตของเซลล์โดยการห่อหุ้มเซลล์เข้าไปภายในไฮโดรเจล (encapsulate) แล้วทดสอบด้วย live/dead cell staining พบว่าคุณสมบัติทางกายภาพของไฮโดรเจลชนิด HA-AEMA นั้นมีความหลากหลายเมื่อทำการศึกษาโดยใช้กรดไฮยาลูโรนิกที่น้ำหนักต่างกัน แสดงให้เห็นถึงความสามารถในการถูกดัดแปลง (tunable) เพื่อให้เหมาะสมต่อการใช้งานในสิ่งแวดล้อมต่าง ๆ ได้ ในด้านความเข้ากันได้ทางชีวภาพของเซลล์ต้นกำเนิดเนื้อเยื่อในโพรงฟัน พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 30 นาที ที่ความเข้มข้นของพอลิเมอร์ HA-AEMA ร้อยละ 3 เซลล์ยังสามารถอยู่รอดได้ แต่หากปล่อยไว้นานถึง 24 ชั่วโมง พบว่าเริ่มมีผลต่อความมีชีวิตของเซลล์อย่างมีนัยสำคัญ แม้ในระดับความเข้มข้นที่น้อยลง (ร้อยละ 0.5) โดยเชื่อว่าพันธะคู่ (double bond) ใน AEMA เป็นส่วนที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ ซึ่งสามารถป้องกันได้จากการเชื่อมโยงสารให้เกิดเป็นไฮโดรเจลทันทีเพื่อลดเวลาที่พอลิเมอร์ HA-AEMA สัมผัสกับเซลล์ นอกจากนี้ยังพบว่าเซลล์ที่ถูกห่อหุ้มอยู่ในนั้นสามารถมีชีวิตอยู่ได้หลังผ่านการเชื่อมโยงด้วยแสงยูวี สาร calcein AM ที่ใช้ในการทำ live/dead cell staining สามารถซึมผ่านเข้าไปได้แต่ไม่พบการเคลื่อนของเซลล์ออกมาภายนอก ไฮโดรเจลจึงเป็นระบบนำส่งสารที่เป็นระบบเปิด (open system) ต่อสิ่งแวดล้อมภายนอกที่สามารถให้สารซึมผ่านเข้ามาได้

ในปี 2015 Ning Cui และคณะ⁽²⁷⁾ ได้ทำการศึกษากการสังเคราะห์ไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกให้มีความใกล้เคียงกับแมทริกซ์นอกเซลล์ โดยใช้ 3,3-dithiodipropionatehydrazide-modified HA (DTPH-HA) ที่เชื่อมโยงด้วย LEV-PEG-LEV ซึ่งจะได้อไฮโดรเจลที่มีการยึดเกาะกันด้วยพันธะของ hydrazone และ disulfide จากนั้นทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพและความเข้ากันได้ทางชีวภาพกับเซลล์คล้ายเซลล์สร้างกระดูกจากสัตว์ทดลอง (osteoblast-like MC3T3-E1 cells) โดยการหดยเซลล์ลงบนผิวไฮโดรเจลที่สังเคราะห์ขึ้น ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ ทดสอบความมีชีวิตและการเพิ่มปริมาณของเซลล์ด้วย live/dead cell staining และวิธี MTT พบว่าไฮโดรเจลที่สังเคราะห์ได้นั้นมีความเป็นรูพรุนสูง ขนาดของรูพรุนเท่ากับ 20–200 ไมครอน อัตราการบวมน้ำไม่น้อยกว่า 37.5 และสามารถสลายได้ด้วย 3 กระบวนการ ได้แก่ การย่อยด้วยเอนไซม์สลายกรดไฮยาลูโรนิก (hyaluronidase) สารที่เป็นตัวรีดิวซ์ (reducing substances) และสลายในภาวะที่เป็นกรด ในด้านของความเข้ากันได้ทางชีวภาพนั้นพบว่าไฮโดรเจลชนิดนี้มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพที่ดี สามารถรองรับและพบการเพิ่มจำนวนของเซลล์ MC3T3-E1 บนพื้นผิวของไฮโดรเจลได้

ในปี 2016 Maturavongsadit และคณะ⁽¹²⁾ ได้พัฒนาระบบนำส่งสารชนิดไฮโดรเจล รูปแบบฉีดให้มีโครงสร้างที่คล้ายคลึงกับสภาพแวดล้อมของกระดูกอ่อน โดยใช้กรดไฮยาลูโรนิก เป็นพื้นฐานในการสังเคราะห์ไฮโดรเจล ดัดแปลงโดยใช้เมทาไครเลตแอนไฮไดรด์ (methacrylic anhydride) ทำให้ได้พอลิเมอร์ของเมทาไครเลตจากกรดไฮยาลูโรนิก (methacrylated hyaluronic acid (MeHA)) แล้วใช้สารเชื่อมโยง (crosslinker) เป็น Cysteine-inserted Tobacco mosaic virus (TMV) mutants (TMV1cys) ร่วมกับไดไธโอเทรียล (dithiotreitol (DTT)) เพื่อใช้ในการ นำส่งเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์ และศึกษาถึงความสามารถในการเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้าง กระดูกอ่อน โดยทำการเปรียบเทียบกับ MeHA ที่เชื่อมโยงด้วย DTT เพียงอย่างเดียว การเชื่อมโยง ไฮโดรเจลเกิดขึ้นโดยปฏิกิริยา thiol-ene click reaction ซึ่งเป็นรูปแบบหนึ่งของปฏิกิริยาการเพิ่ม แบบไมเคิล (michael addition) จากการศึกษาพบว่ากรดไฮยาลูโรนิกขนาดโมเลกุล 47 กิโลดาลตัน เป็นขนาดที่ทำให้เกิดความหนืด และความถ่วงจำเพาะที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยา methacrylation เพื่อใช้ในการปรับปรุงโครงสร้างของกรดไฮยาลูโรนิก โดยไฮโดรเจลที่ได้มีขนาด ของรูพรุนที่เกิดขึ้นภายในเจลที่ 20-100 ไมครอน ซึ่งเป็นขนาดที่เหมาะสมและมีบทบาทสำคัญต่อ การเป็นที่อยู่ของเซลล์ในการทำเป็นโครงร่างชีวภาพและเหมาะสมต่อการซึมผ่านของยาเพื่อ นำไปใช้ในระบบนำส่งยา MeHA ทั้ง 2 กลุ่ม สามารถกักเก็บน้ำไว้ในตัวได้โดยไม่เกิดการสูญเสีย ออกไปเป็นเวลา 21 วัน และสามารถดูดซึมน้ำจมน้ำหนักเพิ่มขึ้น 3.5 เท่าจากน้ำหนักแรกเริ่ม แต่ระยะเวลาการกักตัวเป็นเจลของไฮโดรเจลที่กักตัวจาก MeHA-TMV1cyst ใช้เวลาน้อยกว่า MeHA-DTT ในการทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพของเซลล์ พบว่าในการทดสอบความอยู่รอด ของเซลล์โดยวิธี CellTiter-Blue (CTB) นั้น เซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์ที่ถูกหุ้มอยู่ภายใน ไฮโดรเจลทั้ง 2 กลุ่ม สามารถมีชีวิตอยู่ได้ตามปกติมากกว่า 21 วันของการเพาะเลี้ยง พบการ แสดงออกของยีน BMP-2 และการสังเคราะห์โปรตีนคอลลาเจนชนิดที่ 2 ในกลุ่มที่กักตัวด้วย MeHA-TMV1cyst มากกว่า MeHA-DTT แต่กระบวนการทำงานของเซลล์ (metabolic activity) ลดลงเล็กน้อย อย่างไรก็ตามไฮโดรเจลที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถใช้เป็นระบบนำส่งเซลล์ต้นกำเนิดชนิด มีเซนไคม์ที่มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพ และสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างกระดูกอ่อนจาก เซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์ได้

ต่อมาในปี 2017 Maturavongsadit และคณะ⁽¹³⁾ ได้นำ MeHA มาพัฒนาต่อ โดยศึกษา ถึงสารเชื่อมโยงชนิดต่าง ๆ ที่ใช้ในการเชื่อมต่อพอลิเมอร์ของ MeHA ให้เกิดโครงสร้างแบบร่างแห โดยเปรียบเทียบกับสารเชื่อมโยงไดไธโอเทรียล (dithiotreitol crosslinked (DTT)) เนื่องจากสาร เชื่อมโยงชนิดนี้สามารถก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ได้เมื่อใช้ในปริมาณมาก ส่งผลให้การ

ปรับปรุงสูตรของระบบนำส่งสารทำได้ค่อนข้างยาก โดยใช้การผสมสารที่เป็นตัวเชื่อมโยงพอลิเมอร์ นั่นคือ DTT กับสารเชื่อมโยงชนิดอื่น ๆ เช่น 4-arm polyethylene glycol (PEG), multi-arm polyamidoamine (PAMAM) dendrimer รุ่นที่ 2 และ 3 เป็นต้น เกิดเป็นไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิก-พอลิเมอร์ผสม (hybrid HA hydrogel) นำมาทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพ ความเข้ากันได้ทางชีวภาพ และความสามารถในการเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างกระดูกอ่อนของเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์โดยห่อหุ้มเซลล์ (encapsulate) เข้าไปในไฮโดรเจล ผลการศึกษาพบว่าสารเชื่อมโยงที่มีโครงสร้างและความเข้มข้นต่างกัน ส่งผลต่อคุณสมบัติทางกายภาพของไฮโดรเจลทั้งในด้านความแข็ง (mechanical stiffness) ขนาดของรูพรุน การสลายตัว ระยะเวลาการก่อตัว รูปร่างลักษณะของไฮโดรเจล เป็นต้น ยกตัวอย่างเช่น ไฮโดรเจลที่ใช้สารเชื่อมโยงชนิด 4-arm polyethylene glycol (PEG) มีระยะเวลาการก่อตัวที่เร็ว ไรต่อการสลายตัว และมีความแข็งมากกว่าเมื่อเทียบกับ linear PEG และสามารถรองรับเซลล์สร้างกระดูกอ่อนได้ดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ 8-arm PEG, ระยะเวลาการก่อตัวของไฮโดรเจลที่มีสารเชื่อมโยงเป็น DTT, PEG และ PEGDTT ใช้เวลาเท่ากันคือประมาณ 1 ชั่วโมง และเร็วที่สุดเมื่อเทียบกับกลุ่มอื่น ๆ ซึ่งพบว่าสัมพันธ์กับค่าความแข็งของไฮโดรเจลด้วย, การสลายตัวของไฮโดรเจลที่มีสารเชื่อมโยงเป็น DTT, PAMAM dendrimer รุ่นที่ 2 (G2) และ PAMAM dendrimer รุ่นที่ 3 (G3) มีการสลายตัวมากกว่าร้อยละ 65 ในช่วง 24 ชั่วโมงแรก และสลายตัวได้หมดภายใน 2-3 วัน ส่วนสารที่เชื่อมโยงด้วย DTTG3 ในช่วง 3 วันแรกสามารถตรวจพบกรดไฮยาลูโรนิกได้ร้อยละ 90 และการสลายตัวยังคงมีระยะเวลาต่อเนื่องนานถึง 6 วัน เป็นต้น ในด้านความเข้ากันได้ทางชีวภาพนั้น พบว่าอัตราส่วน thiol ต่อ ene เท่ากับ 2 ต่อ 1 ของสารเชื่อมโยงชนิด DTT เป็นอัตราส่วนสูงสุดที่ยังทำให้เซลล์สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ในการศึกษานี้จึงใช้อัตราส่วนของกรดไฮยาลูโรนิกที่ร้อยละ 3 และใช้ปริมาณสารเชื่อมโยงร้อยละ 2 โดยปริมาตร ในการทดสอบความอยู่รอดของเซลล์ด้วยวิธี CellTiter-Blue (CTB) พบว่าหลังจากวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยงเซลล์ในไฮโดรเจลที่เชื่อมโยงโดยใช้สาร DTT, G2DTT, G3DTT, PEG และ PEGDTT มีระดับการมีชีวิตอยู่ของเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์มากกว่าร้อยละ 70 จากนั้นระดับความมีชีวิตจะค่อยๆ ลดลง โดยเฉพาะในกลุ่มที่ใช้ G3DTT และพบการมีระดับการมีชีวิตอยู่ของเซลล์นานที่สุดในกลุ่มที่ใช้สารเชื่อมโยงชนิด DTT เมื่อเทียบกับสารเชื่อมโยงกลุ่มอื่น สำหรับการทดสอบความสามารถในการเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างกระดูกอ่อนนั้นประเมินจากการสร้าง Glycosaminoglycans (GAGs) โปรตีนคอลลาเจนชนิดที่ 1 และ 2 พบว่ากลุ่มที่ใช้ PEG เป็นสารเชื่อมโยงมีการสะสมของ GAGs และโปรตีนคอลลาเจนชนิดที่ 2 มากที่สุด แต่การสะสมของโปรตีนคอลลาเจนชนิดที่ 1 เกิดขึ้นน้อยที่สุดเมื่อเทียบกับกลุ่มอื่น จะเห็นได้ว่าไฮโดรเจลจากกรดไฮ

ยาสูตรในทุกลูมนั้นมีความเข้ากันได้ทางชีวภาพ และมีความสามารถที่จะให้เซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์คงอยู่และเกิดการเหนี่ยวนำการสร้างเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนได้ ซึ่งการจะได้คุณสมบัติที่เหมาะสมที่สุดนั้นขึ้นกับการปรับเปลี่ยนคุณสมบัติทางกายภาพให้เหมาะสมต่อจุดประสงค์ในการนำระบบนำส่งสารนั้นไปใช้ด้วย

การศึกษาของพนันท์และคณะในปี 2018⁽¹⁴⁾ ได้พัฒนาระบบนำส่งสารจากเมทาโครเลตไฮยาโลโรนิกไฮโดรเจล^(12, 13) โดยเติมน้ำตาลแมนนิทอล (mannitol) ซึ่งเข้ามามีบทบาทในการเป็นสารปรุงยา (excipient) ที่มีความปลอดภัยต่อมนุษย์ มีความเฉื่อยต่อการเกิดปฏิกิริยาต่อสารออกฤทธิ์ ใช้เป็นสารเติมยา (diluent) ช่วยในการปรับความเข้มข้น และช่วยในการยึดเกาะของสารได้ดียิ่งขึ้น⁽¹⁵⁾ ทำการศึกษาถึงอัตราส่วนของน้ำตาลแมนนิทอลต่อปีเอสเอซึ่งใช้เป็นตัวแทนของยาที่เป็นสารโปรตีนหรือเปปไทด์ในสัดส่วนเชิงมวล 1:1, 2:1, 4:1 และ 100:1 ที่มีผลต่อคุณสมบัติทางกายภาพของเมทาโครเลตไฮยาโลโรนิกไฮโดรเจลดัดแปลงในรูปแบบฉีด พบว่าพอลิเมอร์ของเมทาโครเลตจากกรดไฮยาโลโรนิกในการศึกษานี้มีระดับการเกิดปฏิกิริยาของการสังเคราะห์สาร (Degree of modification) ประมาณร้อยละ 20-40 เมื่อผสมน้ำตาลแมนนิทอลและโปรตีนปีเอสเอแล้ว มีความสามารถในการดูดเก็บน้ำได้ถึงร้อยละ 90 และก่อตัวเป็นเจลได้ภายในระยะเวลาประมาณ 30 นาที ในทุกสูตรและไม่แตกต่างจากไฮโดรเจลในกลุ่มควบคุมซึ่งไม่เติมน้ำตาลแมนนิทอล เมื่อตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) พบว่าไฮโดรเจลที่มีส่วนผสมของน้ำตาลแมนนิทอลนั้นจะมีลักษณะของพื้นผิวที่ขรุขระกว่า มีความแตกต่างของลักษณะพื้นผิวมากกว่า และสามารถพบเห็นการเกิดผลึกคริสตัลของน้ำตาลแมนนิทอลได้อย่างชัดเจน โดยที่ขนาดของผลึกนั้นสัมพันธ์กับปริมาณและความเข้มข้นของน้ำตาลแมนนิทอลด้วย การศึกษาถึงการควบคุมการปลดปล่อยโปรตีนปีเอสเอ พบว่าไฮโดรเจลที่มีส่วนผสมของน้ำตาลแมนนิทอลในทุกอัตราส่วน มีการปลดปล่อยโปรตีนปีเอสเอออกมาอย่างช้า ๆ และต่อเนื่อง โดยไฮโดรเจลที่มีน้ำตาลแมนนิทอลและโปรตีนปีเอสเอในอัตราส่วน 100:1 เป็นอัตราส่วนที่สามารถปลดปล่อยโปรตีนปีเอสเอออกมาได้มากที่สุดในช่วงเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อเทียบกับปริมาณโปรตีนปีเอสเอที่มีอยู่ภายในเจล จะเห็นได้ว่าน้ำตาลแมนนิทอลสามารถใช้เป็นสารเพิ่มปริมาณยา โดยอัตราส่วนของน้ำตาลแมนนิทอลที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้มีการปลดปล่อยโปรตีนปีเอสเอออกมาได้เร็วขึ้นด้วย นอกจากนี้ยังสามารถปรับเพิ่มลดอัตราส่วนของน้ำตาลแมนนิทอลต่อโปรตีนปีเอสเอได้ โดยไม่รบกวนต่อคุณสมบัติทางกายภาพของเมทาโครเลตไฮยาโลโรนิกไฮโดรเจลดัดแปลงในรูปแบบฉีด

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

ในการวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยได้ดำเนินการตามขั้นตอนดังนี้

1. การกำหนดประชากรและการสุ่มกลุ่มตัวอย่าง
2. ขั้นตอนการทดลอง
3. การเก็บรวบรวมข้อมูล
4. การจัดกระทำและการวิเคราะห์ข้อมูล

การกำหนดประชากรและการสุ่มกลุ่มตัวอย่าง

ประชากร

เซลล์กระดูกเบ้าฟันที่คัดแยกมาจากกระดูกขณะกรอกระดูกเพื่อผ่าตัดฟันกรามซี่ที่สามที่ฝังคุดของผู้ยินยอมตน ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์และเก็บไว้ในคลังเซลล์ ภายใต้การขออนุญาตจากคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมในการทำวิจัย คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เลขที่ DENTSWU-EC02/2561

การเลือกกลุ่มตัวอย่าง

เลือกเซลล์กระดูกเบ้าฟันจากการเก็บเกี่ยวเซลล์ในผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาโดยการผ่าตัดฟันกรามซี่ที่สามที่ฝังคุดโดยการสุ่มจำนวน 3 คน เพื่อให้ได้เซลล์ปฐมภูมิ (primary cell) จำนวน 3 เซลล์ไลน์ และเลือกเซลล์ที่เพาะเลี้ยงได้ในรุ่นที่ 3-8 มาใช้ในการทดลอง

ขั้นตอนการทดลอง

การเก็บเกี่ยวและเพาะเลี้ยงเซลล์

เก็บเนื้อเยื่อกระดูกจากกระดูกขากรรไกรของผู้ป่วยที่มารับการรักษาที่คลินิกการเรียนการสอน ภาควิชาศัลยศาสตร์และเวชศาสตร์ช่องปากจำนวน 3 ราย และระบุชื่อเซลล์แต่ละไลน์ในการทดลองเป็นเซลล์กระดูกเบ้าฟัน (alveolar bone cell; AB) 1, 2 และ 3 ตามลำดับ โดยมีเกณฑ์การรับเข้าและคัดออกดังนี้

เกณฑ์การรับเข้า

1. ผู้ป่วยเพศชายหรือหญิง
2. มีช่วงอายุระหว่าง 20-50 ปี
3. สุขภาพแข็งแรง

4. ไม่มีโรคประจำตัว ไม่สูบบุหรี่และดื่มแอลกอฮอล์
5. มาเพื่อรับการรักษาโดยการผ่าตัดฟันกรามซี่ที่สามที่ฝังคุด หรือรับการ
ทำศัลยกรรมช่องปากอื่น ๆ

เกณฑ์การคัดออก

1. บริเวณกระดูกที่เก็บเกี่ยวมีการอักเสบหรือติดเชื้อ

วิธีการเก็บเกี่ยวและเพาะเลี้ยงเซลล์

1. ผู้ป่วยบ้วนปากด้วยน้ำเปล่า 1 ครั้ง เพื่อกำจัดคราบและเศษอาหารที่ตกค้าง
2. บ้วนปากด้วยน้ำยาบ้วนปากที่ผสมด้วยคลอร์เฮกซิดีนนาน 1 นาที
3. เก็บชิ้นกระดูกที่ได้ในขวดที่ผ่านการฆ่าเชื้อและบรรจุด้วยอาหารเพาะเลี้ยง

ชนิด Dulbecco's Modified Eagle's Medium : Nutrient Mixture F-12 Advance (DMEM/F-12 Advance) (Gibco™, UK) ที่ประกอบด้วย fetal bovine serum (FBS) ร้อยละ 10, 200 มิลลิโมลาร์ L-glutamine ร้อยละ 1 และ Penicillin 10,000 ยูนิตต่อมิลลิลิตร/ Streptomycin 10,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร/ Amphotericin B 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ร้อยละ 1

4. นำชิ้นกระดูกที่เก็บมาล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ชาโลน (phosphate buffered saline; PBS) แล้วตัดให้มีขนาดเล็ก (เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.5-1 มิลลิเมตร)

5. บรรจุลงจานเพาะเลี้ยงขนาด 35 มิลลิเมตร เติมน้ำอาหารเลี้ยงเซลล์แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้บ่มที่คาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 ทิ้งไว้เป็นเวลา 3 วัน ก่อนทำการเปลี่ยนอาหารเพาะเลี้ยงสัปดาห์ละ 2 ครั้ง

6. เมื่อการรวมกลุ่มของเซลล์ถึงร้อยละ 80 ทำการเปลี่ยนถ่ายเซลล์ (subculture) ลงสู่จานเพาะเลี้ยงใหม่⁽²⁰⁾ นำเซลล์ที่ได้ในรอบที่ 3-8 มาใช้ในการทดลอง

การทดสอบคุณลักษณะเฉพาะของเซลล์

1.1 ตรวจดูจากการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการสร้างกระดูก ได้แก่ ยีน COL1A1, RUNX2 และ OCN ที่มีลำดับไพรเมอร์⁽²⁸⁾ ดังตาราง 2 ด้วยวิธี reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) สกัดแยก RNA จากเซลล์ในจานเพาะเลี้ยงโดยใช้ Total RNA mini kit (Geneaid, Taiwan) วัดปริมาณของ RNA ที่สกัดได้โดยใช้เครื่อง UV-1800 (Shimadzu, Japan) อ่านค่า UV spectrophotometer ที่ 260/280 นาโนเมตร จากนั้นทำ RT-PCR โดยใช้ RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo scientific, USA) ร่วมกับ RNA 1 ไมโครกรัม แล้วตรวจดูการแสดงออกของยีนโดยวิธี electrophoresis บนแผ่น agarose gel ความเข้มข้นร้อยละ

1.8 (SeaKem® LE Agarose; Lonza Rockland, Inc., USA) จากนั้นจึงย้อมสีด้วย ethidium bromide แล้วอ่านผลโดยใช้เครื่อง Gel Documentation (G:Box, SYNGENE, UK)

ตาราง 2 ลำดับไพรเมอร์ที่ใช้ในการวัดการแสดงออกของยีน

Gene		Primer sequences
<i>COL1A1</i>	Forward	5' GTGCTAAAGGTGCCAATGGT 3'
	Reverse	5' ACCAGGTTACCGCTGTTAC 3'
<i>RUNX2</i>	Forward	5' ATGATGACACTGCCACCTCTGA 3'
	Reverse	5' GGCTGGATAGTGCATTCGTG 3'
<i>OCN</i>	Forward	5' CTTTGTGTCCAAGCAGGAGG 3'
	Reverse	5' CTGAAAGCCGATGTGGTCAG 3'
<i>GAPDH</i>	Forward	5' TCATGGGTGTGAACCATGAGAA3'
	Reverse	5' GGCATGGACTGTGGTCATGAG 3'

ที่มา: Manokawinchoke J, Nattasit P, Thongngam T, Pavasant P, Tompkins KA, Egusa H, et al. Indirect immobilized Jagged1 suppresses cell cycle progression and induces odonto/osteogenic differentiation in human dental pulp cells. Scientific Reports. 2017; 7(1): 10124.

1.2 ทดสอบการสร้างอัลคาไลน์ฟอสฟาเตสของเซลล์สร้างกระดูก โดยหว่านเซลล์ลงในจานเลี้ยงเซลล์ชนิด 24 หลุม โดยแต่ละหลุมจะมีเซลล์จำนวน 3×10^4 เซลล์ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM/F-12 Advance ที่ประกอบด้วย FBS ร้อยละ 10, 200 มิลลิโมลาร์ L-glutamine ร้อยละ 1 และ Penicillin 10,000 ยูนิตต่อมิลลิลิตร/ Streptomycin 10,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร/ Amphotericin B 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ร้อยละ 1 ปริมาณ 1 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงในตู้อบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์ยึดติดกับจานเลี้ยงเซลล์ เมื่อเซลล์มีความหนาแน่นเต็มที่ จึงเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นชนิดที่มีการเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างกระดูก (osteogenic media) ซึ่งประกอบด้วย ascorbic acid 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร, β -glycerophosphate 5 มิลลิโมลาร์ และ dexamethasone 250 นาโนโมลาร์ เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก ๆ 2-3 วัน ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์จนถึงวันที่ 10 แล้วดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออก ล้างด้วย PBS ตรึงเซลล์โดยใช้สารละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 70 นาน

10 นาที ล้างออกด้วย PBS 2 ครั้ง ย้อมสีด้วย BCIP/NBT (AMRESCO, Ohio, USA) นาน 5 นาที โดยใช้กระดาษฟอยล์ (aluminium foil) ปิดทับเพื่อกันแสง เมื่อครบเวลาจึงนำมาล้างออกด้วยน้ำกลั่น แล้ววางทิ้งไว้ให้แห้ง เก็บบันทึกผลโดยเปรียบเทียบผลการทดสอบกับเซลล์ไลน์ของเซลล์ไฟโบรเบลาสต์ (NIH 3T3) ซึ่งใช้เป็นกลุ่มควบคุมเชิงลบในการศึกษาวิจัย

1.3 ทดสอบการสะสมแร่ธาตุในแมทริกซ์ระหว่างเซลล์ โดยหว่านเซลล์ลงในจานเลี้ยงเซลล์ชนิด 24 หลุม ซึ่งมีเซลล์จำนวน 3×10^4 เซลล์ ต่อหลุม ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM/F-12 Advance ที่ประกอบด้วย FBS ร้อยละ 10, 200 มิลลิโมลาร์ L-glutamine ร้อยละ 1 และ Penicillin 10,000 ยูนิตต่อมิลลิลิตร/ Streptomycin 10,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร/ Amphotericin B 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ร้อยละ 1 ปริมาณ 1 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงเซลล์ในตู้บัพที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์ยึดติดกับจานเลี้ยงเซลล์ เมื่อเซลล์มีความหนาแน่นเต็มที่ จึงเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นชนิดที่มีการเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างกระดูก (osteogenic media) ซึ่งบรรจุ ascorbic acid 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร, β -glycerophosphate 5 มิลลิโมลาร์ และ dexamethasone 250 นาโนโมลาร์ เก็บข้อมูลในวันที่ 0 (ก่อนการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นชนิดที่มีการเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างกระดูก), 7, 14, 21 และวันที่ 28 โดยเปลี่ยนอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ทุก ๆ 2-3 วัน เมื่อครบกำหนดวันทดสอบ ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออก ล้างด้วย PBS แล้วตรึงเซลล์ด้วยสารละลายฟอร์มาลดีไฮด์ความเข้มข้นร้อยละ 4 นาน 15 นาที จากนั้นล้างตามด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลา 5 นาที 2 ครั้ง แล้วย้อมด้วยสารละลาย Alizarin red s (Sigma Aldrich, USA) ความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์ ที่ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) เท่ากับ 4.1 - 4.3 ขณะทำการย้อมสีควรปิดทับด้วยกระดาษฟอยล์เพื่อกันแสง บ่มนาน 1 ชั่วโมง บนเครื่องเขย่า เมื่อครบกำหนดเวลาจึงนำมาล้างด้วยน้ำกลั่น 5 ครั้ง⁽²⁹⁾ วางทิ้งไว้ให้แห้งแล้วนำไปบันทึกผลการทดลอง

การเตรียมสารเมทาโครเลตไฮยาโลโรนิกไฮโดรเจลที่ผสมน้ำตาลแมนนิทอลและโปรตีนบีเอสเอ (Man/BSA MeHA hydrogel)

เตรียมสารเมทาโครเลตไฮยาโลโรนิกไฮโดรเจล (MeHA hydrogel) จากกรดไฮยาโลโรนิกตามขั้นตอนของนพนันท์และคณะในปีค.ศ. 2018⁽¹⁴⁾ โดยนำกรดไฮยาโลโรนิกน้ำหนักโมเลกุล 47 กิโลดาลตัน ละลายในโพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (potassium phosphate buffer) สัดส่วนร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก ในสภาวะที่มีค่า pH เท่ากับ 8 แล้วหยดเมทาโครเลตแอนไฮไดรด์ (methacrylic anhydride; Sigma Aldrich, USA) สัดส่วนเชิงมวล 10:1 ของปริมาณกรดไฮยาโลโรนิก ลงในสารละลายที่มีอุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส และควบคุมให้เกิดปฏิกิริยาขึ้นในช่วง

อุณหภูมิ 0-4 องศาเซลเซียสเสมอ จากนั้นค่อยตรวจวัดและปรับค่า pH ของสารให้มีค่าเท่ากับ 8 โดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 5 โมลาร์ และปล่อยให้ปฏิกิริยาดำเนินต่อไป 24 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปปั่นด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 10,000 รอบ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนที่ตกตะกอนออกแล้วนำไปแช่ที่ อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze-dried technique; Labconco lyophilizer, Missouri) และนำไปตรวจดูระดับการเกิดปฏิกิริยาของการสังเคราะห์สาร (degree of modification) ด้วยเครื่องโปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโกปี ความถี่ 300 เมกะเฮิร์ตซ์ ($^1\text{H-NMR}$ spectroscopy, 300 MHz)

เตรียมสารละลายน้ำตาลแมนนิทอลและโปรตีนบีเอสเอ (Man/BSA) โดยชั่งน้ำตาล แมนนิทอล และโปรตีนบีเอสเอในสัดส่วนเชิงมวล 1:1, 2:1, 4:1 และ 100:1 (ตาราง 3) นำมา ละลายในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มี FBS 100 ไมโครลิตร

ตาราง 3 แสดงอัตราส่วนของน้ำตาลแมนนิทอลต่อโปรตีนบีเอสเอ

Mannitol: BSA ratios	Mannitol (g)	BSA (g)
1:1	0.0025	0.0025
2:1	0.0033	0.0017
4:1	0.004	0.001
100:1	0.00495	0.00005

ที่มา: ตราเกียรติกุล น. ผลของแมนนิทอลในการเป็นสารเพิ่มปริมาณยาต่อคุณสมบัติ ของไฮโดรเจลที่ดัดแปลงแล้วเพื่อพัฒนาเป็นระบบนำส่งสารชีวภาพ [ปริญญาานิพนธ์ วท.บ. สาขา วิทยาการช่องปากและแม็กซ์ซิลโลเฟเชียล]. บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ: มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ; 2561.

เตรียม Man/BSA MeHA hydrogel โดยนำสารละลาย Man/BSA ที่เตรียมไว้ผสมกับ สารละลายพอลิเมอร์ของเมทาไครเลตและกรดไฮยาโลโรนิก (MeHA) ร้อยละ 3 โดยน้ำหนักใน อาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM/F-12 Advance ที่ประกอบด้วย FBS ร้อยละ 10, 200 มิลลิโมลาร์ L-glutamine ร้อยละ 1 และ Penicillin 10,000 ยูนิตต่อมิลลิลิตร/ Streptomycin 10,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร/ Amphotericin B 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีน้ำหนักรวมของ Man/BSA คิดเป็นร้อยละ 1 ของปริมาณไฮโดรเจลทั้งหมด ทำการปรับค่า pH ด้วยสารละลาย

โซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 5 โมลาร์ ให้มีค่า pH เท่ากับ 8 แล้วนำไปครอสลิงค์โดยเติม DTT ในสัดส่วนโมเลกุล thiol ต่อ ene เท่ากับ 1:2 แล้วทำการวัดระยะเวลาการก่อตัวเป็นเจลด้วยวิธี Vial tilting⁽¹³⁾

การทดสอบความมีชีวิตของเซลล์กระดูกเข้าพันมนุษย์ ที่เพาะเลี้ยงในไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกที่ผสมด้วยน้ำตาลแมนนิทอลและบีเอสเอ

ในการศึกษานี้แบ่งกลุ่มตัวอย่างออกเป็น 4 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่เพาะเลี้ยงเซลล์ภายใน (encapsulation) Man/BSA MeHA hydrogel ที่มีอัตราส่วนของ Man/BSA เท่ากับ 1:1, 2:1, 4:1 และ 100:1 และมีกลุ่มควบคุมคือกลุ่มที่เพาะเลี้ยงเซลล์ภายใน MeHA hydrogel เตรียมไฮโดรเจลโดยชั่ง MeHA อัตราส่วนร้อยละ 3 โดยมวลต่อปริมาตรของไฮโดรเจลที่ต้องการ ทำให้ปราศจากเชื้อโดยแช่ในเอทานอลบริสุทธิ์ (absolute ethanol) นาน 15 นาที แล้วทำให้แห้งบนภาชนะที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อ ละลายพอลิเมอร์ MeHA ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM/F-12 Advance ที่ประกอบด้วย FBS ร้อยละ 10, 200 มิลลิโมลาร์ L-glutamine ร้อยละ 1 และ Penicillin 10,000 ยูนิตต่อมิลลิลิตร/ Streptomycin 10,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร/ Amphotericin B 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ร้อยละ 1 สำหรับกลุ่มตัวอย่างเดิมสารละลาย Man/BSA ที่ผ่านการฆ่าเชื้อโดยการกรองผ่านตัวกรอง (sterile syringe filter) ขนาด 0.22 ไมโครเมตร ในอัตราส่วนร้อยละ 1 โดยมวลต่อปริมาตรของไฮโดรเจลทั้งหมด แล้วปรับค่า pH ให้เท่ากับ 8-9 จึงทำการครอสลิงค์โดยเติม DTT ในสัดส่วนโมเลกุล thiol ต่อ ene 1:2 ปรับค่า pH ให้อยู่ในช่วง 8-9 อีกครั้ง ใส่เซลล์ความเข้มข้น 1×10^4 เซลล์ ต่อไฮโดรเจล 50 ไมโครลิตร จากนั้นดูดสารขึ้นลงเบา ๆ เพื่อผสมโดยใช้ปิเปต แล้วใส่สารละลายไฮโดรเจลที่มีเซลล์อยู่ลงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 96 หลุม หลุมละ 50 ไมโครลิตร รอจนการก่อตัวเป็นเจลเกิดขึ้นเต็มที่ที่อุณหภูมิห้อง แล้วเติมอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ปริมาณ 100 ไมโครลิตร นำจานเลี้ยงเซลล์เข้าตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 จากนั้นเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก ๆ 2-3 วัน ทดสอบความมีชีวิตของเซลล์กระดูกเข้าพันมนุษย์ ในวันที่ 1, 3, 7, 10 และ 14 ด้วยสารละลาย resazurin (PrestoBlue™ cell viability reagent, Invitrogen; ThermoFisher Scientific) ซึ่งสามารถวัดอัตราการเกิดเมแทบอลิซึมและบ่งบอกถึงการเจริญเติบโต เพิ่มจำนวนของเซลล์ได้ โดยเตรียมในอัตราส่วนสารละลาย Prestobluetm ต่ออาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ 1 ต่อ 10 ใส่สารละลายหลุมละ 100 ไมโครลิตร นำเข้าตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ดูดสารละลายทดสอบออก นำมาวัดผลโดยวัดค่าความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescence intensity) ที่ความยาวคลื่น 560/590 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง Microplate reader (CLARIOStar, BMG Labtech, USA)

การตรวจจุลลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์

ตรวจดูรูปร่างเซลล์ด้วยวิธีอิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์ (immunofluorescence assay) โดยเตรียมไฮโดรเจลทั้ง 5 กลุ่มการทดลองดังวิธีการข้างต้นร่วมกับการเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ความเข้มข้น 1.5×10^4 เซลล์ ต่อไฮโดรเจล 50 ไมโครลิตร ในสไลด์จานเพาะเลี้ยงชนิด 8 ช่อง (8 well cell culture slide) หลังจากเกิดการก่อตัวเป็นเจลเต็มที่ เติมหอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ปริมาณ 200 ไมโครลิตร จากนั้นเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก ๆ 2-3 วัน จนถึงวันที่ 10 ของการทดลอง ดูดอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ออก ล้างด้วย PBS 2 ครั้ง แล้วตรึงเซลล์ด้วยสารละลายฟอรัมาลดีไฮด์ความเข้มข้นร้อยละ 4 นาน 20 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ล้างด้วยสารละลาย Polysorbate 20 (Tween[®] 20, OmniPur, Calbiochem, USA) ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 2 ครั้ง ตามด้วยสารละลาย TRITON[®] X-100 (AMRESCO, Ohio) ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 นาน 5 นาที เพื่อทำการ permeabilized เซลล์ ล้างด้วย Tween[®] 20 อีก 2 ครั้ง บล็อกโปรตีนที่ไม่จำเพาะด้วยสารละลายโปรตีน BSA ความเข้มข้นร้อยละ 1 นาน 30 นาที แล้วล้างออกเบา ๆ ด้วย Tween[®] 20 จากนั้นย้อมสีของนิวเคลียสและแอกทิน (nuclear and actin staining) ด้วยสารสีเรืองแสง (fluorescence dye) DAPI (4,6'-diamidino-2-phenylindole, Thermo scientific[™], USA) ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใช้งานในอัตราส่วนที่เจือจาง 1 ต่อ 1000 ในสารละลาย PBS และ rhodamine phalloidine (Invitrogen[™], USA) ความเข้มข้น 6.6 ไมโครโมลาร์ ใช้งานในอัตราส่วนที่เจือจาง 1 ต่อ 40 ในสารละลาย PBS ตามวิธีการที่แนะนำจากบริษัทผู้ผลิตตามลำดับ นาน 30 นาที แล้วอ่านผลด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescence microscope) ที่เลนส์วัตถุกำลังขยาย 10 เท่า และโปรแกรม Image J

การทดสอบระดับปฏิกิริยาอัลคาไลน์ฟอสฟาเตส

เตรียมไฮโดรเจลทั้ง 5 กลุ่มการทดลองและเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ความเข้มข้น 1.5×10^4 เซลล์ ต่อไฮโดรเจล 50 ไมโครลิตร ใส่ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม หลังจากเพาะเลี้ยงเซลล์ในวันที่ 1 ทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นชนิดที่มีการเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างกระดูก ซึ่งประกอบด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM/F-12 Advance ที่มี FBS ร้อยละ 10, 200 มิลลิโมลาร์ L-glutamine ร้อยละ 1, Penicillin 10,000 ยูนิตต่อมิลลิลิตร/ Streptomycin 10,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร/ Amphotericin B 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ร้อยละ 1, ascorbic acid 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, β -glycerophosphate 5 มิลลิโมลาร์ และ dexamethasone 250 นาโนโมลาร์ เก็บข้อมูลในวันที่ 1 (ก่อนการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นชนิดที่มีการเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างกระดูก), 7 และ 14 โดยเปลี่ยนอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ทุก ๆ 2-3 วัน เมื่อครบกำหนด

วันทดสอบ ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออก ล้างด้วย Tris-buffer saline 1x (TBS) ดูดออกให้แห้งแล้วเติมสารละลาย p-nitrophenylphosphate (alkaline phosphatase yellow (pNPP), Sigma Aldrich®, USA) ความเข้มข้น 1.5 กรัมต่อลิตร ปริมาณ 100 ไมโครลิตรต่อหลุมที่อุณหภูมิห้อง ควรปิดทับด้วยกระดาษฟอยล์เพื่อกันแสง แล้วบ่มนาน 2 ชั่วโมง จากนั้นดูดสารออกมาเพื่อวัดปริมาณการดูดกลืนแสง (absorbance; O.D.) ที่ค่าความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Asys UVM 340 Microplate Reader (Biochrom, England) แล้วคำนวณหาปริมาณเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสโดยใช้สูตร

$$\text{Enzyme activity } (\mu\text{moles/min}/\mu\text{g}) = \frac{V(\mu\text{L}) \times \text{OD}_{405 \text{ nm}} (\text{cm}^{-1})}{\epsilon \times \text{incubation time (min)} \times \text{enzyme}(\mu\text{g})}$$

โดย ϵ คือค่าสัมประสิทธิ์การดูดแสงของสาร (molar extinction coefficient) มีหน่วยเป็น $\text{M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ สำหรับสารละลาย p-nitrophenylphosphate มีค่าสัมประสิทธิ์การดูดแสงของสารเท่ากับ $1.78 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$, ค่า $\text{OD}_{405 \text{ nm}} (\text{cm}^{-1})$ หมายถึงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร หาค่าระยะทางที่แสงส่องผ่านในหน่วยเซนติเมตร (light-path length) และ V หมายถึงปริมาตรโดยรวมของสารทดสอบ (ในการทดลองนี้เท่ากับ 150 μL)⁽³⁰⁾

การทดสอบการสร้างโปรตีนคอลลาเจนชนิดที่ 1

ทดสอบการสร้างโปรตีนคอลลาเจนชนิดที่ 1 ด้วยวิธีอิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์ (immunofluorescence assay) โดยเตรียมไฮโดรเจลทั้ง 5 กลุ่มการทดลองร่วมกับการเพาะเลี้ยงเซลล์ความเข้มข้น 1.5×10^4 เซลล์ ต่อไฮโดรเจล 50 ไมโครลิตร ในจานเพาะเลี้ยงชนิด 96 หลุม หลังจากเพาะเลี้ยงเซลล์ในวันที่ 1 ทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นชนิดที่มีการเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างกระดูก ซึ่งประกอบด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM/F-12 Advance ที่มี FBS ร้อยละ 10, 200 มิลลิโมลาร์ L-glutamine ร้อยละ 1, Penicillin 10,000 ยูนิตต่อมิลลิลิตร/ Streptomycin 10,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร/ Amphotericin B 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ร้อยละ 1, ascorbic acid 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, β -glycerophosphate 5 มิลลิโมลาร์ และ dexamethasone 250 นาโนโมลาร์ จากนั้นเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก ๆ 2-3 วัน จนถึงวันที่ 14 ของการทดลอง ดูดอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ออก ล้างด้วย PBS แล้วตรึงเซลล์ด้วยสารละลายฟอรัมาลดีไฮด์ความเข้มข้น ร้อยละ 4 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เมื่อครบ 24 ชั่วโมง จึงล้างด้วย PBS แล้วบล็อกแอนติบอดีที่ไม่จำเพาะ (non-specific antibody) ด้วย FBS นาน 60 นาที จากนั้นบ่มด้วย collagen I

monoclonal antibody (5D8-G9) (Thermo fisher scientific, USA) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย PBS บ่มต่อด้วย R-phycoerythrin goat anti-mouse IgG (H+L) (Invitrogen™, USA) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที หลังจากล้างด้วย PBS จึงย้อมสียืนวเคลียสด้วยสารสีเรืองแสง DAPI ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วเจือจางที่อัตราส่วน 1 ต่อ 1000 ขณะใช้งาน บ่มนาน 30 นาที ก่อนนำไปอ่านผลด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescence microscope) ที่เลนส์วัตถุกำลังขยาย 10 เท่า และโปรแกรม Image J

การเก็บรวบรวมข้อมูล

1. เก็บข้อมูลเพื่อประเมินถึงความเข้ากันได้ทางชีวภาพของเซลล์กระดูกเข้าพันมนุษย์และไฮโดรเจลทั้ง 4 กลุ่มตัวอย่างจากการวัดค่าความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่ความยาวคลื่น 560/590 นาโนเมตร ในการทดสอบด้วยสารละลาย resazurin
2. ตรวจดูรูปร่างของเซลล์ด้วยวิธีอิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์ ย้อมสียืนวเคลียสและแอ็กทิน แล้วบันทึกผลโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ที่เลนส์วัตถุกำลังขยาย 10 เท่า
3. ทดสอบระดับปฏิกิริยาอัลคาไลน์ฟอสฟาเตส บันทึกผลโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Asys UVM 340 Microplate Reader
4. ทดสอบความสามารถในการสร้างโปรตีนคอลลาเจนชนิดที่ 1 โดยวิธีอิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์ ย้อมสียืนวเคลียสต่อโปรตีนคอลลาเจนชนิดที่ 1 และนิวเคลียส แล้วบันทึกผลโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ที่เลนส์วัตถุกำลังขยาย 10 เท่า

การจัดกระทำข้อมูลและการวิเคราะห์ข้อมูล

1. ประเมินความเข้ากันได้ทางชีวภาพของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในไฮโดรเจลทั้ง 5 กลุ่ม โดยรวบรวมข้อมูลที่แสดงถึงอัตราการเกิดเมแทบอลิซึมของเซลล์ที่ได้จากการวัดค่าความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์ นำมาแสดงผลในรูปแบบของกราฟแท่ง แสดงผลของข้อมูลในแต่ละวัน เพื่อประเมินถึงมีชีวิตของเซลล์ และคำนวณอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์โดยใช้ค่าความชันของกราฟ
2. การตรวจดูรูปร่างของเซลล์ด้วยวิธีอิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์ หลังอ่านผลด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ ทำการบันทึกผลเป็นรูปภาพ ในค่าการดูดกลืนแสงเรืองสีของ DAPI และ rhodamine phalloidine จะได้ภาพที่แสดงสีน้ำเงินและสีแดงบ่งบอกถึงตำแหน่งของเซลล์ที่ประกอบด้วยนิวเคลียสและแอ็กทินตามลำดับ แล้วจัดรวบรวมภาพด้วยโปรแกรม Image J

3. การทดสอบระดับปฏิกิริยาอัลคาไลน์ฟอสฟาเตส นำค่าการดูดกลืนแสงของสารทดสอบที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร มาคำนวณหาประสิทธิภาพการทำงาน (enzyme activity) ของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสในหน่วย $\mu\text{moles/min}/\mu\text{g}$ ตามสูตรดังอธิบายในวิธีการทดลอง แล้วนำมาแสดงในรูปแบบของกราฟแท่ง เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ในกลุ่มตัวอย่างกับกลุ่มควบคุม

4. การทดสอบความสามารถในการสร้างโปรตีนคอลลาเจนชนิดที่ 1 ด้วยวิธีอิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์ อ่านผลภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ที่เลนส์วัตถุกำลังขยาย 10 เท่า ในค่าการดูดกลืนแสงเรืองสีของ DAPI และ R-phycoerythrin จะได้ภาพที่แสดงสีน้ำเงินและสีแดงบ่งบอกถึงนิวเคลียสที่แสดงตำแหน่งของเซลล์ และโปรตีนคอลลาเจนชนิดที่ 1 ที่เซลล์สร้างขึ้นตามลำดับ แล้วจัดรวบรวมภาพด้วยโปรแกรม Image J

5. สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

5.1 ทดสอบความมีการกระจายแบบปกติของข้อมูล (normality test) ด้วย Shapiro-Wilk Test ที่ค่าระดับความเชื่อมั่น 95% ด้วยโปรแกรม IBM SPSS Statistics version 24 (Statistical Package for Social Sciences; SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA)

5.2 เนื่องจากข้อมูลส่วนใหญ่มีการแจกแจงปกติ มีเพียงส่วนน้อยเท่านั้นที่มีการแจกแจงแตกต่างจากโค้งปกติเล็กน้อย จึงใช้สถิติ ANOVA ร่วมกับ Bonferroni test ที่กำหนดระดับความเชื่อมั่นที่ 95% สำหรับการวิเคราะห์ข้อมูลในการประเมินความมีชีวิตของเซลล์ อัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ และการทดสอบระดับปฏิกิริยาอัลคาไลน์ฟอสฟาเตส

บทที่ 4

ผลการดำเนินงานวิจัย

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาถึงความเข้ากันได้ทางชีวภาพของเมทาโครเลตไฮยาโลโรนิกไฮโดรเจลรูปแบบฉีดที่ผสมน้ำตาลแมนนิทอลและโปรตีนบีเอสเอในอัตราส่วนต่าง ๆ ที่มีต่อเซลล์กระดูกเบ้าฟัน ซึ่งผู้วิจัยได้ดำเนินการวิจัยตามขอบเขตและขั้นตอนตามที่ได้ทำการศึกษาดังอธิบาย เพื่อให้ผลวิจัยที่สอดคล้องตามวัตถุประสงค์ที่ได้กำหนดไว้ดังนี้

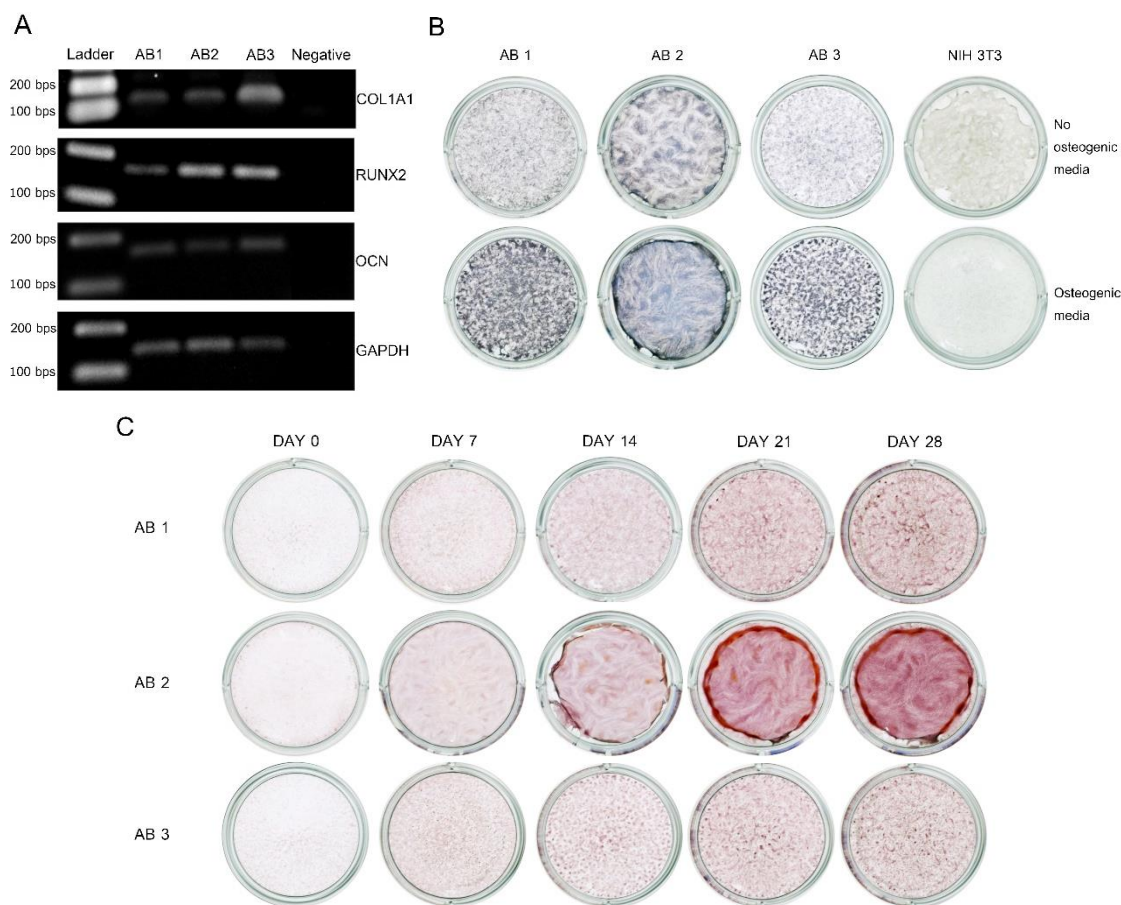
1. ผลการเพาะเลี้ยงและทดสอบคุณลักษณะเฉพาะของเซลล์
2. ผลการสังเคราะห์เมทาโครเลตไฮยาโลโรนิกไฮโดรเจลและผสมเข้ากับน้ำตาลแมนนิทอลและโปรตีนบีเอสเอ
3. ผลการทดสอบความมีชีวิตของเซลล์กระดูกเบ้าฟันมนุษย์
4. ผลการตรวจคุณลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์
5. ผลการทดสอบระดับปฏิกิริยาอัลคาไลน์ฟอสฟาเตส
6. ผลการทดสอบการสร้างโปรตีนคอลลาเจนชนิดที่ 1

ผลการเพาะเลี้ยงและทดสอบคุณลักษณะเฉพาะของเซลล์

ในการทดสอบคุณลักษณะเฉพาะโดยวิธี RT-PCR และ gel electrophoresis ของเซลล์กระดูกเบ้าฟันมนุษย์ (alveolar bone; AB) ที่ทำการเพาะเลี้ยงทั้ง 3 ไหล่ พบมีการแสดงออกของยีนที่เป็นตัวชี้วัดของเซลล์สร้างกระดูก ได้แก่ COL1A1, RUNX2 และ OCN (ภาพประกอบ 5A)

นอกจากนี้ยังตอบสนองต่อการทดสอบการสร้างอัลคาไลน์ฟอสฟาเตสด้วยการย้อมสี BCIP/NBT ในวันที่ 10 ของการทดสอบ โดยมีสีน้ำเงินเข้มกว่าเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (กลุ่มที่ไม่ได้เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิดที่มีการเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างกระดูกและกลุ่มที่ทดสอบด้วยเซลล์ไฟโบรบลาสต์ NIH 3T3 จากสัตว์ทดลองซึ่งใช้เป็นกลุ่มควบคุมเชิงลบ) (ภาพประกอบ 5B)

สำหรับการทดสอบการสะสมแร่ธาตุแคลเซียมในแมทริกซ์ระหว่างเซลล์ด้วยการย้อมสีด้วย Alizarin red พบว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงสามารถเกิดการสะสมแร่ธาตุแคลเซียมในแมทริกซ์ระหว่างเซลล์ได้ โดยพบมีการติดสีแดงเข้มและมีการรวมตัวกันเป็นจุดของแคลเซียมมากขึ้น (ภาพประกอบ 5C) ขณะติดตามการทดสอบในวันที่ 0, 7, 14, 21 และ 28



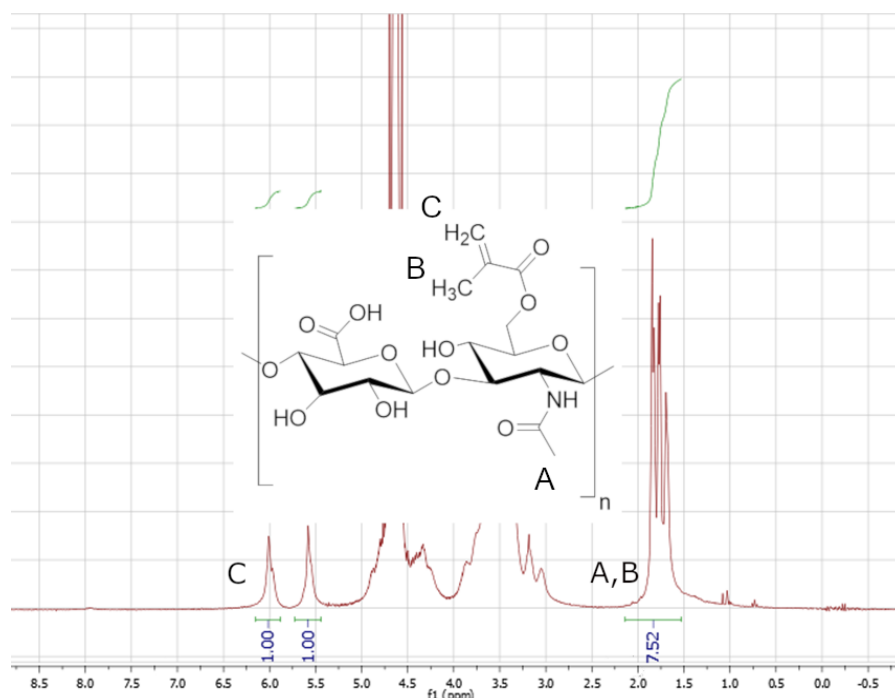
ภาพประกอบ 5 แสดงผลการทดสอบคุณลักษณะของเซลล์ (A) การแสดงออกของยีน COL1A1, RUNX2, OCN และ GAPDH ในเซลล์ AB1, 2 และ 3 เมื่อทำการทดสอบด้วยวิธี RT-PCR และทำ gel electrophoresis, (B) ผลการทดสอบการสร้างอัลคาไลน์ฟอสฟาเตส ด้วยการย้อม BCIP/NBT ในวันที่ 10 ของการเพาะเลี้ยงเซลล์, (C) การสะสมแร่ธาตุแคลเซียมในแมทริกซ์ระหว่างเซลล์ที่ย้อมด้วย Alizarin red ขณะติดตามการทดสอบในวันที่ 0, 7, 14, 21 และ 28

ผลการสังเคราะห์เมทาโครเลตไฮยาโลโรนิคไฮโดรเจลและผสมเข้ากับน้ำตาลแมนนิทอลและโปรตีนบีเอสเอ

เมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโกปี (^1H -NMR spectroscopy) ที่ความถี่ 300 เมกะเฮิร์ตซ์พบว่า MeHA ที่สังเคราะห์ได้มีค่าระดับการเกิดปฏิกิริยา (degree of modification) ของกรดไฮยาโลโรนิคมอนอเมอร์และเมทาโครเลตแอนไฮไดรด์อยู่ในช่วงร้อยละ 42.03-66.37 (ภาพประกอบ 6) และมีระยะเวลาการก่อตัวเป็นเจลของ MeHA hydrogel ที่ผสม Man/BSA ในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ หลังจากการครอสลิงค์ด้วย DTT แล้ว ประมาณ 15-30 นาที เมื่อทดสอบโดยวิธี vial tilting (ตาราง 4)

ตาราง 4 แสดงระดับการเกิดปฏิกิริยาของการสังเคราะห์สารและระยะเวลาการก่อตัวเป็นเจล

Batch of MeHA hydrogel	1	2	3	4	5
Degree of modification (%)	42.03	45.82	63.25	61.2	66.37
Gelation time (min)	30	30	15-30	15-30	15

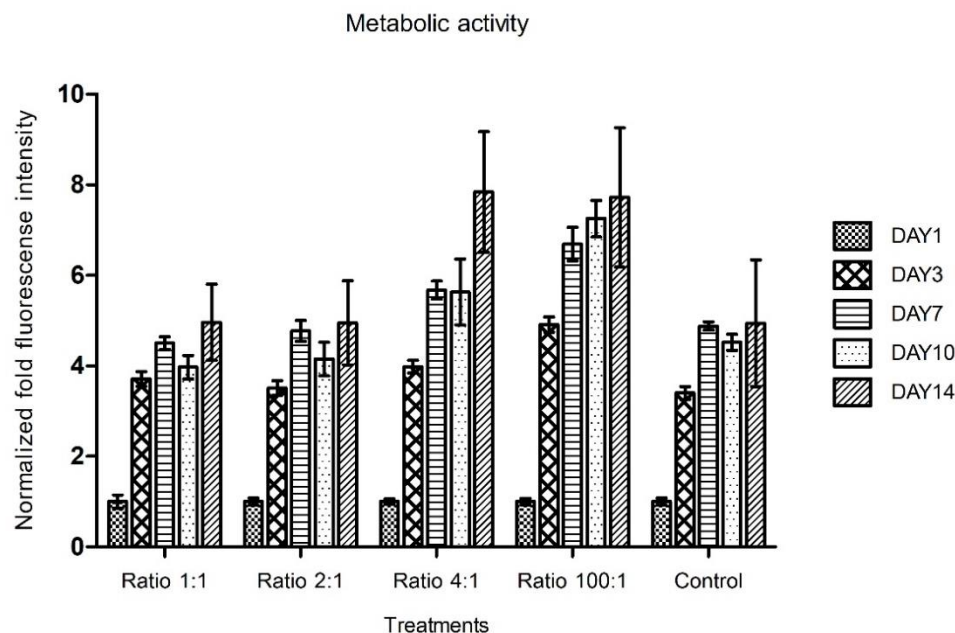


ภาพประกอบ 6 แสดงค่าสเปกตรัมของสาร ที่วิเคราะห์ด้วยเครื่องโปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติก เรโซแนนซ์สเปกโตรสโกปีความถี่ 300 เมกะเฮิร์ตซ์ (^1H -NMR spectroscopy, 300 MHz) โดย (A,B) แสดงค่าสเปกตรัมของหมู่เมทิล ($-\text{CH}_3$) ที่อยู่บนโครงสร้างของกรดไฮยาลูโรนิกและเมทาโครเลตแอนไฮไดรด์ ที่ช่วง 1.6-1.9 ppm และ (C) แสดงค่าสเปกตรัมของหมู่ไวนิล ($-\text{CH}=\text{CH}_2$) ที่อยู่บนโครงสร้างของเมทาโครเลตแอนไฮไดรด์ ที่ช่วง 5.6-5.7 และ 6.1-6.2 ppm

ผลการทดสอบความมีชีวิตของเซลล์กระดูกบ้ำฟันมนุษย์

หลังจากเก็บชิ้นกระดูกและเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ภายนอกร่างกายบนจานเพาะเลี้ยงเซลล์ในลักษณะ 2 มิติ (2D) แล้ว เพื่อทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพของ Man/BSA MeHA hydrogel ที่อัตราส่วน 1:1, 2:1, 4:1 และ 100:1 จึงใช้วิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์ในไฮโดรเจล (encapsulation) ในลักษณะสามมิติ (3D) แล้วประเมินความเข้ากันได้ทางชีวภาพ พบว่าที่ 24 ชั่วโมงแรก เซลล์กระดูกบ้ำฟันมีชีวิตอยู่ได้ทั้งในกลุ่มที่เพาะเลี้ยงใน Man/BSA MeHA hydrogel

ใน 4 อัตราส่วน และกลุ่ม MeHA hydrogel (กลุ่มควบคุม) โดยสามารถเกิดกระบวนการเมแทบอลิซึมต่อสาร resazurin ได้ แต่ไม่สามารถสรุปแนวโน้มในการเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่ม Man/BSA MeHA hydrogel ในแต่ละอัตราส่วนและกลุ่มควบคุมได้ เมื่อติดตามผลในวันที่ 3, 7, 10 และ 14 แล้วคำนวณปรับค่า (normalized) ความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์โดยใช้ข้อมูลในวันที่ 1 เป็นบรรทัดฐาน (baseline) พบว่าเซลล์กระดูกเบ้าฟันมนุษย์ในส่วนที่ยังมีชีวิตอยู่สามารถเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนได้ ซึ่งอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์มีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้นโดยเฉพาะจากช่วงวันที่ 1 ไปถึงวันที่ 3 และช่วงวันที่ 3 ไปจนถึงวันที่ 7 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในทุกกลุ่มการทดลอง ($p < 0.05$) จากนั้นการเจริญเติบโตของเซลล์มีแนวโน้มลดลงหรือคงที่ในวันที่ 10 แล้วค่อยๆเพิ่มขึ้นอีกครั้งในวันที่ 14 ของการทดลอง (ภาพประกอบ 7) โดยค่าเฉลี่ยอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์จากวันที่ 1 ถึงวันที่ 14 ของเซลล์ในกลุ่ม Man/BSA MeHA hydrogel ทุกอัตราส่วนไม่น้อยกว่ากลุ่มควบคุมที่เพาะเลี้ยงใน MeHA hydrogel เมื่อคำนวณโดยนำข้อมูลค่าความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่ปรับค่า (normalized) ข้อมูลของแต่ละวันโดยใช้ข้อมูลในวันที่ 1 เป็นบรรทัดฐาน (baseline) ของตัวอย่างแต่ละหลุมมาสร้างกราฟ แล้วหาสมการของเส้นแสดงแนวโน้ม (trend line) จากนั้นหาค่าความชัน แล้วนำมาประเมินในรูปของค่าเฉลี่ย ($n=6$)



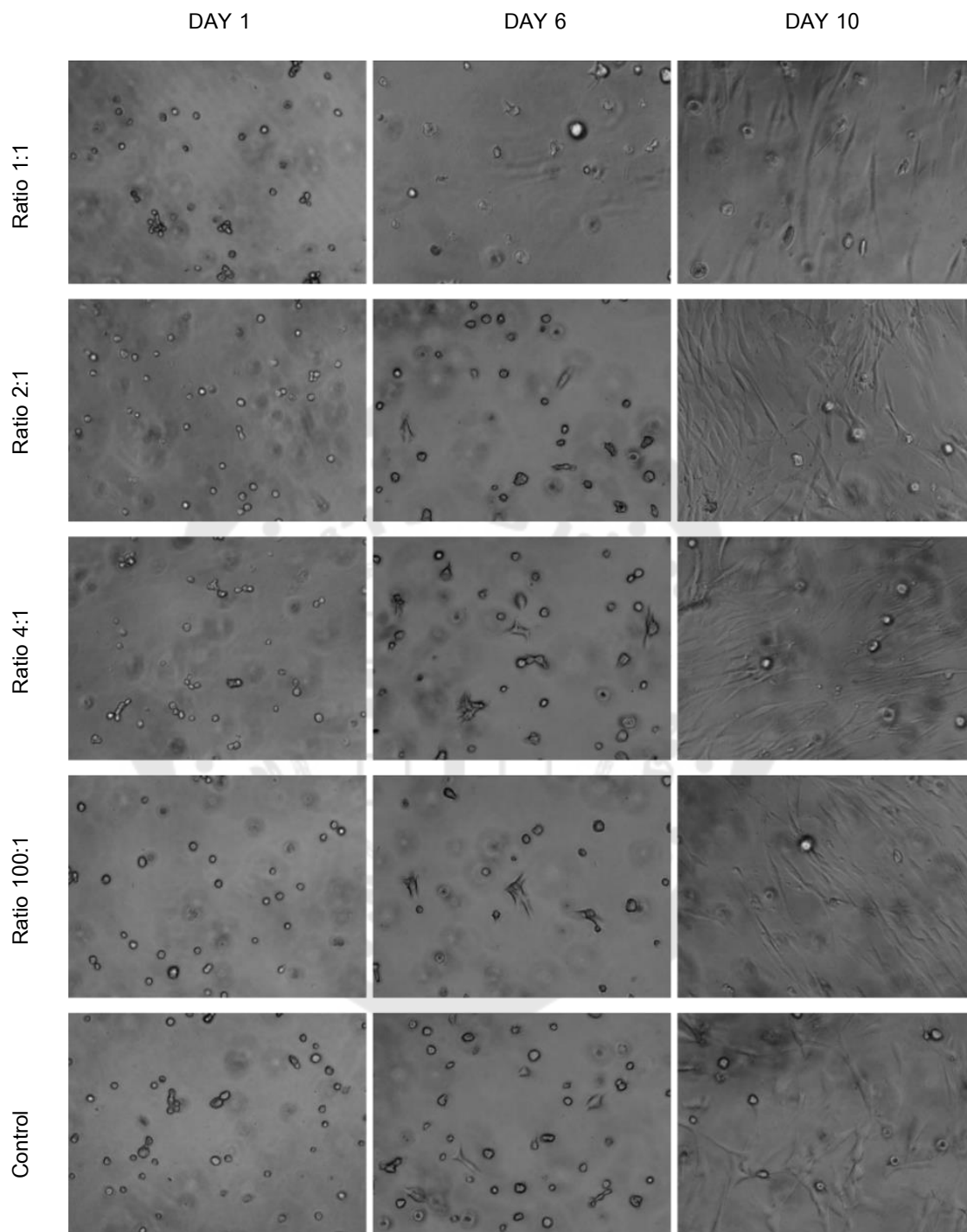
ภาพประกอบ 7 กราฟอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ โดยแสดงค่า normalized fold fluorescence intensity ซึ่งใช้ค่าของวันที่ 1 เป็นบรรทัดฐาน ของการประเมินความมีชีวิตของเซลล์กระดูกเบ้าฟันในวันที่ 1, 3, 7, 10 และ 14 โดยใช้สถิติ One-way repeated measures ANOVA ร่วมกับ Bonferroni multiple comparison test ที่ค่าความเชื่อมั่นที่ 95% ในการเปรียบเทียบ

ผลการตรวจดูลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์

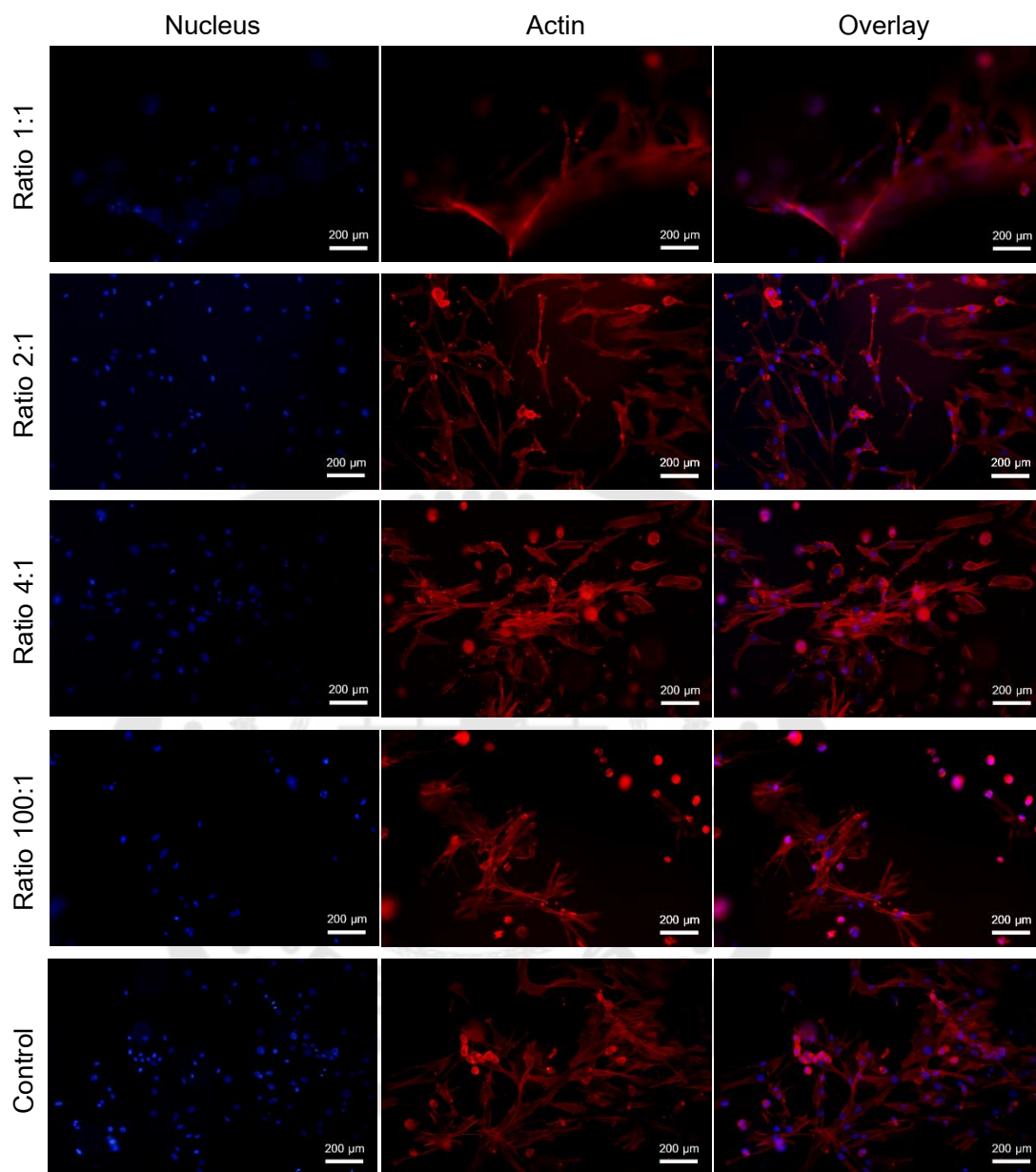
หลังจากเพาะเลี้ยงเซลล์กระดูกเข้าฟันใน Man/BSA MeHA hydrogel ทั้ง 4 อัตราส่วน และใน MeHA hydrogel (กลุ่มควบคุม) ในลักษณะ 3 มิติ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับ (inverted microscope) (ภาพประกอบ 8) พบว่าลักษณะของเซลล์ที่ 24 ชั่วโมงหลังการเพาะเลี้ยง มีลักษณะเป็นทรงกลมทั้งหมด กระจายตัวอยู่โดยทั่วภายในไฮโดรเจลจนกระทั่งประมาณวันที่ 5-6 เซลล์เริ่มมีการยึดตัวออกและเมื่อติดตามดูในวันที่ 10 พบว่าเซลล์เกิดการเคลื่อนที่ลงไปตามด้านล่าง ทำให้บริเวณพื้นจานเพาะเลี้ยงมีปริมาณเซลล์มากกว่าด้านบน เซลล์กระดูกเข้าฟันมีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนมากขึ้น และมีลักษณะรูปร่างยืดยาว จากนั้นทำการตรวจดูลักษณะของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงด้วยวิธีอิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์โดยใช้ย้อมสีของนิวเคลียส (สีน้ำเงิน) และแอกทิน (สีแดง) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ที่เลนส์วัตถุกำลังขยาย 10 เท่า พบว่าเซลล์กระดูกเข้าฟันมีลักษณะกลมโดยเฉพาะในบริเวณที่อยู่ด้านบนผิวของไฮโดรเจล เมื่อปรับโฟกัสภาพในบริเวณก้นหลุมจานเพาะเลี้ยง พบเซลล์มีลักษณะรียาวคล้ายกระสวย (spindle shape) หรือ รูปร่างหลายเหลี่ยม (polygonal shape) และมีบางส่วนที่แผ่อยู่ในเนื้อไฮโดรเจลในลักษณะ 3 มิติ (ภาพประกอบ 9)

ผลการทดสอบระดับปฏิกิริยาอัลคาไลน์ฟอสฟาเตส

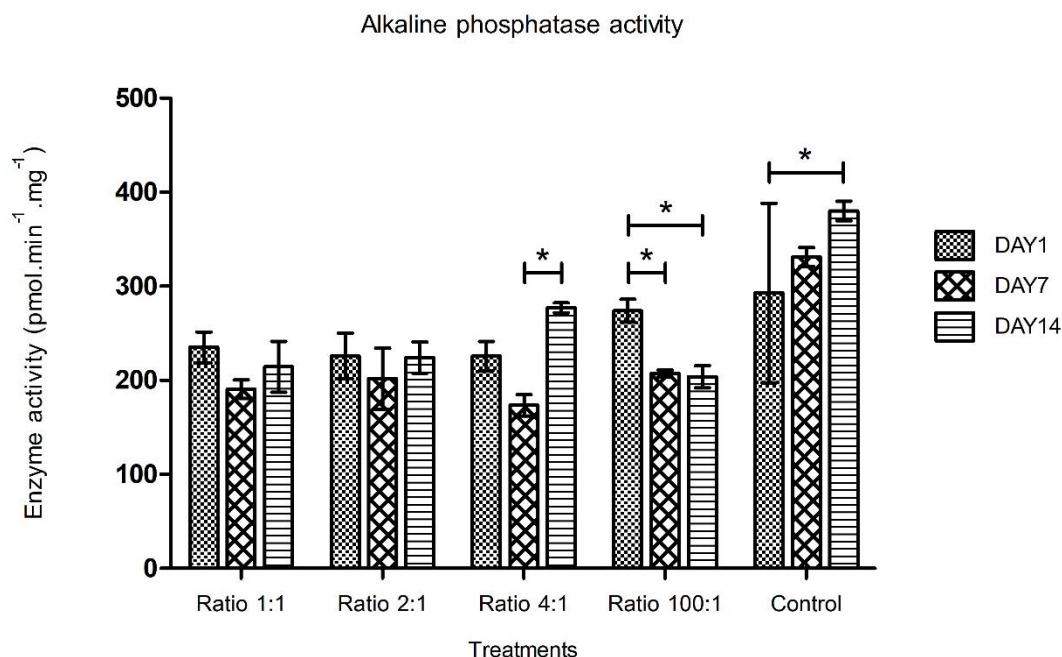
สำหรับคุณสมบัติในด้านศักยภาพในการสร้างกระดูก จากการติดตามดูผลการสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสในวันที่ 1, 7 และ 14 พบว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในไฮโดรเจลทุกกลุ่มการทดลองสามารถสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสได้ โดยในวันที่ 1 มีค่าเฉลี่ยอัตราการสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสไม่แตกต่างกันทางสถิติในทุกกลุ่มการทดลอง เมื่อถึงวันที่ 7 พบว่าอัตราการสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสเฉลี่ยในกลุ่มที่เพาะเลี้ยงใน Man/BSA MeHA hydrogel มีแนวโน้มลดลงโดยเฉพาะในกลุ่มอัตราส่วน 4:1 และ 100:1 และค่อยๆเพิ่มขึ้นเมื่อติดตามถึงวันที่ 14 ของการทดลอง ซึ่งแตกต่างจากกลุ่มที่เพาะเลี้ยงใน MeHA hydrogel ที่ไม่ได้ใส่น้ำตาลแมนนิทอลและโปรตีนบีเอสเอ ซึ่งค่อยๆมีการเพิ่มขึ้นของค่าเฉลี่ยอัตราการสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสในวันที่ 1, 7 และ 14 ตามลำดับ โดยกลุ่ม Man/BSA MeHA hydrogel ทั้ง 4 อัตราส่วนมีค่าเฉลี่ยอัตราการสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสน้อยกว่าในกลุ่มควบคุมทั้งวันที่ 7 และ 14 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับค่าความเชื่อมั่น $p < 0.05$ (ภาพประกอบ 10)



ภาพประกอบ 8 ภาพแสดงรูปร่างเซลล์จากกล้องจุลทรรศน์หัวกลับ ที่กำลังขยาย 100 เท่า ของเซลล์กระดูกเข้าพื้นมนุษย์ที่เลี้ยงใน Man/BSA MeHA hydrogel ทั้ง 4 อัตราส่วน และ MeHA hydrogel (กลุ่มควบคุม) ในวันที่ 1, 6 และ 10 ของการทดลอง



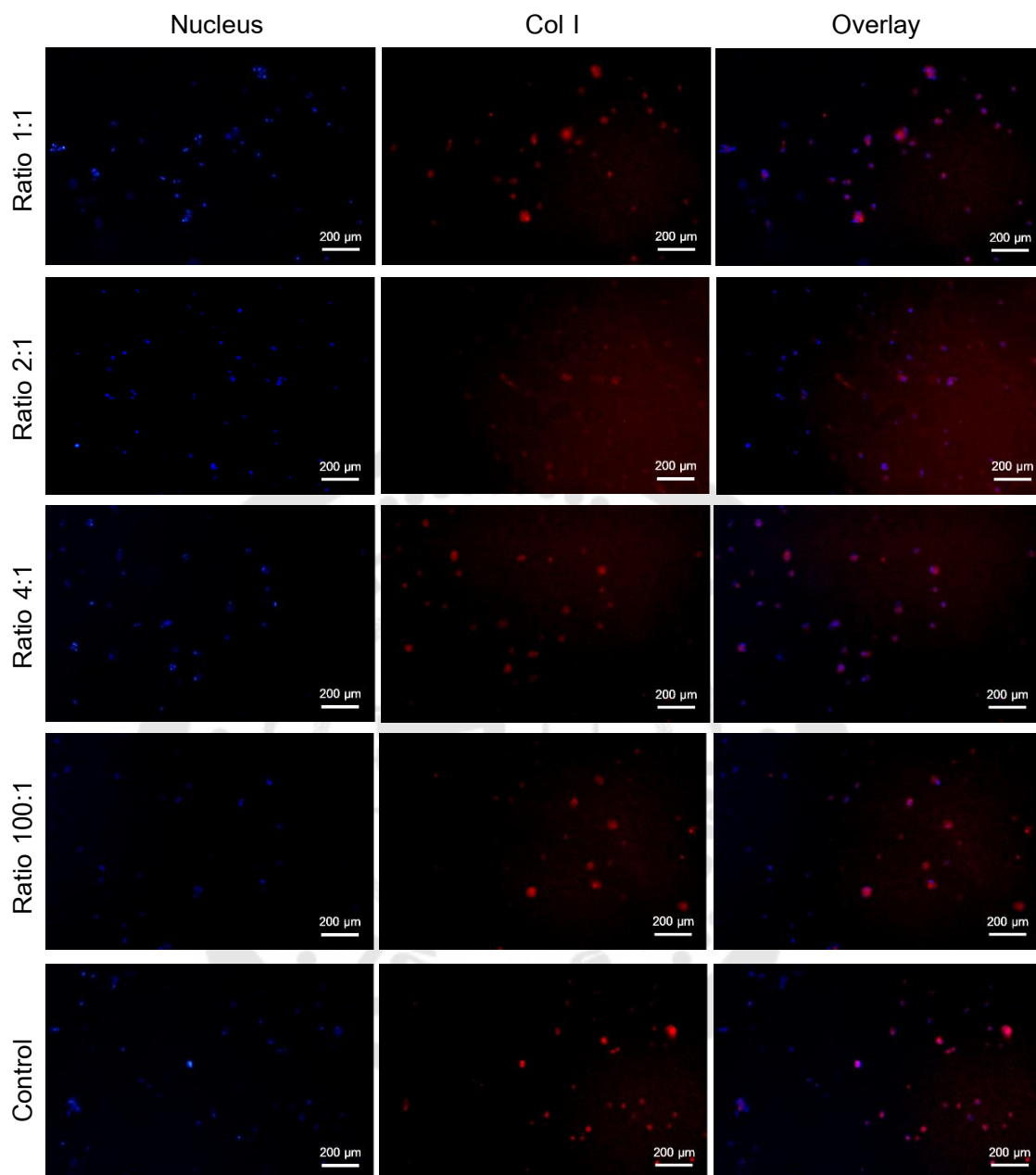
ภาพประกอบ 9 ภาพแสดงรูปร่างเซลล์จากวิธีอิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์
 ฟลูออเรสเซนซ์ ที่เลนส์วัตถุกำลังขยาย 10 เท่า ของเซลล์กระดูกอ่อนที่เลี้ยงใน Man/BSA
 MeHA hydrogel ทั้ง 4 อัตราส่วน และ MeHA hydrogel (กลุ่มควบคุม) ในวันที่ 10 ของการ
 ทดลอง โดยสีแดงแสดงถึงสีย้อม rhodamine phalloidine ที่จับกับโครงสร้างแอกทินของเซลล์
 และสีน้ำเงิน แสดงถึงสีย้อม DAPI ที่จับกับนิวเคลียสของเซลล์



ภาพประกอบ 10 กราฟแสดงอัตราการสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส ของเซลล์กระดูกเข้าพื้นมนุษย์ที่เลี้ยงใน Man/BSA MeHA hydrogel ทั้ง 4 อัตราส่วน และ MeHA hydrogel ในวันที่ 1, 7 และ 14 โดยใช้สถิติ Two-way ANOVA ร่วมกับ Bonferroni multiple comparison test ที่ค่าความเชื่อมั่นที่ 95% ในการเปรียบเทียบ โดย * หมายถึง ค่า $p < 0.05$

ผลการทดสอบการสร้างโปรตีนคอลลาเจนชนิดที่ 1

ผลการเพาะเลี้ยงเซลล์ใน Man/BSA MeHA hydrogel ทั้ง 4 อัตราส่วน และ MeHA hydrogel (กลุ่มควบคุม) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดที่มีการเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างกระดูก พบว่าในวันที่ 14 ของการทดลองเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในทุกกลุ่มสามารถสร้างโปรตีนคอลลาเจนชนิดที่ 1 ได้ โดยพิจารณาจากการติดสีของการย้อมแอนติบอดีของคอลลาเจนชนิดที่ 1 ด้วย R-phycoerythrin goat anti-mouse IgG (H+L) พบมีการติดสีแดงที่เซลล์ และบริเวณรอบ ๆ เซลล์ภายในวัสดุเพาะเลี้ยงไฮโดรเจลแบบ 3 มิติ โดยลักษณะการติดสีนั้นไม่แตกต่างกันในทุกกลุ่มทดลอง (ภาพประกอบ 11)



ภาพประกอบ 11 ภาพแสดงการสร้างโปรตีนคอลลาเจนชนิดที่ 1 ด้วยวิธีอิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ ที่เลนส์วัตถุกำลังขยาย 10 เท่า ของเซลล์กระดูกเข้าพื้น มนุษย์ที่เลี้ยงใน Man/BSA MeHA hydrogel ทั้ง 4 อัตราส่วน และ MeHA hydrogel (กลุ่มควบคุม) ในวันที่ 14 ของการทดลอง โดยสีแดงแสดงสีย้อม R-phycoerythrin ที่จับกับโปรตีนคอลลาเจนชนิดที่ 1 และสีน้ำเงิน แสดงสีย้อม DAPI ที่จับกับโครงสร้างนิวเคลียสของเซลล์

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

หลังจากได้ทำการศึกษาทดลองเรื่องความเข้ากันได้ทางชีวภาพของไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกแบบฉีดที่ดัดแปลงแล้วร่วมกับสารแมนนิทอลและบีเอสเอต่อเซลล์กระดูกเข้าฟัน เพื่อพัฒนาเป็นระบบนำส่งยาและได้ผลการดำเนินงานแล้ว สามารถสรุปผลการดำเนินงาน โดยแบ่งหัวข้อในการสรุปผลได้ดังต่อไปนี้

- 1 สรุปผลการวิจัย
- 2 อภิปรายผลการวิจัย
- 3 ข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

ไฮโดรเจลชนิดเมทาโครเลตจากกรดไฮยาลูโรนิกแบบฉีดที่ดัดแปลงแล้วร่วมกับสารแมนนิทอลและบีเอสเอที่สังเคราะห์ขึ้น มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพกับเซลล์กระดูกเข้าฟันมนุษย์ เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ในเมทาโครเลตไฮยาลูโรนิกไฮโดรเจลร่วมกับน้ำตาลแมนนิทอลและโปรตีนบีเอสเอทั้ง 4 อัตราส่วน ในลักษณะ 3 มิติ เซลล์สามารถมีชีวิต มีการเจริญเติบโต และยังสามารถมีศักยภาพในการทำงานที่เอื้อต่อการสร้างกระดูกได้ การศึกษาวิจัยนี้เป็นการศึกษาเพื่อพัฒนาวัสดุชีวภาพในเบื้องต้น ซึ่งคาดว่าไฮโดรเจลชนิดเมทาโครเลตจากกรดไฮยาลูโรนิกแบบฉีดร่วมกับน้ำตาลแมนนิทอลมีแนวโน้มที่จะสามารถพัฒนาเพื่อใช้ในการนำส่งโกรทแฟกเตอร์ สำหรับงานด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูกต่อไป

อภิปรายผลการวิจัย

ระบบขนส่งสารด้วยไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกเป็นระบบที่ได้รับความนิยมและถูกนำมาศึกษาพัฒนาในงานด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อมากขึ้น^(6, 7, 10) เพื่อพัฒนาเป็นระบบนำส่งสารในการเสริมสร้างกระดูกในงานด้านทันตกรรม งานวิจัยครั้งนี้จึงได้นำไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้รับการปรับปรุงจากการศึกษาของนพนันท์และคณะ⁽¹⁴⁾ ที่มีการเติมน้ำตาลแมนนิทอลและโปรตีนต้นแบบบีเอสเอลงไป เพื่อใช้เป็นสารปรุงแต่งยา ทำให้สามารถปรับแต่งการเตรียมยาจำพวกโกรทแฟกเตอร์ในการพัฒนาในอนาคตได้ง่ายยิ่งขึ้น มาทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพกับเซลล์กระดูกที่ได้รับการเก็บเกี่ยวจากกระดูกเข้าฟันมนุษย์

เซลล์ที่เก็บเกี่ยวจากกระดูกบ่าพื้นมนุษย์ของผู้ป่วยทั้งหมด 3 ราย สามารถนำมาเพาะเลี้ยงและเจริญเติบโตได้ เซลล์ที่เพาะเลี้ยงทั้ง 3 ไหล่ได้ผ่านการตรวจสอบคุณลักษณะของการเป็นเซลล์คล้ายเซลล์สร้างกระดูก โดยให้ผลตอบสนองต่อการทดสอบยีนที่เป็นตัวชี้วัดความเป็นเซลล์สร้างกระดูก ได้แก่ ยีน COL1A1, RUNX2 และ OCN (รูปที่ 5) ซึ่งยีนทั้ง 3 นี้มีบทบาทที่สำคัญและมีการแสดงออกในแต่ละช่วงของการเจริญของเซลล์สร้างกระดูกที่แตกต่างกันออกไป โดยยีน RUNX2 เป็นจุดเริ่มต้นในการกระตุ้นเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์ให้มีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สร้างกระดูก ควบคุมและกระตุ้นให้เซลล์สร้างกระดูกมีการเจริญเติบโตอย่างสมบูรณ์ พบมากในขณะที่ยีนเซลล์ออกจากกระเปาะ preosteoblasts และขณะที่เซลล์อยู่ในระยะการเจริญสูงสุด (late maturation) ยีน COL1A1 เป็นยีนที่ควบคุมการสร้างโปรตีนคอลลาเจน ซึ่งคอลลาเจนชนิดที่ 1 เป็นโปรตีนที่พบได้มากที่สุดที่เซลล์สร้างกระดูกและมีหน้าที่ช่วยเป็นโครงร่างและเสริมความแข็งแรงให้แก่แมทริกซ์ของกระดูก และยีน OCN ที่พบได้ในช่วงของการสะสมแร่ธาตุในแมทริกซ์นอกเซลล์ มีความสำคัญต่อการจับตัวและการสะสมของไฮดรอกซีอะพาไทต์ (hydroxyapatite) ในแมทริกซ์นอกเซลล์ เป็นต้น^(16, 17, 19, 22) นอกจากนี้ยังให้ผลตอบสนองต่อการทดสอบการสร้างอัลคาไลน์ฟอสฟาเตสด้วยการติดสีน้ำเงินเข้มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เพาะเลี้ยงเซลล์โดยใช้อาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ปกติและการเพาะเลี้ยงเซลล์ NIH 3T3 และมีการสะสมแร่ธาตุแคลเซียมในแมทริกซ์ระหว่างเซลล์แสดงจากการย้อมติดสีแดงมากขึ้นเมื่อทดสอบในวันที่ 0, 7, 14, 24 และ 28 ตามลำดับ โดยใช้ Alizarin red ซึ่งเป็นการทดสอบโดยตรวจวัดทางคุณภาพ (qualitative) เพื่อแสดงถึงการมีศักยภาพในการเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างกระดูกได้^(17, 20, 21) ทั้งนี้เซลล์แต่ละไลน์มีการตอบสนองที่ไม่เท่ากัน ทั้งอัตราเร็วของการเจริญเติบโต การตอบสนองต่อการทดสอบยีนที่มีความเข้มของแถบสีย้อมไม่เท่ากัน หรือการตอบสนองต่อการทดสอบศักยภาพในการสร้างกระดูก ซึ่งอาจเกิดขึ้นจากความหลากหลายของการเป็นเซลล์ปฐมภูมิ ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้หลังจากผู้วิจัยได้ทำการศึกษาสำรวจ (pilot study) จึงเลือกเซลล์กระดูกบ่าพื้นที่ผ่านการทดสอบคุณลักษณะแล้วมาใช้ในการทดลองต่อ 1 ไหล่ ที่มีลักษณะค่อนข้างเสถียร ผู้วิจัยสามารถควบคุมการเพาะเลี้ยงได้ โดยเลือกใช้เซลล์ในรุ่นที่ 3-8 ในการทดลอง

พอลิเมอร์ของ MeHA ที่ใช้ในการศึกษามีร้อยละการเกิดปฏิกิริยา (degree of modification) อยู่ในช่วงร้อยละ 42.03-66.37 ซึ่งใกล้เคียงกับที่สามารถสังเคราะห์และนำมาใช้งานในการศึกษาของพนันท์⁽¹⁴⁾ และ Maturavongsadit และคณะ^(12, 13) พบว่าสามารถก่อตัวเป็นเจลโดยใช้ DTT ที่อัตราส่วน thiol ต่อ ene เท่ากับ 1:2 ได้ง่าย ชุด (batch) ที่มีร้อยละการเกิดปฏิกิริยาสูงจะมีระยะเวลาการตัวเป็นเจลที่เร็วกว่า และทุกชุดที่สังเคราะห์ขึ้นมีระยะเวลาการ

ก่อตัวเป็นเจลที่เหมาะสมกับการใช้งานคืออยู่ในช่วง 15-30 นาที เมื่อทดสอบด้วยวิธี vial tilting ซึ่งเท่ากับในการศึกษาของพนันท์และคณะ⁽¹⁴⁾ แต่เมื่อนำมาใช้งานในการเพาะเลี้ยงเซลล์ หลังจากเตรียม Man/BSA MeHA ในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์และปรับค่า pH เสร็จแล้ว ทำการเติมสารเชื่อมโยย DTT ปรับให้ค่า pH อยู่ในช่วง 8-9 อีกครั้ง แล้วจึงเติมเซลล์กระดูกบ่าพันร่วมกับอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ตามปริมาณที่คำนวณไว้ และรอให้เกิดการก่อตัวเป็นเจลเต็มที่อุณหภูมิห้องในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ปลอดเชื้อ (laminar flow hood) พบว่ามีระยะเวลาการก่อตัวเป็นเจลสมบูรณ์สูงสุดที่ 2 ชั่วโมง ซึ่งใช้เวลานานขึ้นจากการทดสอบการก่อตัวเป็นเจลโดยที่ยังไม่ได้เติมเซลล์กระดูกบ่าพันลงไป ความแตกต่างนี้อาจเป็นผลจากค่าความเป็นกรด-ด่างที่เปลี่ยนไปจากผลของอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ที่เติมเข้าไปเป็นส่วนประกอบร่วมกับเซลล์ ซึ่งหากโดยรวมแล้วสารละลายทั้งหมดมีค่าความเป็นกรด-ด่างที่ต่ำลง จะส่งผลต่อระยะเวลาการก่อตัวเป็นเจลที่นานมากขึ้น^(13, 31)

ในการศึกษานี้ประเมินความเข้ากันได้ทางชีวภาพของ Man/BSA MeHA hydrogel ที่อัตราส่วน 1:1, 2:1, 4:1 และ 100:1 ต่อเซลล์กระดูกบ่าพันมนุษย์โดยติดตามความมีชีวิตของเซลล์หลังจากถูกเพาะเลี้ยงในสารทดสอบที่ 24 ชั่วโมงแรก จากนั้นติดตามผลต่อเนื่องในวันที่ 3, 7, 10 และ 14 จากการวัดเมแทบอลิซึมของเซลล์ที่มีต่อสาร resazurin ซึ่งใช้งานในลักษณะเป็นสารละลาย มีความไวในการทดสอบสูง มีความเป็นพิษต่อเซลล์ต่ำ ปลอดภัย ใช้งานได้ง่ายและสามารถใช้ประเมินถึงอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ได้⁽³²⁾ ในการเพาะเลี้ยงเซลล์นี้ใช้การเพาะเลี้ยงแบบ 3 มิติ เซลล์ถูกห่อหุ้ม (encapsulation) อยู่ภายในไฮโดรเจลทั้งหมดทำให้มีการสัมผัสกันโดยตรง จากการทดลองที่ 24 ชั่วโมงแรกนั้น สามารถตรวจพบถึงการมีเมแทบอลิซึมของเซลล์เกิดขึ้นได้ในทุกกลุ่มการทดลอง (ภาพประกอบ 7) ซึ่งเซลล์ที่เพาะเลี้ยงนี้ยังไม่ได้ผ่านกระบวนการเปลี่ยนอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ใด ๆ แสดงถึงเซลล์กระดูกบ่าพันที่เพาะเลี้ยงสามารถมีชีวิตอยู่ได้ภายในวัสดุ และกระบวนการเตรียมสาร การเติมสารเชื่อมโยย DTT ตามปริมาณที่คำนวณ และการเกิดการครอสลิงค์ก่อตัวเป็นเจลของไฮโดรเจลนั้นไม่เป็นพิษต่อเซลล์ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Maturavongsadit และคณะ⁽¹³⁾ ที่อธิบายถึงสารเชื่อมโยย DTT ที่สามารถก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์เมื่อใช้ในปริมาณและความเข้มข้นที่สูง ในการศึกษาถึงคุณสมบัติของเมทาโครเลตไฮยาโลโรนิกไฮโดรเจลที่เชื่อมโยยโดยสารเชื่อมโยยชนิดต่าง ๆ พบว่าไม่สามารถตรวจพบการมีชีวิตอยู่ของเซลล์ได้ เมื่อใช้อัตราส่วน thiol ต่อ ene เท่ากับ 4 ต่อ 1 และการใช้อัตราส่วน thiol ต่อ ene เท่ากับ 2 ต่อ 1 ของสารเชื่อมโยยชนิด DTT เป็นอัตราส่วนสูงสุดที่ยังทำให้เซลล์สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ นอกจากนี้ร้อยละความเข้มข้นของพอลิเมอร์ก็ส่งผลต่อการมีชีวิตของเซลล์เช่นกัน การศึกษาของ Castillo Diaz ในปี 2014⁽³³⁾ ได้ศึกษาถึงการปรับปรุงไฮโดรเจลโดยใช้

สายโปรตีนชนิด FEFEFKFK ในหลายความเข้มข้นเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์และพัฒนาคุณสมบัติเพื่อให้เหมาะสมต่อเซลล์กระดูกมนุษย์ ในการทดสอบความมีชีวิตของเซลล์โดยการทำ live/ dead assay พบว่าไฮโดรเจลที่ความเข้มข้นต่ำ (ร้อยละ2) ลักษณะเจลอ่อนนุ่มจะมีอัตราการรอดของเซลล์น้อย แต่การใช้ไฮโดรเจลที่ความเข้มข้นสูง (ร้อยละ4-5) ก็ส่งผลเช่นกันซึ่งอาจเกิดจากการมีความหนาแน่นของเนื้อเจลที่มาก ทำให้มีข้อจำกัดในเรื่องของการแลกเปลี่ยนสารอาหารและของเสียเกิดขึ้น ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ใช้เมทาโครเลตไฮยาโลโรนิกไฮโดรเจลที่มีปริมาณพอลิเมอร์ของ MeHA ร้อยละ 3 ของอัตราส่วนโดยมวลต่อปริมาตรของไฮโดรเจลทั้งหมดและมีอัตราส่วนของ thiol ต่อ ene เท่ากับ 1:2 ในการทดลอง เมื่อติดตามความมีชีวิตของเซลล์ในวันที่ 3, 7, 10 และ 14 พบว่าเซลล์กระดูกเข้าพันมนุษย์ที่เหลือน้อย สามารถมีชีวิตและเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนได้ โดยทุกกลุ่มการทดลองมีการเจริญเติบโตเพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในช่วงวันที่ 1, 3 และ 7 (ภาพประกอบ 7) และมีการเจริญเติบโตที่ช้าลงหรือคงที่ในช่วงวันที่ 10 และ 14 ซึ่งคล้ายกับการศึกษาของ Maturavongsadit ⁽¹²⁾ และ Luis A Castillo Diaz และคณะ ⁽³³⁾ เมื่อนำมาคำนวณอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ พบว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในกลุ่ม Man/BSA MEHA hydrogel ทุกอัตราส่วนมีอัตราค่าเฉลี่ยการเจริญเติบโตไม่น้อยกว่ากลุ่มควบคุม โดยการศึกษาของ Terada และคณะในปี 1998 ⁽³⁴⁾ ศึกษาถึงผลของน้ำตาลกลูโคสที่มีต่ออัตราการเจริญของเซลล์สร้างกระดูก โดยแบ่งการทดสอบออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ใส่น้ำตาลกลูโคสในระดับปกติ, กลุ่มน้ำตาลกลูโคสระดับสูง และกลุ่มน้ำตาลกลูโคสในระดับปกติร่วมกับน้ำตาลแมนนิทอลระดับสูง พบว่าน้ำตาลกลูโคสที่ระดับสูงเท่านั้นที่มีผลลดอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์สร้างกระดูก โดยจะแปรผันตามระดับความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสที่มากขึ้นด้วย ส่วนกลุ่มที่ใส่น้ำตาลแมนนิทอลระดับสูงร่วมกับน้ำตาลกลูโคสระดับปกติไม่มีผลต่ออัตราการเจริญเติบโตของเซลล์สร้างกระดูก ในการทดลองครั้งนี้ผู้วิจัยพบว่าไม่สามารถเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดลองได้แน่ชัดเนื่องจากผลที่ได้จากการทดลองไม่ได้มีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกันเสมอ ซึ่งคาดว่าอาจเกิดจากการมีความไวในเทคนิคการเตรียมสารค่อนข้างสูง (technique sensitivity) มีหลายปัจจัยที่เกี่ยวข้องและสามารถควบคุมได้ยาก ซึ่งอาจต้องพัฒนาวิธีการเตรียมเพื่อนำมาใช้งานต่อไปในอนาคต

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์กระดูกเข้าพันที่เพาะเลี้ยงในไฮโดรเจลทุกกลุ่มการทดลองนั้นไม่แตกต่างกันทั้งในด้านรูปร่าง ปริมาณ และการกระจายตัวของเซลล์ โดยเริ่มต้นนั้นจะมีลักษณะกลม และค่อย ๆ เริ่มยืดยาวขึ้นในวันที่ 5-6 ของการเพาะเลี้ยง ซึ่งระยะเวลาของการยืดเกาะของเซลล์กระดูกนั้นขึ้นกับหลายปัจจัย เช่น ลักษณะพื้นผิว ความแข็งของผิววัสดุ ความขรุขระ

และสารเคมีที่ใช้ปรับปรุงพื้นผิวเพื่อเอื้อต่อการยึดเกาะของเซลล์ ซึ่งอาจนำไปใช้ในการพัฒนาสูตรของระบบนำส่งสารชนิดเมทาโครเลตไฮยาโลโรนิกไฮโดรเจลต่อไปโดยการเติมสารที่ช่วยให้โปรตีนตัวรับ (receptor) บนเซลล์สามารถจับกับพื้นผิวของสารได้ดีขึ้น เช่น กรดอะมิโน Arg-Gly-Asp (RGD) หรือ lysine-arginine-serine-arginine (KRSR) เป็นต้น⁽³⁵⁻³⁷⁾ ในวันที่ 10 ของการทดลองพบว่าปริมาณเซลล์บริเวณส่วนล่างของไฮโดรเจลและพื้นจานเพาะเลี้ยงเป็นส่วนใหญ่ แสดงถึงความสามารถของเซลล์และวัสดุที่มีรูพรุนมาก ทำให้เซลล์สามารถเกิดการเคลื่อนย้ายที่ (migration) ภายในวัสดุได้ และเซลล์ที่อยู่บริเวณใกล้พื้นจานเพาะเลี้ยงจะมีความสามารถในการเจริญเติบโตแบ่งตัวได้ดี ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์พบว่าเซลล์มีลักษณะกลมโดยเฉพาะในบริเวณที่อยู่ด้านบนของไฮโดรเจล และมีลักษณะรียาวคล้ายกระสวย (spindle shape) หรือ รูปร่างหลายเหลี่ยม (polygonal shape) ที่ก้นหลุมจานเพาะเลี้ยง และบางส่วนอยู่ในไฮโดรเจลแบบ 3 มิติ (ภาพประกอบ 9) ซึ่งคล้ายกับการศึกษาของ Luis A Castillo Diaz และคณะ⁽³³⁾ ได้เพาะเลี้ยงเซลล์กระดูกมนุษย์ในไฮโดรเจลที่มีโปรตีนชนิด FEFEFKFK เป็นสารตั้งต้น พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 14 วัน เซลล์ที่เพาะเลี้ยงมีลักษณะรูปร่างกลมหรือลูกบาศก์ ไม่มีลักษณะรียาวคล้ายเซลล์ไฟโบรบลาสต์เหมือนการเพาะเลี้ยงแบบ 2 มิติ บนจานเพาะเลี้ยงเซลล์ โดยอภิปรายว่าอาจคล้ายกับลักษณะเซลล์สร้างกระดูกที่อยู่ในกระดูกตามธรรมชาติในร่างกายมนุษย์ นอกจากนี้การที่พบเซลล์มีหลายรูปแบบอาจเกิดจากระดับความแข็งแรงผิวของไฮโดรเจลที่เปลี่ยนแปลงไป โดยเฉพาะไฮโดรเจลที่อยู่บริเวณด้านบนของจานเพาะเลี้ยง ในการทดลองนี้มีการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก ๆ 2-3 วัน ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม ซึ่งผิวหน้าสัมผัสของเจลที่มีต่อสารภายนอกโดยตรงจะมีเพียงด้านบนเท่านั้น และเนื่องจากไฮโดรเจลมีความสามารถในการกักน้ำสูง หลังจากมีการก่อตัวเป็นเจลแล้วสามารถดูดเก็บน้ำเข้าในเนื้อเจลได้ถึงร้อยละ 90⁽¹⁴⁾ ทำให้เกิดการบวมน้ำ (swelling) เพิ่มมากขึ้นได้ ซึ่งจากการศึกษาของ Tavsanli และคณะ⁽³⁸⁾ ได้อธิบายถึงความสามารถในการทนต่อแรงเค้น (stress) และแรงเครียด (strain) ของผิวไฮโดรเจล ซึ่งจะลดลงหลังจากที่ไฮโดรเจลมีการบวมน้ำมากขึ้น

ในด้านของการประเมินศักยภาพในการเอื้อต่อการสร้างกระดูก ผู้วิจัยได้เพาะเลี้ยงเซลล์ในกลุ่มทดลองทั้ง 5 กลุ่มและติดตามดูการสร้างโปรตีนคอลลาเจนชนิดที่ 1 ด้วยวิธีทางอิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์ ซึ่งโปรตีนคอลลาเจนชนิดที่ 1 เป็นโปรตีนที่มักพบได้มากที่สุด และพบได้ในช่วงแรกของการเจริญเติบโตเพิ่มจำนวน (proliferation) และช่วงที่เซลล์เริ่มมีการเปลี่ยนแปลงไป (differentiation) ช่วยเป็นโครงร่างและเสริมความแข็งแรงให้แก่เมทริกซ์ของกระดูก (osteoid matrix)^(17, 18, 21, 39) นอกจากนี้ยังประเมินถึงผลการสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส ซึ่งมีบทบาท

สำคัญในการทำหน้าที่เติมหมู่ฟอสเฟตเพื่อช่วยให้สามารถเกิดการสะสมแร่ธาตุที่แมทริกซ์นอกเซลล์ได้^(17, 21) จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าในวันที่ 14 ของการทดลอง เซลล์ที่เพาะเลี้ยงในทุกกลุ่มสามารถสร้างโปรตีนคอลลาเจนชนิดที่ 1 ได้ การติดสีเกิดขึ้นที่บริเวณเซลล์ และคาดว่าโปรตีนคอลลาเจนสามารถแพร่ผ่านรูพรุนในเนื้อเจลได้ โดยดูจากการติดสีบริเวณรอบ ๆ เซลล์ (diffuse) ภายในวัสดุเพาะเลี้ยงไฮโดรเจลแบบ 3 มิติ (ภาพประกอบ 11) ส่วนผลการทดสอบการสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส พบว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงสามารถสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสได้ในทุกกลุ่มการทดลอง (ภาพประกอบ 10) โดยกลุ่มที่เพาะเลี้ยงเซลล์ใน Man/BSA MeHA hydrogel ทั้ง 4 อัตราส่วน มีค่าเฉลี่ยอัตราการสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสที่น้อยกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับค่าความเชื่อมั่น $p < 0.05$ และมีแนวโน้มค่าเฉลี่ยอัตราการสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสของวันที่ 7 ลดลงจากวันที่ 1 โดยเฉพาะในกลุ่มที่มีอัตราส่วน Man/BSA เท่ากับ 4:1 และ 100:1 ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Zayzafoon และคณะในปี 2002⁽⁴⁰⁾ และ Cunha และคณะในปี 2014⁽³⁹⁾ ได้ศึกษาผลของน้ำตาลกลูโคสภายนอกเซลล์ (extracellular glucose) ในปริมาณสูงที่มีต่อการทำงานของเซลล์สร้างกระดูก ซึ่งมีน้ำตาลแมนนิทอลเป็นหนึ่งในกลุ่มการทดลองร่วมด้วย พบว่าผลของน้ำตาลแมนนิทอลในปริมาณสูงที่มีต่อเซลล์สร้างกระดูกนั้นมาจากการเพิ่มขึ้นของความเครียดออสโมติก (osmotic stress) ภายนอกเซลล์ ส่งผลต่อการทำงานของเซลล์สร้างกระดูกคล้ายกับการได้รับน้ำตาลกลูโคสในปริมาณสูง กล่าวคือสามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีน OPG และ RANKL กระตุ้นการสร้างโปรตีนคอลลาเจนชนิดที่ 1 แต่ปริมาณน้อยกว่าการกระตุ้นโดยน้ำตาลกลูโคสปริมาณสูง และลดการหลั่งเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส ส่งผลให้การสะสมแร่ธาตุในแมทริกซ์ระหว่างเซลล์เกิดขึ้นได้น้อยลง จากนั้นทำการติดตามผลในวันที่ 14 ของการเพาะเลี้ยงเซลล์พบว่าค่าเฉลี่ยอัตราการสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสค่อย ๆ เพิ่มขึ้นเล็กน้อย ซึ่งผู้วิจัยคาดว่าอาจเป็นผลจากการที่สารละลายน้ำตาลแมนนิทอลมีปริมาณลดลง เนื่องมาจากการเปลี่ยนอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ในระยะเวลาถัดมา

ข้อเสนอแนะ

ในการศึกษาครั้งต่อไปอาจทำการศึกษาเพิ่มเติมถึงผลของการทดสอบทางศักยภาพในการสร้างกระดูกของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับเมทาโครเลตไฮยาโลโรนิกไฮโดรเจลที่ผสมน้ำตาลแมนนิทอลและโปรตีน BSA อาจเพิ่มระยะเวลาการติดตามผลที่นานขึ้น เพื่อให้ได้ข้อมูลที่สมบูรณ์ยิ่งขึ้น นอกจากนี้ก็นำไปพัฒนาโดยการศึกษา ร่วมกับการนำส่งสารจำพวกโกรทแฟกเตอร์เพื่อพัฒนาเป็นระบบนำส่งสารที่เหมาะสมในการใช้งานด้านวิศวกรรมกระดูกในทางทันตกรรมได้ต่อไป



ตาราง 5 ผลทางสถิติของการเปรียบเทียบอัตราการเจริญของเซลล์ในกลุ่มอัตราส่วน 1:1 โดยใช้สถิติ One-way repeated measures ANOVA ร่วมกับ Bonferroni multiple comparison test ที่ค่าความเชื่อมั่นที่ 95%

Within-Subjects Factors

Measure: viability

DAY	Dependent Variable	Descriptive Statistics			
			Mean	Std. Deviation	N
1	DAY1R1	DAY1R1	1.00000	.147513	6
2	DAY3R1	DAY3R1	3.70833	.155102	6
3	DAY7R1	DAY7R1	4.50167	.137028	6
4	DAY10R1	DAY10R1	3.97000	.257294	6
5	DAY14R1	DAY14R1	4.96167	.844782	6

Mauchly's Test of Sphericity^a

Measure: viability

Within Subjects Effect	Mauchly's W	Approx. Chi-Square	df	Sig.	Epsilon ^b		
					Greenhouse-Geisser	Huynh-Feldt	Lower-bound
DAY	.003	20.119	9	.029	.319	.380	.250

Tests the null hypothesis that the error covariance matrix of the orthonormalized transformed dependent variables is proportional to an identity matrix.

a. Design: Intercept

Within Subjects Design: DAY

b. May be used to adjust the degrees of freedom for the averaged tests of significance. Corrected tests are displayed in the Tests of Within-Subjects Effects table.

Pairwise Comparisons

Measure: viability

(I) DAY	(J) DAY	Mean Difference			95% Confidence Interval for Difference ^b	
		(I-J)	Std. Error	Sig. ^b	Lower Bound	Upper Bound
1	2	-2.708*	.087	.000	-3.122	-2.295
	3	-3.502*	.110	.000	-4.029	-2.975
	4	-2.970*	.158	.000	-3.726	-2.214
	5	-3.962*	.380	.001	-5.776	-2.147
2	1	2.708*	.087	.000	2.295	3.122
	3	-.793*	.091	.003	-1.227	-.359

3	4	-.262	.141	1.000	-.934	.411
	5	-1.253	.391	.238	-3.118	.611
	1	3.502*	.110	.000	2.975	4.029
	2	.793*	.091	.003	.359	1.227
	4	.532*	.065	.005	.220	.844
4	5	-.460	.335	1.000	-2.061	1.141
	1	2.970*	.158	.000	2.214	3.726
	2	.262	.141	1.000	-.411	.934
	3	-.532*	.065	.005	-.844	-.220
	5	-.992	.306	.230	-2.454	.471
5	1	3.962*	.380	.001	2.147	5.776
	2	1.253	.391	.238	-.611	3.118
	3	.460	.335	1.000	-1.141	2.061
	4	.992	.306	.230	-.471	2.454

Based on estimated marginal means

*. The mean difference is significant at the .05 level.

b. Adjustment for multiple comparisons: Bonferroni.

ตาราง 6 ผลทางสถิติของการเปรียบเทียบอัตราการเจริญของเซลล์ในกลุ่มอัตราส่วน 2:1 โดยใช้สถิติ One-way repeated measures ANOVA ร่วมกับ Bonferroni multiple comparison test ที่ค่าความเชื่อมั่นที่ 95%

Within-Subjects Factors

Measure: viability

DAY	Dependent Variable
1	DAY1R2
2	DAY3R2
3	DAY7R2
4	DAY10R2
5	DAY14R2

Descriptive Statistics

	Mean	Std. Deviation	N
DAY1R2	1.00000	.080747	6
DAY3R2	3.50833	.158167	6
DAY7R2	4.76667	.227479	6
DAY10R2	4.15167	.374295	6
DAY14R2	4.95000	.926650	6

Mauchly's Test of Sphericity^a

Measure: viability

Within Subjects Effect	Mauchly's W	Approx. Chi-Square	df	Sig.	Epsilon ^b		
					Greenhouse-Geisser	Huynh-Feldt	Lower-bound
DAY	.001	24.834	9	.007	.281	.307	.250

Tests the null hypothesis that the error covariance matrix of the orthonormalized transformed dependent variables is proportional to an identity matrix.

a. Design: Intercept Within Subjects Design: DAY

b. May be used to adjust the degrees of freedom for the averaged tests of significance. Corrected tests are displayed in the Tests of Within-Subjects Effects table.

Pairwise Comparisons

Measure: viability

(I) DAY	(J) DAY	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. ^b	95% Confidence Interval for Difference ^b	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	-2.508*	.072	.000	-2.854	-2.163
	3	-3.767*	.100	.000	-4.244	-3.289
	4	-3.152*	.182	.000	-4.018	-2.285
	5	-3.950*	.407	.002	-5.892	-2.008
2	1	2.508*	.072	.000	2.163	2.854
	3	-1.258*	.047	.000	-1.481	-1.036
	4	-.643*	.134	.049	-1.283	-.004
	5	-1.442	.367	.111	-3.194	.310
3	1	3.767*	.100	.000	3.289	4.244
	2	1.258*	.047	.000	1.036	1.481
	4	.615*	.128	.049	.004	1.226
	5	-.183	.360	1.000	-1.903	1.536
4	1	3.152*	.182	.000	2.285	4.018
	2	.643*	.134	.049	.004	1.283
	3	-.615*	.128	.049	-1.226	-.004
	5	-.798	.249	.237	-1.985	.389
5	1	3.950*	.407	.002	2.008	5.892
	2	1.442	.367	.111	-.310	3.194
	3	.183	.360	1.000	-1.536	1.903
	4	.798	.249	.237	-.389	1.985

Based on estimated marginal means

*. The mean difference is significant at the .05 level.

b. Adjustment for multiple comparisons: Bonferroni.

ตาราง 7 ผลทางสถิติของการเปรียบเทียบอัตราการเจริญของเซลล์ในกลุ่มอัตราส่วน 4:1 โดยใช้สถิติ One-way repeated measures ANOVA ร่วมกับ Bonferroni multiple comparison test ที่ค่าความเชื่อมั่นที่ 95%

Within-Subjects Factors

Measure: viability

DAY	Dependent Variable
1	DAY1R4
2	DAY3R4
3	DAY7R4
4	DAY10R4
5	DAY14R4

Descriptive Statistics

	Mean	Std. Deviation	N
DAY1R4	1.00000	.059666	6
DAY3R4	3.97500	.145430	6
DAY7R4	5.66667	.200964	6
DAY10R4	5.62833	.734450	6
DAY14R4	7.83833	1.326536	6

Mauchly's Test of Sphericity^a

Measure: viability

Within Subjects Effect	Mauchly's W	Approx.			Epsilon ^b		
		Chi-Square	df	Sig.	Greenhouse-Geisser	Huynh-Feldt	Lower-bound
DAY	.000	31.269	9	.001	.335	.412	.250

Tests the null hypothesis that the error covariance matrix of the orthonormalized transformed dependent variables is proportional to an identity matrix.

a. Design: Intercept

Within Subjects Design: DAY

b. May be used to adjust the degrees of freedom for the averaged tests of significance. Corrected tests are displayed in the Tests of Within-Subjects Effects table.

Pairwise Comparisons

Measure: viability

(I) DAY	(J) DAY	Mean Difference			95% Confidence Interval for Difference ^b	
		(I-J)	Std. Error	Sig. ^b	Lower Bound	Upper Bound
1	2	-2.975*	.060	.000	-3.261	-2.689
	3	-4.667*	.099	.000	-5.138	-4.195
	4	-4.628*	.317	.000	-6.141	-3.115
	5	-6.838*	.548	.001	-9.454	-4.222
2	1	2.975*	.060	.000	2.689	3.261
	3	-1.692*	.125	.000	-2.286	-1.097
	4	-1.653*	.332	.042	-3.239	-.067
	5	-3.863*	.546	.009	-6.471	-1.255

3	1	4.667*	.099	.000	4.195	5.138
	2	1.692*	.125	.000	1.097	2.286
	4	.038	.222	1.000	-1.020	1.097
	5	-2.172	.492	.069	-4.521	.177
4	1	4.628*	.317	.000	3.115	6.141
	2	1.653*	.332	.042	.067	3.239
	3	-.038	.222	1.000	-1.097	1.020
	5	-2.210*	.373	.020	-3.991	-.429
5	1	6.838*	.548	.001	4.222	9.454
	2	3.863*	.546	.009	1.255	6.471
	3	2.172	.492	.069	-.177	4.521
	4	2.210*	.373	.020	.429	3.991

Based on estimated marginal means

*. The mean difference is significant at the .05 level.

b. Adjustment for multiple comparisons: Bonferroni.

ตาราง 8 ผลทางสถิติของการเปรียบเทียบอัตราการเจริญของเซลล์ในกลุ่มอัตราส่วน 100:1

โดยใช้สถิติ One-way repeated measures ANOVA ร่วมกับ Bonferroni multiple comparison test ที่ค่าความเชื่อมั่นที่ 95%

Within-Subjects Factors

Measure: viability

Dependent		Descriptive Statistics			
DAY	Variable		Mean	Std. Deviation	N
1	DAY1R100	DAY1R100	1.00000	.064498	6
2	DAY3R100	DAY3R100	4.90833	.166303	6
3	DAY7R100	DAY7R100	6.68667	.364509	6
4	DAY10R100	DAY10R100	7.24667	.395053	6
5	DAY14R100	DAY14R100	7.71500	1.533907	6

ตาราง 9 ผลทางสถิติของการเปรียบเทียบอัตราการเจริญของเซลล์ในกลุ่มควบคุม โดยใช้สถิติ One-way repeated measures ANOVA ร่วมกับ Bonferroni multiple comparison test ที่ค่าความเชื่อมั่นที่ 95%

Mauchly's Test of Sphericity^a

Measure: viability

Within Subjects Effect	Mauchly's W	Approx. Chi-Square	df	Sig.	Epsilon ^b		
					Greenhouse- Geisser	Huynh -Feldt	Lower-bound
DAY	.001	23.438	9	.010	.305	.351	.250

Tests the null hypothesis that the error covariance matrix of the orthonormalized transformed dependent variables is proportional to an identity matrix.

a. Design: Intercept Within Subjects Design: DAY

b. May be used to adjust the degrees of freedom for the averaged tests of significance. Corrected tests are displayed in the Tests of Within-Subjects Effects table.

Within-Subjects Factors

Pairwise Comparisons

Measure: viability

(I) DAY	(J) DAY	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. ^b	95% Confidence Interval for Difference ^b	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	-3.908*	.060	.000	-4.195	-3.622
	3	-5.687*	.168	.000	-6.490	-4.884
	4	-6.247*	.172	.000	-7.066	-5.427
	5	-6.715*	.652	.001	-9.825	-3.605
2	1	3.908*	.060	.000	3.622	4.195
	3	-1.778*	.202	.003	-2.744	-.813
	4	-2.338*	.157	.000	-3.086	-1.591
	5	-2.807	.661	.081	-5.962	.349
3	1	5.687*	.168	.000	4.884	6.490
	2	1.778*	.202	.003	.813	2.744
	4	-.560	.196	.353	-1.493	.373
	5	-1.028	.560	1.000	-3.703	1.647
4	1	6.247*	.172	.000	5.427	7.066
	2	2.338*	.157	.000	1.591	3.086
	3	.560	.196	.353	-.373	1.493
	5	-.468	.596	1.000	-3.315	2.378
5	1	6.715*	.652	.001	3.605	9.825
	2	2.807	.661	.081	-.349	5.962
	3	1.028	.560	1.000	-1.647	3.703
	4	.468	.596	1.000	-2.378	3.315

Based on estimated marginal means

*. The mean difference is significant at the .05 level.

b. Adjustment for multiple comparisons: Bonferroni.

Measure: viability

Descriptive Statistics

DAY	Dependent Variable	Mean	Std. Deviation	N
1	DAY1Rcon	1.00000	.075895	6
2	DAY3Rcon	3.40333	.142922	6
3	DAY7Rcon	4.87500	.092250	6
4	DAY10Rcon	4.52167	.182364	6
5	DAY14Rcon	4.93833	1.399634	6

Mauchly's Test of Sphericity^a

Measure: viability

Within Subjects Effect	Mauchly's W	Approx. Chi-Square	df	Sig.	Greenhouse- Geisser	Epsilon ^b Huynh -Feldt	Lower- bound
DAY	.000	38.637	9	.000	.260	.268	.250

Tests the null hypothesis that the error covariance matrix of the orthonormalized transformed dependent variables is proportional to an identity matrix.

a. Design: Intercept. Within Subjects Design: DAY

b. May be used to adjust the degrees of freedom for the averaged tests of significance. Corrected tests are displayed in the Tests of Within-Subjects Effects table.

Pairwise Comparisons

Measure: viability

(I) DAY	(J) DAY	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. ^b	95% Confidence Interval for Difference ^b	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	-2.403*	.084	.000	-2.802	-2.005
	3	-3.875*	.053	.000	-4.126	-3.624
	4	-3.522*	.102	.000	-4.010	-3.033
	5	-3.938*	.587	.011	-6.739	-1.137
2	1	2.403*	.084	.000	2.005	2.802
	3	-1.472*	.049	.000	-1.703	-1.240
	4	-1.118*	.046	.000	-1.337	-.899
	5	-1.535	.559	.406	-4.205	1.135
3	1	3.875*	.053	.000	3.624	4.126
	2	1.472*	.049	.000	1.240	1.703
	4	.353*	.065	.029	.043	.664
	5	-.063	.569	1.000	-2.778	2.651
4	1	3.522*	.102	.000	3.033	4.010
	2	1.118*	.046	.000	.899	1.337

5	3	-.353*	.065	.029	-.664	-.043
	5	-.417	.524	1.000	-2.917	2.083
	1	3.938*	.587	.011	1.137	6.739
	2	1.535	.559	.406	-1.135	4.205
	3	.063	.569	1.000	-2.651	2.778
	4	.417	.524	1.000	-2.083	2.917

Based on estimated marginal means

*. The mean difference is significant at the .05 level.

b. Adjustment for multiple comparisons: Bonferroni.

ตาราง 10 ผลทางสถิติของการเปรียบเทียบอัตราการสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส โดยใช้สถิติ Two-way ANOVA ร่วมกับ Bonferroni multiple comparison test ที่ค่าความเชื่อมั่นที่ 95%

Between-Subjects Factors

		Value Label	N
DAY	1	day1	15
	2	day7	15
	3	day14	15
Ratio	1	R1:1	9
	2	R2:1	9
	3	R4:1	9
	4	R100:1	9
	5	control	9

Levene's Test of Equality of Error Variances^a

Dependent Variable: ALP

F	df1	df2	Sig.
8.076	14	30	.000

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Design: Intercept + DAY + Ratio + DAY * Ratio

Descriptive Statistics

Dependent Variable: ALP

DAY	Ratio	Mean	Std. Deviation	N
day1	R1:1	235.01833	16.459238	3
	R2:1	225.81167	24.219669	3
	R4:1	225.81167	15.450088	3
	R100:1	273.95467	12.075779	3
	control	292.83700	95.534192	3
	Total	250.68667	47.914251	15
day7	R1:1	190.62133	9.948731	3
	R2:1	201.70100	32.443220	3
	R4:1	173.45500	11.506114	3
	R100:1	206.92900	3.745000	3
	control	331.14900	10.031081	3
	Total	220.77107	60.033491	15

day14	R1:1	214.49767	27.012053	3
	R2:1	224.32933	16.522727	3
	R4:1	276.91933	5.291699	3
	R100:1	203.88567	11.725194	3
	control	380.15000	10.344568	3
	Total	259.95640	68.760532	15
Total	R1:1	213.37911	25.400148	9
	R2:1	217.28067	24.798876	9
	R4:1	225.39533	45.902449	9
	R100:1	228.25644	35.365990	9
	control	334.71200	61.401645	9
	Total	243.80471	60.560093	45

Pairwise Comparisons

Dependent Variable: ALP

Ratio	(I)	DAY	(J) DAY	Mean	Std.	Sig. ^b	95% Confidence Interval for	
				Difference			Difference ^b	
				(I-J)	Error		Lower Bound	Upper Bound
R1:1	day1	day7		44.397	24.076	.225	-16.654	105.448
			day14	20.521	24.076	1.000	-40.531	81.572
	day7	day1		-44.397	24.076	.225	-105.448	16.654
			day14	-23.876	24.076	.988	-84.928	37.175
	day14	day1		-20.521	24.076	1.000	-81.572	40.531
			day7	23.876	24.076	.988	-37.175	84.928
R2:1	day1	day7		24.111	24.076	.974	-36.941	85.162
			day14	1.482	24.076	1.000	-59.569	62.534
	day7	day1		-24.111	24.076	.974	-85.162	36.941
			day14	-22.628	24.076	1.000	-83.680	38.423
	day14	day1		-1.482	24.076	1.000	-62.534	59.569
			day7	22.628	24.076	1.000	-38.423	83.680
R4:1	day1	day7		52.357	24.076	.113	-8.695	113.408
			day14	-51.108	24.076	.126	-112.159	9.944
	day7	day1		-52.357	24.076	.113	-113.408	8.695
			day14	-103.464*	24.076	.001	-164.516	-42.413
	day14	day1		51.108	24.076	.126	-9.944	112.159
			day7	103.464*	24.076	.001	42.413	164.516
R100:1	day1	day7		67.026*	24.076	.028	5.974	128.077
		day14		70.069*	24.076	.020	9.018	131.120

control	day7	day1	-67.026*	24.076	.028	-128.077	-5.974
		day14	3.043	24.076	1.000	-58.008	64.095
	day14	day1	-70.069*	24.076	.020	-131.120	-9.018
		day7	-3.043	24.076	1.000	-64.095	58.008
	day1	day7	-38.312	24.076	.366	-99.363	22.739
		day14	-87.313*	24.076	.003	-148.364	-26.262
	day7	day1	38.312	24.076	.366	-22.739	99.363
		day14	-49.001	24.076	.152	-110.052	12.050
	day14	day1	87.313*	24.076	.003	26.262	148.364
		day7	49.001	24.076	.152	-12.050	110.052

Based on estimated marginal means

*. The mean difference is significant at the .05 level.

b. Adjustment for multiple comparisons: Bonferroni.

Pairwise Comparisons

Dependent Variable: ALP

DAY	(I) Ratio	(J) Ratio	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. ^b	95% Confidence Interval for Difference ^b	
						Lower Bound	Upper Bound
day1	R1:1	R2:1	9.207	24.076	1.000	-63.740	82.153
		R4:1	9.207	24.076	1.000	-63.740	82.153
		R100:1	-38.936	24.076	1.000	-111.883	34.010
		control	-57.819	24.076	.227	-130.765	15.128
	R2:1	R1:1	-9.207	24.076	1.000	-82.153	63.740
		R4:1	-2.132E-14	24.076	1.000	-72.946	72.946
		R100:1	-48.143	24.076	.547	-121.089	24.803
		control	-67.025	24.076	.092	-139.972	5.921
	R4:1	R1:1	-9.207	24.076	1.000	-82.153	63.740
		R2:1	2.132E-14	24.076	1.000	-72.946	72.946
		R100:1	-48.143	24.076	.547	-121.089	24.803
		control	-67.025	24.076	.092	-139.972	5.921
	R100:1	R1:1	38.936	24.076	1.000	-34.010	111.883
		R2:1	48.143	24.076	.547	-24.803	121.089
		R4:1	48.143	24.076	.547	-24.803	121.089
		control	-18.882	24.076	1.000	-91.829	54.064
	control	R1:1	57.819	24.076	.227	-15.128	130.765
		R2:1	67.025	24.076	.092	-5.921	139.972
		R4:1	67.025	24.076	.092	-5.921	139.972

day7	R1:1	R100:1	18.882	24.076	1.000	-54.064	91.829
		R2:1	-11.080	24.076	1.000	-84.026	61.867
		R4:1	17.166	24.076	1.000	-55.780	90.113
		R100:1	-16.308	24.076	1.000	-89.254	56.639
		control	-140.528*	24.076	.000	-213.474	-67.581
	R2:1	R1:1	11.080	24.076	1.000	-61.867	84.026
		R4:1	28.246	24.076	1.000	-44.700	101.192
		R100:1	-5.228	24.076	1.000	-78.174	67.718
		control	-129.448*	24.076	.000	-202.394	-56.502
	R4:1	R1:1	-17.166	24.076	1.000	-90.113	55.780
		R2:1	-28.246	24.076	1.000	-101.192	44.700
		R100:1	-33.474	24.076	1.000	-106.420	39.472
		control	-157.694*	24.076	.000	-230.640	-84.748
	R100:1	R1:1	16.308	24.076	1.000	-56.639	89.254
		R2:1	5.228	24.076	1.000	-67.718	78.174
		R4:1	33.474	24.076	1.000	-39.472	106.420
		control	-124.220*	24.076	.000	-197.166	-51.274
	control	R1:1	140.528*	24.076	.000	67.581	213.474
		R2:1	129.448*	24.076	.000	56.502	202.394
		R4:1	157.694*	24.076	.000	84.748	230.640
		R100:1	124.220*	24.076	.000	51.274	197.166
day14	R1:1	R2:1	-9.832	24.076	1.000	-82.778	63.115
		R4:1	-62.422	24.076	.146	-135.368	10.525
		R100:1	10.612	24.076	1.000	-62.334	83.558
		control	-165.652*	24.076	.000	-238.599	-92.706
	R2:1	R1:1	9.832	24.076	1.000	-63.115	82.778
		R4:1	-52.590	24.076	.369	-125.536	20.356
		R100:1	20.444	24.076	1.000	-52.503	93.390
		control	-155.821*	24.076	.000	-228.767	-82.874
	R4:1	R1:1	62.422	24.076	.146	-10.525	135.368
		R2:1	52.590	24.076	.369	-20.356	125.536
		R100:1	73.034*	24.076	.050	.087	145.980
		control	-103.231*	24.076	.002	-176.177	-30.284
	R100:1	R1:1	-10.612	24.076	1.000	-83.558	62.334
		R2:1	-20.444	24.076	1.000	-93.390	52.503
		R4:1	-73.034*	24.076	.050	-145.980	-.087
		control	-176.264*	24.076	.000	-249.211	-103.318
	control	R1:1	165.652*	24.076	.000	92.706	238.599

R2:1	155.821*	24.076	.000	82.874	228.767
R4:1	103.231*	24.076	.002	30.284	176.177
R100:1	176.264*	24.076	.000	103.318	249.211

Based on estimated marginal means

*. The mean difference is significant at the .05 level.

b. Adjustment for multiple comparisons: Bonferroni.



บรรณานุกรม

1. สำนักทันตสาธารณสุข ก. รายงานผลการสำรวจสุขภาพช่องปากระดับประเทศ ครั้งที่ 8 ประเทศไทย พ.ศ. 2560 พิมพ์ครั้งที่ 1 ed. กรุงเทพฯ: บริษัท สามเจริญพาณิชย์; 2561.
2. Gaviria L, Salcido JP, Guda T, Ong JL. Current trends in dental implants. Journal of Korean Association of Oral and Maxillofacial Surgeons. 2014 Apr; 40(2): 50-60.
3. Venkataraman N, Bansal S, Bansal P, Narayan S. Dynamics of bone graft healing around implants. Journal of the International Clinical Dental Research Organization. 2015 1 December; 7(3): 40-7.
4. Lo KW, Ulery BD, Ashe KM, Laurencin CT. Studies of bone morphogenetic protein-based surgical repair. Advanced Drug Delivery Review. 2012 Sep; 64(12): 1277-91.
5. Chenard KE, Teven CM, He T-C, Reid RR. Bone Morphogenetic Proteins in Craniofacial Surgery: Current Techniques, Clinical Experiences, and the Future of Personalized Stem Cell Therapy. Journal of Biomedicine and Biotechnology. 2012; 2012(601549): 14.
6. Amini AR, Laurencin CT, Nukavarapu SP. Bone Tissue Engineering: Recent Advances and Challenges. Critical reviews in biomedical engineering. 2012; 40(5): 363-408.
7. Vo TN, Kasper FK, Mikos AG. Strategies for controlled delivery of growth factors and cells for bone regeneration. Advanced drug delivery reviews. 2012 Sep; 64(12): 1292-309.
8. Abou Neel EA, Chrzanowski W, Salih VM, Kim HW, Knowles JC. Tissue engineering in dentistry. Journal of dentistry. 2014 Aug; 42(8): 915-28.
9. Bhakta G, Rai B, Lim ZX, Hui JH, Stein GS, van Wijnen AJ, et al. Hyaluronic acid-based hydrogels functionalized with heparin that support controlled release of bioactive BMP-2. Biomaterials. 2012 Sep; 33(26): 6113-22.
10. Martinez-Sanz E, Ossipov DA, Hilborn J, Larsson S, Jonsson KB, Varghese OP. Bone reservoir: Injectable hyaluronic acid hydrogel for minimal invasive bone augmentation. Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society. 2011 Jun 10; 152(2): 232-40.

11. Caló E, Khutoryanskiy VV. Biomedical applications of hydrogels: A review of patents and commercial products. *European Polymer Journal*. 2015; 62: 252-67.
12. 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.
13. Maturavongsadit P, Bi X, Metavarayuth K, Luckanagul JA, Wang Q. Influence of Cross-Linkers on the in Vitro Chondrogenesis of Mesenchymal Stem Cells in Hyaluronic Acid Hydrogels. *ACS Applied Materials & Interfaces*. 2017; 9(4): 3318-29.
14. ตราเกียรติกุล น. ผลของแมนนิทอลในการเป็นสารเพิ่มปริมาณยาต่อคุณสมบัติของไฮโดรเจลที่ดัดแปลงแล้วเพื่อพัฒนาเป็นระบบนำส่งสารชีวภาพ [ปริญญานิพนธ์ วท.บ. สาขาวิทยาการช่องปากและแม็กซิลโลเฟเชียล]. บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ: มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ; 2561.
15. Ohrem HL, Schornick E, Kalivoda A, Ognibene R. Why is mannitol becoming more and more popular as a pharmaceutical excipient in solid dosage forms?. *Pharmaceutical development and technology*. 2014 May; 19(3): 257-62.
16. Rutkovskiy A, Stensløkken K-O, Vaage IJ. Osteoblast Differentiation at a Glance. *Medical Science Monitor Basic Research*. 2016; 22: 95-106.
17. Kini U, Nandeesh BN. Physiology of Bone Formation, Remodeling, and Metabolism. In: Fogelman I, Gnanasegaran G, van der Wall H, editors. *Radionuclide and Hybrid Bone Imaging*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2012. p. 29-57.
18. Wrobel E, Leszczynska J, Brzoska E. The Characteristics Of Human Bone-Derived Cells (HBDCS) during osteogenesis in vitro. *Cellular & Molecular Biology Letters*. 2016; 21: 26.
19. Huang W, Yang S, Shao J, Li Y-P. Signaling and transcriptional regulation in osteoblast commitment and differentiation. *Frontiers in Bioscience*. 2007; 12: 3068-92.
20. Marolt D, Rode M, Kregar-Velikonja N, Jeras M, Knezevic M. Primary human alveolar bone cells isolated from tissue samples acquired at periodontal surgeries exhibit sustained

proliferation and retain osteogenic phenotype during in vitro expansion. PLOS ONE. 2014; 9(1932-6203).

21. Mailhot JM, Borke JL. An isolation and in vitro culturing method for human intraoral bone cells derived from dental implant preparation sites. Clinical oral implants research. 1998; 9(0905-7161): 43-50.

22. Patti A, Gennari L, Merlotti D, Dotta F, Nuti R. Endocrine Actions of Osteocalcin. International Journal of Endocrinology. 2013; 2013: 10.

23. Malicev E, Marolt D, Kregar Velikonja N, Kreft Me, Drobic M, Rode M. Growth and differentiation of alveolar bone cells in tissue-engineered constructs and monolayer cultures. Biotechnology and Bioengineering. 2008; 100(4): 773-81.

24. Kisiel M. Bone Enhancement with BMP-2 for Safe Clinical Translation. Uppsala: Acta Universitatis Upsaliensis; 2013.

25. Highley CB, Prestwich GD, Burdick JA. Recent advances in hyaluronic acid hydrogels for biomedical applications. Current opinion in biotechnology. 2016 Aug; 40: 35-40.

26. Keegan Bradley C. Synthesis and Characterization of Methacrylated Hyaluronan-Based Hydrogels for Tissue Engineering. University of Tennessee Health Science Center; 2014.

27. Cui N, Qian J, Liu T, Zhao N, Wang H. Hyaluronic acid hydrogel scaffolds with a triple degradation behavior for bone tissue engineering. Carbohydrate Polymers. 2015 1 August; 126(1879-1344): 192-8.

28. Manokawinchoke J, Nattasit P, Thongngam T, Pavasant P, Tompkins KA, Egusa H, et al. Indirect immobilized Jagged1 suppresses cell cycle progression and induces odonto/osteogenic differentiation in human dental pulp cells. Scientific Reports. 2017; 7(1): 10124.

29. Czekanska EM, Stoddart MJ, Ralphs JR, Richards RG, Hayes JS. A phenotypic comparison of osteoblast cell lines versus human primary osteoblasts for biomaterials testing. Journal of Biomedical Materials Research Part A. 2014 1 August; 102(8): 2636-43.

30. Luckanagul J, Lee LA, Nguyen QL, Sitasuwan P, Yang X, Shazly T, et al. Porous Alginate Hydrogel Functionalized with Virus as Three-Dimensional Scaffolds for Bone Differentiation. *Biomacromolecules*. 2012 10 Dec; 13(12): 3949-58.
31. Pritchard CD, O'Shea T, Siegwart D. An injectable thiol-acrylate poly(ethylene glycol) hydrogel for sustained release of methylprednisolone sodium succinate. *Biomaterials*. 2011 January; 32(2): 587-97.
32. Czekanska EM. Assessment of cell proliferation with resazurin-based fluorescent dye. *Methods in molecular biology*. 2011; 740: 27-32.
33. Castillo Diaz LA, Saiani A, Gough JE, Miller AF. Human osteoblasts within soft peptide hydrogels promote mineralisation in vitro. *Journal of tissue engineering*. 2014 2 Jul; 5(2041-7314).
34. Terada M, Inaba M, Yano Y, Hasuma T, Nishizawa Y, Morii H, et al. Growth-inhibitory effect of a high glucose concentration on osteoblast-like cells. *Bone*. 1998 January; 22(1): 17-23.
35. Luckanagul JA, Lee L, You S, Yang X, Wang Q. Plant virus incorporated hydrogels as scaffolds for tissue engineering possess low immunogenicity in vivo. *Journal of biomedical materials research Part A*. 2015 March; 103(3): 887-95.
36. Sitasuwan P, Lee LA, Li K, Nguyen HG, Wang Q. RGD-conjugated rod-like viral nanoparticles on 2D scaffold improve bone differentiation of mesenchymal stem cells. *Frontiers in Chemistry*. 2014 27 May; 2: 31.
37. Vandrovcova M, Bacakova L. Adhesion, growth and differentiation of osteoblasts on surface-modified materials developed for bone implants. *Physiological research*. 2011; 60(3): 403-17.
38. Tavsanlı B, Okay O. Mechanically strong hyaluronic acid hydrogels with an interpenetrating network structure. *European Polymer Journal*. 2017 1 July; 94: 185-95.
39. Cunha JS, Ferreira V, Maquigussa E, Naves M, Boim MA. Effects of high glucose and high insulin concentrations on osteoblast function in vitro. *Cell and tissue research*. 2014 October; 358(1): 249-56.

40. Zayzafoon M, Botolin S, McCabe LR. P38 and activating transcription factor-2 involvement in osteoblast osmotic response to elevated extracellular glucose. *The Journal of biological chemistry*. 2002 4 October; 277(40): 37212-8.



ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	ทันตแพทย์หญิงขวัญหทัย อาริวิจิตร
วัน เดือน ปี เกิด	19 สิงหาคม พ.ศ. 2532
สถานที่เกิด	อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี
วุฒิการศึกษา	พ.ศ. 2556 ระดับปริญญาตรี ทันตแพทยศาสตรบัณฑิต (ท.บ.) (เกียรตินิยมอันดับ 1) จากมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ พ.ศ. 2562 กำลังศึกษาระดับปริญญาโท วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (วท.ม.) มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่อยู่ปัจจุบัน เลขที่ 167/75 หมู่บ้านริมทะเล หมู่ 3 ถนนพระยาสุรเสนา ตำบลเสม็ด อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี 20000