

ความเข้ากันได้ทางชีวภาพของเมทาคริลเลตไฮยาโลโรนิกไฮโดรเจล ในเซลล์กระดูกเข้าฟันมนุษย์

บวญทกัย อารีวิจิตร* นิสดา ธเนศวร** จิตติมา ลักนากุล*** สรสิทธิ์ รัชสิยานนท์*

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์: เพื่อศึกษาความเข้ากันได้ทางชีวภาพของเมทาคริลเลตไฮยาโลโรนิกไฮโดรเจล (methacrylated hyaluronic acid hydrogel) ในเซลล์กระดูกเข้าฟันมนุษย์ (Human alveolar bone cells)

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ: สังเคราะห์ไฮโดรเจลชนิดเมทาคริลเลตไฮยาโลโรนิกไฮโดรเจลแล้วเพาะเลี้ยงร่วมกับเซลล์กระดูกเข้าฟันมนุษย์จากผู้ป่วย 3 ราย ที่ตรวจสอบคุณลักษณะของเซลล์โดยการแสดงออกของยีนที่เป็นตัวบ่งชี้ของเซลล์สร้างกระดูก ทดสอบระดับปฏิกิริยาอัลคาไลน์ฟอสฟาเตสและการสะสมแร่ธาตุในแมทริกซ์ระหว่างเซลล์ เพื่อทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพโดยประเมินลักษณะรูปร่าง ความสามารถในการยึดเกาะและการเจริญเติบโตของเซลล์

ผลการทดลอง: เซลล์จากเนื้อเยื่อกระดูกของผู้ป่วยทั้ง 3 ราย มีการแสดงออกถึงการเป็นเซลล์สร้างกระดูกโดยมีการแสดงออกของยีนบ่งชี้เซลล์สร้างกระดูก ได้แก่ COL-1, Runx2 และ OCN ตอบสนองต่อการทดสอบระดับปฏิกิริยาอัลคาไลน์ฟอสฟาเตส และมีการสะสมแร่ธาตุในแมทริกซ์ระหว่างเซลล์ที่ติดสีเข้มมากขึ้นเมื่อติดตามผลในวันที่ 0, 7, 14, 21, 28 ตามลำดับ ในการทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพ พบว่าเซลล์สามารถยึดเกาะบนเมทาคริลเลตไฮยาโลโรนิกไฮโดรเจลได้ในเวลา 24 ชั่วโมง และสามารถเพิ่มจำนวนได้โดยมีค่าเฉลี่ยอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ในวันที่ 14 เทียบกับวันที่ 1 เท่ากับ 1.44 ± 0.83 เท่า, 2.53 ± 1.58 เท่า และ 2.16 ± 0.50 เท่า ในเซลล์ไลน์ที่ 1, 2 และ 3 ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างจากกลุ่มที่เลี้ยงบนจานเพาะเลี้ยงเซลล์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

สรุป: ไฮโดรเจลชนิดเมทาคริลเลตไฮยาโลโรนิกไฮโดรเจลที่สังเคราะห์ขึ้น มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพกับเซลล์กระดูกเข้าฟันมนุษย์ โดยเมื่อเซลล์มีการยึดเกาะบนพื้นผิวของเมทาคริลเลตไฮยาโลโรนิกไฮโดรเจลแล้วยังสามารถมีการเจริญเติบโตต่อไปได้

คำสำคัญ: ไฮโดรเจล กรดไฮยาโลโรนิก เมทาคริลเลต เซลล์กระดูกเข้าฟันมนุษย์ ความเข้ากันได้ทางชีวภาพ

*ภาควิชาศัลยศาสตร์และเวชศาสตร์ช่องปาก คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เลขที่ 114 สุขุมวิท 23 เขตวัฒนา กรุงเทพมหานคร 10110

**ภาควิชาโสตจักษุวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เลขที่ 114 สุขุมวิท 23 เขตวัฒนา กรุงเทพมหานคร 10110

***ภาควิชาวิทยาการเภสัชกรรมและเภสัชอุตสาหกรรม คณะเภสัชศาสตร์ และหน่วยปฏิบัติการวิจัยวิศวกรรมชีววัสดุเพื่อการแพทย์และสุขภาพ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, เลขที่ 254 ถนนพญาไท แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน กรุงเทพมหานคร 10330

Biocompatibility of Methacrylated Hyaluronic Acid Hydrogel to Alveolar Bone Cells

Kwanhatai Areevijit* Nirada Dhanesuan** Jittima Amie Luckanagul*** Sorasun Rungsiyanont*

Abstract

Objective: The aim of this study was to evaluate biocompatibility of hydrogel from hyaluronic acid modified with methacrylic anhydride (MeHA) crosslinked with dithiotreitol (DTT) with human alveolar bone cells.

Materials and Methods: Methacrylated hyaluronic acid hydrogel were synthesized and cultured with 3 lines of primary alveolar bone cells that characterized by RT-PCR technique for bone marker gene expression, alkaline phosphatase assay and matrix mineralization assay. The biocompatibility was determined by resazurin cell viability assay and evaluated cell attachment and proliferation.

Results: The cells that were harvested from 3 donors displayed an osteoblast like character as they promoted the expression of bone marker genes COL-1, OCN and Runx2, responded to alkaline phosphatase assay and had an osteogenic potential revealed by alizarin red. For biocompatibility test, we found that the cell could adhere on methacrylated hyaluronic acid hydrogel (MeHA hydrogel) within 24 hours and increased by the times (Day 1, 3, 7 and 14). The average metabolic rate at day 14 compared to day 1 was 1.44 ± 0.83 times, 2.53 ± 1.58 times and 2.16 ± 0.50 times in cell lines 1, 2 and 3, respectively, which was not significantly different from those on polystyrene tissue culture plate statistically.

Conclusions: Methacrylated hyaluronic acid hydrogel is biocompatible with human alveolar bone cells. It has no negative effect on cell proliferation, when cell attach to hydrogel surface, they can grow over the time.

Keywords: Hydrogels, Hyaluronic acid, Methacrylate, Biocompatibility, Human alveolar bone cell

*Department of Oral Surgery and Oral Medicine, Faculty of Dentistry, Srinakharinwirot University, 114 Sukhumvit 23 Rd, Wattana, Bangkok 10110, Thailand.

**Department of Oral Stomatology, Faculty of Dentistry, Srinakharinwirot University, 114 Sukhumvit 23 Rd, Wattana, Bangkok 10110, Thailand.

***Department of Pharmaceutics and Industrial Pharmacy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University/ Biomaterial Engineering for Medical and Health Research Unit, Chulalongkorn University, 254 Phayathai Rd. Wang Mai, Pathumwan Bangkok 10330, Thailand.

บทนำ (Introduction)

การทดแทนฟันธรรมชาติที่ได้รับการแนะนำว่ามีประสิทธิภาพ มีอัตราความสำเร็จสูงถึงร้อยละ 95 (1) และเป็นที่ยอมรับมากขึ้นเรื่อย ๆ คือ การรักษาโดยการฝังรากฟันเทียม ซึ่งอัตราความสำเร็จของรากฟันเทียมนั้นขึ้นกับการเกิดกระดูกเชื่อมประสาน (osseointegration) โดยมีปัจจัยที่เกี่ยวข้องหลายประการ หนึ่งในปัจจัยที่สำคัญคือคุณภาพและปริมาณของกระดูกที่รองรับรากฟันเทียม ผู้ป่วยส่วนใหญ่ที่ได้รับการรักษามักมีปัญหาคความพิการของกระดูกร่วมด้วย จึงมีการศึกษาพัฒนาเกี่ยวกับวัสดุที่จะช่วยในการเสริมสร้างกระดูก เพื่อช่วยให้เกิดกระบวนการกระดูกเชื่อมประสานของรากเทียมได้รวดเร็ว และเพิ่มอัตราความสำเร็จของการรักษาโดยการฝังรากฟันเทียมให้สูงขึ้น (1,2)

งานด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อนั้นถูกศึกษาและพัฒนาอย่างต่อเนื่องโดยมีแนวโน้มที่จะพัฒนาชีววัสดุ (biomaterial) เพื่อใช้ในการเสริมกระดูกแทนการใช้วัสดุปลูกถ่ายกระดูก (3) โดยพบว่า คุณสมบัติในการเหนี่ยวนำเซลล์สร้างกระดูก (osteoinduction) โดยใช้โกรทแฟคเตอร์ (growth factor) มีความสำคัญต่อผลสำเร็จอย่างมาก เนื่องจากโกรทแฟคเตอร์เป็นปัจจัยที่สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์สร้างกระดูก (osteoprogenitor cell) เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก (osteoblast) และยังช่วยกระตุ้นเซลล์สร้างกระดูกให้เจริญเติบโต และทำงานได้ดียิ่งขึ้น โกรทแฟคเตอร์ที่ถูกนำมาใช้มีหลายชนิด 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 (3-6) ในปัจจุบันมีการศึกษาถึงประโยชน์ในทางคลินิกของการใช้โกรทแฟคเตอร์มากมาย แต่การที่จะผลิตออกมาใช้อย่างแพร่หลายในทางการค่านั้นทำได้น้อยเนื่องจากยังคงมีข้อจำกัดของการพัฒนาระบบนำส่งสาร (drug delivery system) ที่พยายามปรับปรุงให้สามารถนำส่งโกรทแฟคเตอร์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ สามารถรักษาระดับการคงอยู่และปลดปล่อยสารได้อย่างคงที่ มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพ

สามารถละลายตัวได้หมดในระยะเวลาที่เหมาะสม และใช้งานง่าย (6-8)

ระบบการขนส่งสารด้วยไฮโดรเจล (hydrogel) ถือเป็นระบบที่ได้รับความนิยม และให้ผลสำเร็จสูงในการนำส่งสารจำพวกโกรทแฟคเตอร์เนื่องจากสามารถควบคุมการปลดปล่อยสารได้ดี ซึ่งคุณสมบัตินี้ขึ้นกับลักษณะโครงสร้าง ชนิดและปริมาณสารเชื่อมโยง (Crosslinker) ไฮโดรเจลสามารถสังเคราะห์ได้จากสารหลายชนิด (6) หนึ่งในรูปแบบที่นิยมได้แก่ กรดไฮยาลูโรนิกไฮโดรเจล (hyaluronic acid hydrogel) เนื่องจากคุณสมบัติที่มีกรดไฮยาลูโรนิกเป็นองค์ประกอบหลักซึ่งมีความเข้ากันได้ทางชีวภาพสูง มีการตอบสนองโดยภูมิคุ้มกันในร่างกายต่ำ มีการสลายตัวได้ดี และสามารถเติมสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเข้าไปได้ (bioactive molecules) จึงมีการนำมาใช้งานอย่างแพร่หลาย เช่น ใช้ในการรักษาโรคเกี่ยวกับกระดูกและข้อ ใช้ในการนำส่งยา สารพันธุกรรม (DNA plasmids) เซลล์และนำส่งโกรทแฟคเตอร์หลาย ๆ ชนิด โดยเฉพาะ BMP-2 (5,6,8)

ปัจจุบันมีผู้ศึกษาวิจัยและนำไปปรับปรุงสูตรให้ดีขึ้น Maturavongsadit และคณะในปี ค.ศ. 2016 (9) และ ค.ศ. 2017 (10) ได้พัฒนาระบบนำส่งสารจากเมทาคริเลตไฮยาลูโรนิกไฮโดรเจล (methacrylated hyaluronic acid hydrogel (MeHA hydrogel)) เพื่อใช้ในการนำส่งเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์ (mesenchymal stem cells) โดยศึกษาถึงสารเชื่อมโยงชนิดต่าง ๆ ที่ใช้ในการเชื่อมต่อพอลิเมอร์ของเมทาคริเลตไฮยาลูโรนิกแอซิด (MeHA) ให้เกิดโครงสร้างแบบร่างแห โดยเปรียบเทียบกับสารเชื่อมโยงชนิดไดไธโอรีทอล (dithiotreitol crosslinked (DTT)) เนื่องจากสารเชื่อมโยงชนิดนี้สามารถก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ได้เมื่อใช้ในปริมาณมาก ส่งผลให้การปรับปรุงสูตรของระบบนำส่งสารทำได้ค่อนข้างยาก แล้วนำมาตรวจสอบคุณสมบัติทางกายภาพ และความเข้ากันได้ทางชีวภาพกับเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์ จากการศึกษาพบว่า สารเชื่อมโยงที่มีโครงสร้างและความเข้มข้นต่างกันส่งผลต่อคุณสมบัติทางกายภาพของไฮโดรเจลที่ต่างกันออกไป แต่ยังคงมีโครงสร้างและคุณสมบัติทางกายภาพ

ที่เหมาะสม เมทาคริลเลตไฮยาลูโรนิกไฮโดรเจลที่เชื่อมโยงโดยใช้สารโคโรนาออร์โธโทลัน มีระดับการมีชีวิตอยู่ของเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์มากกว่าร้อยละ 70 และมีระดับการมีชีวิตอยู่ของเซลล์นานที่สุดเมื่อเทียบกับสารเชื่อมโยงกลุ่มอื่น

เพื่อการพัฒนากระบวนการขนส่งสารชนิดเมทาคริลเลตไฮยาลูโรนิกไฮโดรเจลให้เหมาะสมต่อการใช้งานด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูกในงานทันตกรรม การศึกษาวิจัยครั้งนี้จึงนำสูตรที่ได้รับการพัฒนามาศึกษาถึงความเข้ากันได้ทางชีวภาพ (biocompatibility) กับเซลล์กระดูกเบ้าฟันมนุษย์ (human alveolar bone cells)

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ (Materials and Methods)

การเก็บเกี่ยวและเพาะเลี้ยงเซลล์

เก็บเกี่ยวและเพาะเลี้ยงเซลล์กระดูกเบ้าฟันมนุษย์ภายใต้การขออนุญาตจากคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมในการทำวิจัย คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เลขที่ DENTSWU-EC02/2561 เก็บเนื้อเยื่อกระดูกจากกระดูกขากรรไกรของผู้ป่วยที่มารับการรักษาศัลยกรรมกระดูกที่คลินิกภาควิชาศัลยศาสตร์ และเวชศาสตร์ช่องปากจำนวน 3 ราย โดยมีเกณฑ์การรับเข้าและคัดออกคือ ผู้ป่วยเพศชายหรือหญิงที่มีอายุระหว่าง 20-50 ปี มีสุขภาพแข็งแรง ปราศจากโรคประจำตัว ไม่สูบบุหรี่และดื่มแอลกอฮอล์ และมาเพื่อรับการรักษาโดยการผ่าตัดฟันกรามซี่ที่สามที่ฝังคุด หรือรับการศัลยกรรมช่องปากอื่น ๆ หากบริเวณกระดูกที่เก็บเกี่ยวมีการอักเสบหรือติดเชื้อจะไม่รวมเข้ากับการวิจัยในครั้งนี้ โดยระบุชื่อเซลล์แต่ละไลน์ในการทดลองเป็นเซลล์กระดูกเบ้าฟัน (alveolar bone cell; AB) 1, 2 และ 3 ตามลำดับ

เพาะเลี้ยงเซลล์โดยล้างชิ้นกระดูกด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลิน (phosphate buffered saline; PBS) แล้วตัดให้มีขนาดเล็กลง (เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1-2 มิลลิเมตร) บรรจุลงจานเพาะเลี้ยงขนาด 35 มิลลิเมตร เต็มอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด 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 แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้บ่มที่คาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 ทิ้งไว้เป็นเวลา 3 วัน ก่อนทำการเปลี่ยนอาหารเพาะเลี้ยงสัปดาห์ละ 2 ครั้ง เมื่อการรวมกลุ่มของเซลล์ถึงร้อยละ 80 ทำการเปลี่ยนถ่ายเซลล์ (subculture) ลงสู่จานเพาะเลี้ยงใหม่ (11) นำเซลล์ที่ได้ในรุ่นที่ 3-8 มาใช้ในการทดลอง

การทดสอบคุณลักษณะเฉพาะของเซลล์

1. ตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการสร้างกระดูก ได้แก่ ยีน COL I, Human Runx2 และ Osteocalcin (OCN) ที่มีลำดับไพรเมอร์ (12) ดังตารางที่ 1 ด้วยวิธี reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) สกัดแยก RNA จากเซลล์ในงานเพาะเลี้ยงโดยใช้ 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 แล้วตรวจสอบการแสดงออกของยีนโดยวิธี electrophoresis บนแผ่น agarose gel ความเข้มข้นร้อยละ 1.8 (SeaKem® LE Agarose; Lonza Rockland, Inc., USA) จากนั้นจึงย้อมสีด้วย ethidium bromide แล้วอ่านผลโดยใช้เครื่อง Gel Documentation (G:Box, SYNGENE, UK)

ตารางที่ 1 ลำดับไพรเมอร์ที่ใช้ในการวัดการแสดงออกของยีน

Table 1. Primer sequences.

Gene	Primer sequences	
COL1	Forward	5' GTGCTAAAGGTGCCAATGGT 3'
	Reverse	5' ACCAGGTTCCACCGCTGTAC 3'
RUNX2	Forward	5' ATGATGACACTGCCACCTCTGA 3'
	Reverse	5' GGCTGGATAGTGCATTCGTG 3'
OCN	Forward	5' CTTTGTGTCCAAGCAGGAGG 3'
	Reverse	5' CTGAAAGCCGATGTGGTCAG 3'
GAPDH	Forward	5' TCATGGGTGTGAACCATGAGAA3'
	Reverse	5' GGCATGGACTGTGGTCATGAG 3'

2. ทดสอบระดับปฏิกิริยาอัลคาไลน์ฟอสฟาเตสของเซลล์สร้างกระดูก 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 เพาะเลี้ยงในตู้บัพที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในคาร์บอนไดออกไซด์ ร้อยละ 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 เก็บบันทึกผลโดย

เปรียบเทียบผลการทดสอบกับเซลล์ไลน์ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (NIH 3T3) ซึ่งใช้เป็นกลุ่มควบคุมเชิงลบในการศึกษาวิจัย

3. ทดสอบการสะสมแร่ธาตุในแมทริกซ์ระหว่างเซลล์ โดยการย้อมสี Alizarin red 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 ในคาร์บอนไดออกไซด์ ร้อยละ 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 แล้วตรึงเซลล์ด้วยสารละลาย

ฟอร์มาลดีไฮด์ความเข้มข้นร้อยละ 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 ขณะทำการย้อม สีควรถัดด้วยกระดาษฟอยล์เพื่อกันแสง บ่มนาน 1 ชั่วโมง บนเครื่องเขย่า เมื่อครบกำหนดเวลาจึงนำมาล้างด้วยน้ำกลั่น 5 ครั้ง (13) วางทิ้งไว้ให้แห้งแล้วนำไปบันทึกผลการทดลอง

การเตรียมสารเมทาคริเลตไฮยาลูโรนิกไฮโดรเจล

เตรียมสารเมทาคริเลตไฮยาลูโรนิกไฮโดรเจล จากกรดไฮยาลูโรนิกตามขั้นตอนของ Maturavongsadit และคณะในปี ค.ศ. 2016 (9) และค.ศ. 2017 (10) โดยนำกรดไฮยาลูโรนิกน้ำหนักโมเลกุล 47 กิโลดาลตัน ละลายในโพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (potassium phosphate buffer) สัดส่วน ร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก ในสถานะที่มีค่า pH เท่ากับ 8 แล้วหยดเมทาคริเลต แอนไฮไดรด์ (methacrylic anhydride; Sigma Aldrich, USA) สัดส่วนเชิงมวล 10:1 ของปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก ลงในสารละลายที่มีอุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส และควบคุมให้เกิดปฏิกิริยาขึ้นในช่วงอุณหภูมิ 0-4 องศาเซลเซียส เสมอ จากนั้นคอยตรวจวัดและปรับค่า pH ของสารทั้ง 2 สถานะให้มีค่าเท่ากับ 8 โดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 5 โมลาร์ และปล่อยให้ปฏิกิริยาดำเนินต่อไป 24 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปปั่นด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge) ที่ความเร็ว 10,000 รอบ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนที่ตกตะกอนออกแล้วนำไปแช่ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze-dried technique; Labconco lyophilizer, Missouri) และนำไปตรวจดูระดับการเกิดปฏิกิริยา (degree of modification) ด้วยเทคนิคโปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโคปี ($^1\text{H-NMR}$ spectroscopy)

เพื่อทดสอบความสามารถในการก่อตัวเป็นเจล ก่อนนำไปเพาะเลี้ยงเซลล์ จึงเตรียมพอลิเมอร์ของ

เมทาคริเลตไฮยาลูโรนิกแอซิด (methacrylated hyaluronic acid (MeHA)) ร้อยละ 3 โดยน้ำหนักในสารละลาย PBS ทำการปรับค่า pH ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 5 โมลาร์ ให้มีค่า pH เท่ากับ 8 แล้วนำไปครอสลิงค์โดยเติมไดไธโอเทรียออล (dithiothreitol; DTT) ในสัดส่วนโมเลกุล thiol:ene เท่ากับ 1:2 แล้วทำการวัดระยะเวลาการก่อตัวเป็นเจลด้วยวิธี vial tilting (10)

การทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพ ระหว่างเซลล์กระดูกเข้าฟันมนุษย์ และเมทาคริเลตไฮยาลูโรนิกไฮโดรเจล

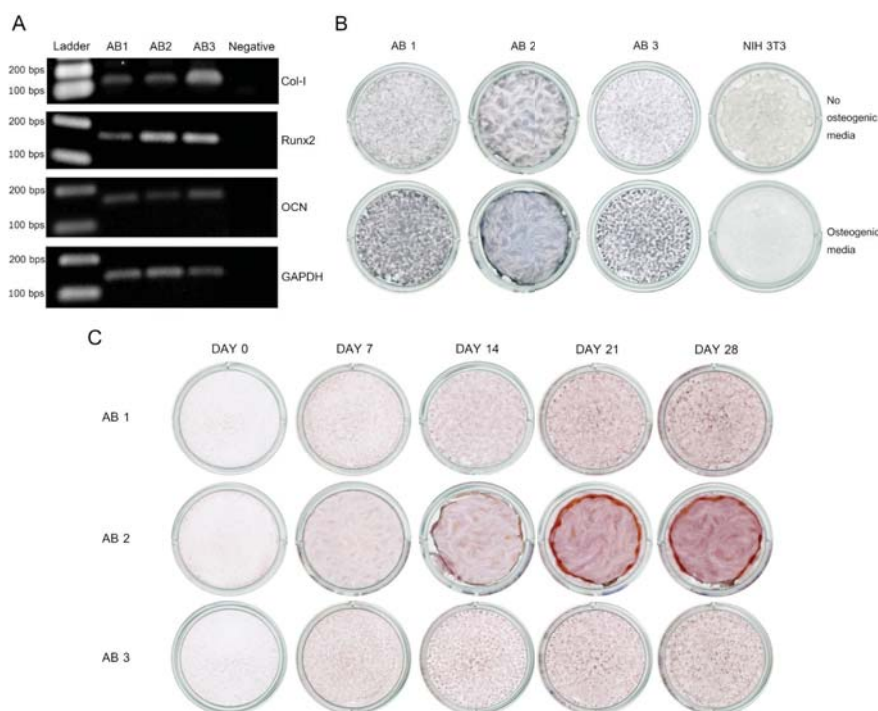
เตรียมกลุ่มตัวอย่าง (กลุ่มที่ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์บนเมทาคริเลตไฮยาลูโรนิกไฮโดรเจล (MeHA hydrogel group)) โดยชั่ง MeHA อัตราส่วนร้อยละ 3 ของปริมาณไฮโดรเจลที่ต้องการ ทำให้ปราศจากเชื้อ โดยแช่ในเอทานอลบริสุทธิ์ (absolute ethanol) นาน 15 นาที แล้วทำให้แห้งบนภาชนะที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้ว ละลายในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด 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 แล้วปรับค่า pH ให้ได้ค่า 8-9 จึงทำการครอสลิงค์ โดยเติม DTT ในสัดส่วนโมเลกุล thiol: ene 1 : 2 ปรับค่า pH ให้อยู่ในช่วง 8-9 อีกครั้ง แล้วนำลงจานเลี้ยงเซลล์ ชนิด 96 หลุม โดยใช้หลุมละ 50 ไมโครลิตร รอจนการก่อตัวเป็นเจลเกิดขึ้นเต็มที่ที่อุณหภูมิห้อง แล้วเติมอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ 100 ไมโครลิตร บ่มในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์นาน 30 นาที แล้วหว่านเซลล์ลงไปโดยแต่ละหลุม จะมีเซลล์จำนวน 2×10^4 เซลล์ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ ปริมาณ 100 ไมโครลิตร นำจานเลี้ยงเซลล์เข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในคาร์บอนไดออกไซด์ ร้อยละ 5 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์ยึดเกาะบนไฮโดรเจล จากนั้นเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก ๆ 2-3 วัน ทดสอบความมีชีวิตของเซลล์กระดูกเข้าฟันมนุษย์ในวันที่ 1, 3, 7 และ 14 ด้วยสารละลาย resazurin (PrestoBlue™ cell viability reagent, Invitrogen;

ThermoFisher Scientific) ซึ่งเตรียมในอัตราส่วน สารละลาย PrestobluTM ต่ออาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ 1 ต่อ 10 ใส่สารละลายหลุมละ 100 ไมโครลิตร นำเข้า ตู้อบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในคาร์บอนไดออกไซด์ ร้อยละ 5 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง บันทึกผลโดยวัดค่าความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescence intensity) ที่ความยาวคลื่น 560/590 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง Microplate reader (CLARIOStar, BMG Labtech, USA) และคำนวณเปรียบเทียบกับกลุ่มที่เพาะเลี้ยงบน งานเลี้ยงเซลล์ชนิดโพลิสไตรีน (polystyrene tissue culture plate; TCP group) โดยไม่มีเมทาคริเลต ไฮยาโลโรนิกไฮโดรเจล

ผลการทดลอง (Results)

การทดสอบคุณลักษณะเฉพาะของเซลล์

ในการทดสอบคุณลักษณะเฉพาะโดยวิธี RT-PCR และ Gel electrophoresis ของเซลล์กระดูกเข้าฟัน มนุษย์ (alveolar bone; AB) ที่ทำการเพาะเลี้ยงจากการเก็บเกี่ยวเนื้อเยื่อกระดูกผู้ป่วยทั้งหมด 3 คน ช่วงอายุเฉลี่ย 21 ปี พบมีการแสดงออกของยีนที่เป็น ตัวชี้วัดของเซลล์สร้างกระดูก ได้แก่ COL-I, Runx2 และ OCN (รูปที่ 1A)



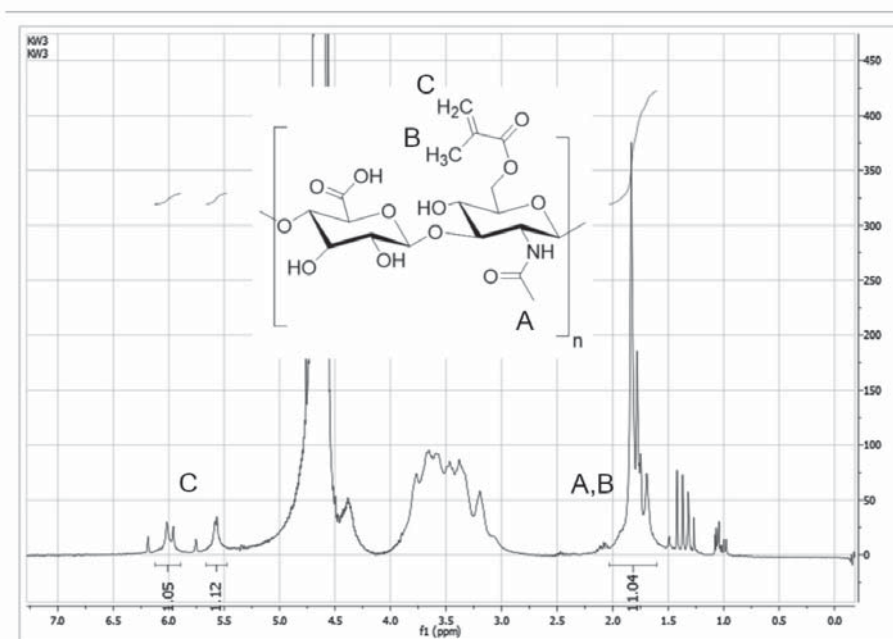
รูปที่ 1 (A) การแสดงออกของยีน COL-I, Runx2, OCN และ GAPDH ในเซลล์ AB1, 2 และ 3 เมื่อทำการทดสอบด้วยวิธี RT-PCR และทำ Gel electrophoresis, (B) ผลการทดสอบปฏิกิริยา อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส ด้วยการย้อม BCIP/NBT ในวันที่ 10 ของการเพาะเลี้ยงเซลล์, (C) การสะสมแร่ธาตุแคลเซียมในแมทริกซ์ระหว่างเซลล์ที่ย้อมด้วย Alizarin red ขณะติดตามการทดสอบในวันที่ 0, 7, 14, 21 และ 28

Fig 1. (A) Expression of COL-I, Runx2, OCN and GAPDH Gene in Harvested human alveolar bone cell (AB1, AB2 and AB3), (B) ALP activity assay stained with BCIP/NBT on day 10 of cell culture, (C) Matrix mineralized stained with Alizarin red on day 0, 7, 14, 21, 28 of osteogenic culture.

นอกจากนี้ยังตอบสนองต่อการทดสอบระดับปฏิกิริยาอัลคาไลน์ฟอสฟาเตสด้วยการย้อมสี BCIP/NBT ในวันที่ 10 ของการทดสอบ โดยมีสีน้ำเงินเข้มกว่าเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (กลุ่มที่ไม่ได้เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิดที่มีการเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างกระดูกและกลุ่มที่ทดสอบด้วยเซลล์ไฟโบรบลาส NIH 3T3 จากสัตว์ทดลองซึ่งใช้เป็นกลุ่มควบคุมเชิงลบ) (รูปที่ 1B) และมีการสะสมแร่ธาตุแคลเซียมในแมทริกซ์ระหว่างเซลล์เมื่อย้อมสีด้วย Alizarin red ขณะติดตามการทดสอบในวันที่ 0, 7, 14, 21 และ 28 พบมีการติดสีแดงเข้มและมีการรวมตัวกันเป็นจุดของแคลเซียมมากขึ้นตามลำดับ (รูปที่ 1C)

การสังเคราะห์สารเมทาคริเลตไฮยาลูโรนิกไฮโดรเจล

เมทาคริเลตไฮยาลูโรนิกแอซิดที่สังเคราะห์ได้มีค่าระดับการเกิดปฏิกิริยา (degree of modification) ของกรดไฮยาลูโรนิกมอนอเมอร์และเมทาคริเลตแอนไฮไดรด์เท่ากับร้อยละ 42.03 เมื่อนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโคปี ($^1\text{H-NMR}$ spectroscopy) (รูปที่ 2) และมีระยะเวลาการก่อตัวเป็นเจลของสารเมทาคริเลตไฮยาลูโรนิกแอซิดในสารละลาย PBS หลังจากการคอสลิงค์ด้วย DTT แล้ว ประมาณ 15-30 นาที เมื่อทดสอบโดยวิธี vial tilting



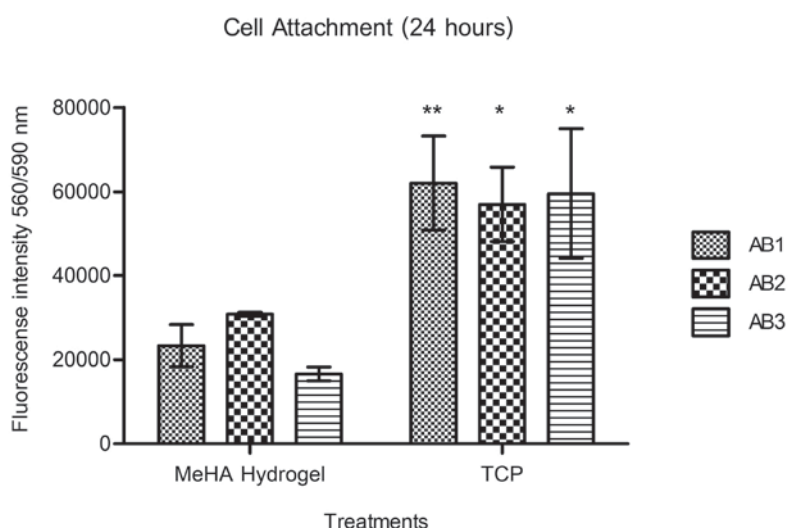
รูปที่ 2 แสดงค่าสเปกตรัมของสารที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิคโปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโคปี ($^1\text{H-NMR}$ spectroscopy) โดย (A, B) แสดงค่าสเปกตรัมของหมู่เมทิล ($-\text{CH}_3$) ที่อยู่บนโครงสร้างของกรดไฮยาลูโรนิกและเมทาคริเลตแอนไฮไดรด์ ที่ช่วง 1.6-1.9 ppm และ (C) แสดงค่าสเปกตรัมของหมู่ไวนิล ($-\text{CH}=\text{CH}_2$) ที่อยู่บนโครงสร้างของเมทาคริเลตแอนไฮไดรด์ ที่ช่วง 5.6-5.7 และ 6.1-6.2 ppm

Fig 2. $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy of methacrylated hyaluronic acid show characteristic peaks for ion exchange of methyl group ($-\text{CH}_3$) (A, B) that located around 1.6-1.9 ppm and vinyl group ($-\text{CH}=\text{CH}_2$) located around 5.6-5.7 and 6.1-6.2 ppm in hyaluronic acid and methacrylic anhydride molecule.

การทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพระหว่างเมทาคริเลตไฮยาโลโรนิกไฮโดรเจล และเซลล์กระดูกเบ้าฟันมนุษย์

โดยทั่วไปหลังจากเก็บชิ้นกระดูกจากผู้ป่วยแล้ว จะถูกนำมาเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ภายนอก ร่างกายบนจานเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิดโพลิสไตรีน (polystyrene tissue culture plate; TCP) ในลักษณะ 2 มิติ (2D) เนื่องจากต้องการทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพของสารทดสอบกับเซลล์กระดูกเบ้าฟันมนุษย์จึงใช้วิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์บนเมทาคริเลตไฮยาโลโรนิกไฮโดรเจล แล้วประเมินความเข้ากันได้ทางชีวภาพโดยประเมินความสามารถในการยึดเกาะบนสารความมีชีวิต อัตราการเจริญเติบโตจากการวัดเมแทบอลิซึม

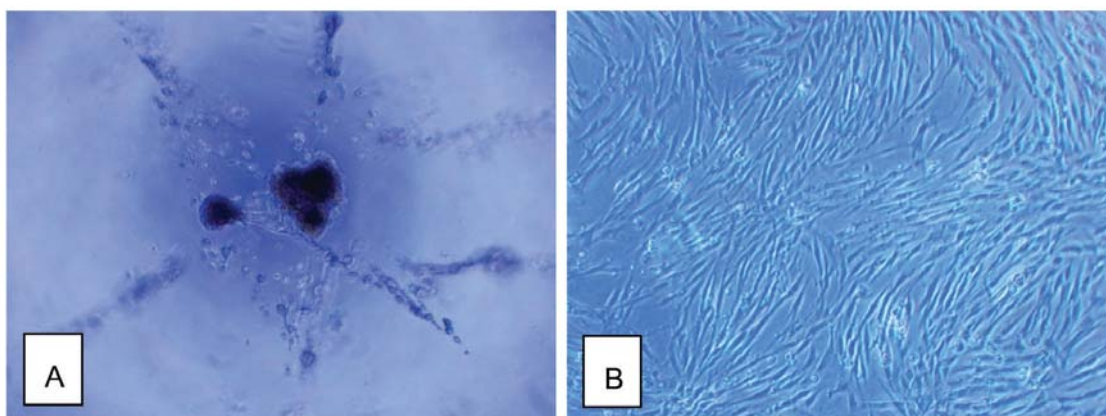
ของเซลล์ที่มีต่อสาร PrestobluTM และรูปร่างลักษณะของเซลล์ พบว่าที่ 24 ชั่วโมงเซลล์ในกลุ่มเมทาคริเลตไฮยาโลโรนิกไฮโดรเจล (MeHA hydrogel group) และกลุ่มที่เพาะเลี้ยงบนจานเพาะเลี้ยงเซลล์ (TCP group) สามารถเกิดการยึดเกาะและมีชีวิตอยู่ได้ ซึ่งกลุ่มที่เพาะเลี้ยงบนจานเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิดโพลิสไตรีนนั้น มีค่าเฉลี่ยความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่ 24 ชั่วโมงมากกว่า โดยมีความแตกต่างกันกับกลุ่มที่เพาะเลี้ยงบนเมทาคริเลตไฮยาโลโรนิกไฮโดรเจลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยเฉพาะในกลุ่มเซลล์กระดูกเบ้าฟันมนุษย์ที่ 1 (AB1) ($p < 0.01$) และกลุ่มเซลล์กระดูกเบ้าฟันมนุษย์ที่ 2 (AB2) และ 3 (AB3) ($p < 0.05$) (รูปที่ 3)



รูปที่ 3 กราฟแสดงค่าเฉลี่ยความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่วัดจากการทดสอบโดยใช้ PrestobluTM ที่ความยาวคลื่น 560/590 นาโนเมตร เพื่อประเมินการยึดเกาะของเซลล์บนสารเมทาคริเลตไฮยาโลโรนิกไฮโดรเจลที่ 24 ชั่วโมง ใช้สถิติ paired t test ที่ค่าความเชื่อมั่นที่ ** $p < 0.01$ และ * $p < 0.05$ ในการทดสอบ

Fig 3. Cell attachment in MeHA hydrogel group and TCP group at 24 hours by metabolized PrestobluTM. Values expressed are mean (n=3) \pm SD of fluorescence intensity at 560/590 nm.

Sample were compared using paired t test, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$.

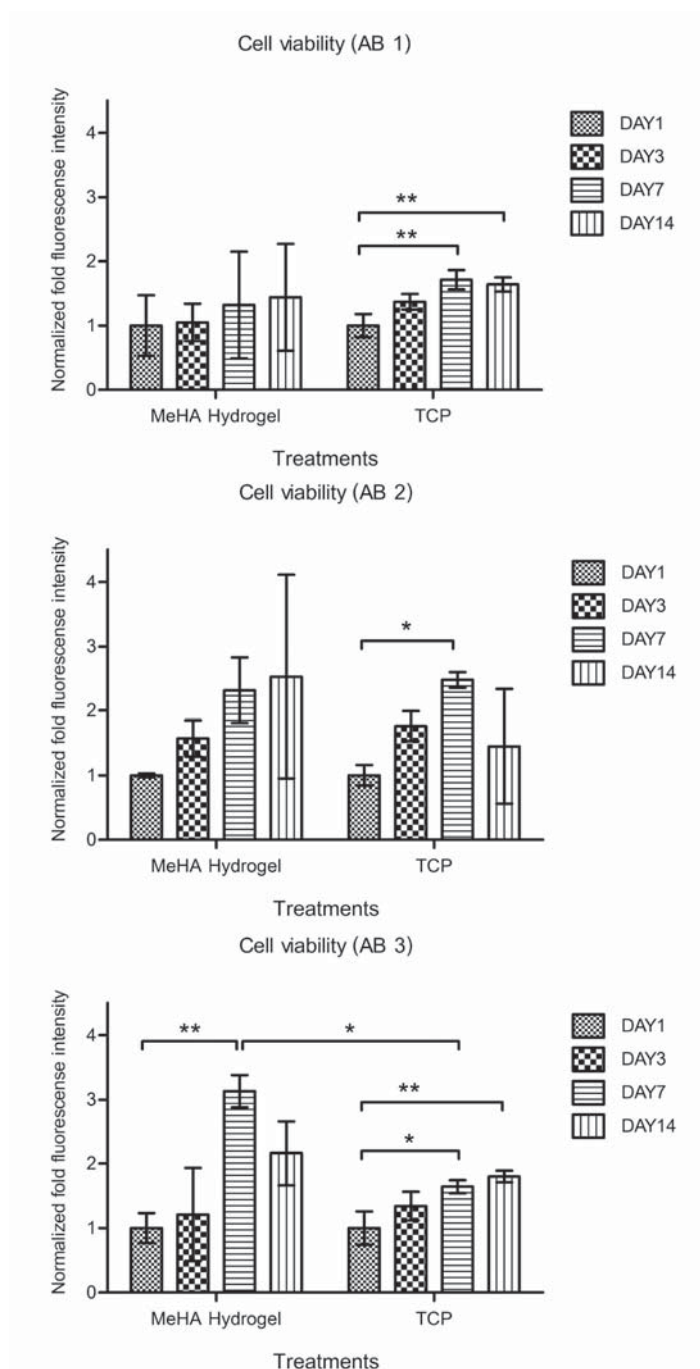


รูปที่ 4 ภาพแสดงรูปร่างเซลล์จากกล้องจุลทรรศน์หัวกลับ ที่กำลังขยาย 40 เท่า ของ
(A) เซลล์กระดูกเบ้าฟันมนุษย์ที่เลี้ยงบนเมทาคริลเลตไฮยาโลโรนิกไฮโดรเจล และ
(B) เซลล์กระดูกเบ้าฟันมนุษย์ที่เลี้ยงบนจานเพาะเลี้ยงเซลล์ (TCP) ในวันที่ 3 ของการทดลอง

Fig 4. 3 Days after cultured human alveolar bone cell on MeHA hydrogel
(A) and polystyrene tissue cultured plate (B) under inverted microscope (40x).

เมื่อติดตามดูการเพาะเลี้ยงในวันที่ 1, 3, 7 ไปจนถึงวันที่ 14 พบว่าลักษณะของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงบนเมทาคริลเลตไฮยาโลโรนิกไฮโดรเจลภายใต้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับ (inverted microscope) มีลักษณะกลม และมีการกระจุกตัวอยู่บริเวณตรงกลางของสารเป็นส่วนใหญ่ (รูป 4A) ส่วนเซลล์ที่เพาะเลี้ยงบนจานเพาะเลี้ยงเซลล์นั้นมีลักษณะรี ยาว คล้ายไฟโบรบลาสต์ (รูป 4B) เมื่อประเมินความมีชีวิตของเซลล์กระดูกเบ้าฟันมนุษย์โดยใช้ PrestobluTM เก็บข้อมูลโดยวัดค่าความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์ในวันที่ 1, 3, 7 และ 14 แล้วนำมาปรับค่า (normalized) โดยใช้ข้อมูลในวันที่ 1 เป็นบรรทัดฐาน (baseline) พบว่าเซลล์กระดูกเบ้าฟันมนุษย์ทั้ง 3 โหล่นั้น สามารถมีชีวิตอยู่และ

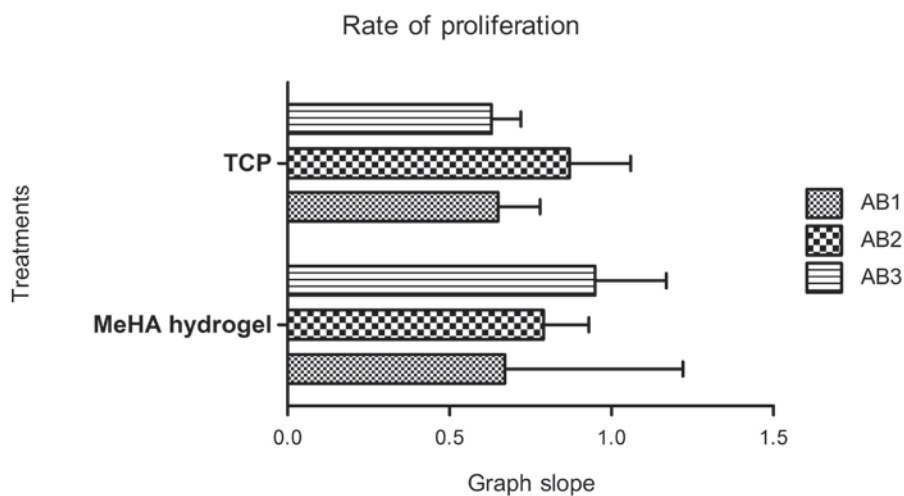
เจริญเติบโตได้บนเมทาคริลเลตไฮยาโลโรนิกไฮโดรเจล ค่าเฉลี่ยการเพิ่มจำนวนของเซลล์มีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้นจากวันที่ 1 ถึงวันที่ 14 ในทั้ง 2 กลุ่มการทดลอง โดยเฉพาะในกลุ่มที่เลี้ยงบนจานเพาะเลี้ยงเซลล์ (ค่าเฉลี่ยการเพิ่มจำนวนของเซลล์ในวันที่ 1 เทียบกับวันที่ 7 และ 14 มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่าความเชื่อมั่น $p < 0.05$ และ $p < 0.01$) ยกเว้นในเซลล์กระดูกเบ้าฟันมนุษย์โหล่นที่ 2 ของกลุ่มควบคุมที่เพาะเลี้ยงบนจานเลี้ยงเซลล์ และโหล่นที่ 3 ของกลุ่มที่เลี้ยงบนเมทาคริลเลตไฮยาโลโรนิกไฮโดรเจลที่มีการเพิ่มจำนวนเซลล์ค่อยๆ ลดลงในช่วงวันที่ 14 แต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบในวันที่ 7 กับวันที่ 14 (รูปที่ 5)



รูปที่ 5 กราฟแสดงค่า normalized fold fluorescence intensity โดยใช้ค่าของวันที่ 1 เป็นบรรทัดฐานของการประเมินความมีชีวิตของเซลล์กระดูกเข้าฟันมนุษย์ทั้ง 3 โคน ในวันที่ 1, 3, 7 และ 14 โดยใช้สถิติ one-way ANOVA และ paired t test ที่ค่าความเชื่อมั่นที่ *p < 0.05, **p < 0.01 ในการเปรียบเทียบ Fig 5. PrestobluTM metabolic activity assay of 3 human alveolar bone cells (AB) cultured on MeHA hydrogel and polystyrene tissue culture plate (TCP) in 4 different time points. Values expressed are mean (n = 3) ± SD of RFU that were normalized against Day 1 for each time point. Sample were compared using one-way ANOVA and paired t test at *p < 0.05, **p < 0.01.

เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการเพิ่มจำนวนของเซลล์ในแต่ละวันระหว่าง 2 กลุ่มการทดลอง พบว่ามีค่าเฉลี่ยไม่แตกต่างกัน เช่น ในกลุ่มที่เพาะเลี้ยงบนจานเพาะเลี้ยงเซลล์มีค่าเฉลี่ยในวันที่ 14 เทียบกับวันที่ 1 เท่ากับ 1.44 ± 0.83 เท่า, 2.53 ± 1.58 เท่า และ 2.16 ± 0.50 เท่า ในเซลล์ไลน์ที่ 1, 2 และ 3 ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างจากกลุ่มที่เพาะเลี้ยงบนจานเพาะเลี้ยงเซลล์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งมีค่าเฉลี่ย 1.64 ± 0.11 เท่า, 1.45 ± 0.89 เท่า และ 1.80 ± 0.09 เท่า ในเซลล์ไลน์ที่ 1, 2 และ 3 ตามลำดับ ยกเว้นในเซลล์กระดูกเข้าพื้นมนุษย์ไลน์ที่ 3 (AB3) วันที่ 7 ของการศึกษา มีค่าเฉลี่ยของการเพิ่มจำนวนในวันที่ 7 เทียบกับวันที่ 1 เท่ากับ 3.13 ± 0.25 เท่า พบว่ามีความแตกต่างจากกลุ่มที่เพาะเลี้ยงบนจานเพาะเลี้ยงเซลล์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.0108$) (ค่าเฉลี่ยของการเพิ่มจำนวนในวันที่ 7 เทียบกับวันที่ 1 เท่ากับ 1.64 ± 0.10) (รูปที่ 5)

ในส่วนของการประเมินอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ นำข้อมูลค่าความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่ปรับค่า (normalized) โดยใช้ข้อมูลในวันที่ 1 เป็นบรรทัดฐาน (baseline) ของตัวอย่างแต่ละหลุมมาสร้างกราฟ แล้วหาสมการของเส้นแสดงแนวโน้ม (trend line) ของข้อมูล จากนั้นหาค่าความชัน แล้วนำมาประเมินในรูปของค่าเฉลี่ย ($n = 3$) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน พบว่าเซลล์กระดูกเข้าพื้นมนุษย์ทั้ง 3 ไลน์มีอัตราการเจริญของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงบนเมทาคริลเลตไฮยาลูโรนิกไฮโดรเจลไม่แตกต่างจากกลุ่มที่เพาะเลี้ยงบนจานเพาะเลี้ยงเซลล์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่าความเชื่อมั่น $p < 0.05$ (รูปที่ 6)



รูปที่ 6 แสดงอัตราค่าเฉลี่ยของการเจริญเติบโตของเซลล์กระดูกเข้าพื้นมนุษย์ทั้ง 3 ไลน์บนเมทาคริลเลตไฮยาลูโรนิกไฮโดรเจล และจานเพาะเลี้ยงเซลล์ (TCP) โดยข้อมูลที่ใช้ได้จากการหาค่าความชันของกราฟในรูปแบบของค่าเฉลี่ย และค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน และใช้สถิติ paired t test ที่ค่าความเชื่อมั่น $p < 0.05$ ในการเปรียบเทียบ

Fig 6. Proliferation rate of 3 human alveolar bone cells culture on MeHA hydrogel and polystyrene tissue culture plate (TCP). Values expressed are mean ($n = 3$) \pm SD of RFU that were normalized against Day1 for each time point. Sample were compared using paired t test, * $p < 0.05$.

บทวิจารณ์ (Discussion)

ระบบขนส่งสารด้วยไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิก เป็นระบบที่ได้รับความนิยมและถูกนำมาศึกษาพัฒนา ในงานด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อมากขึ้น (5,6,8) เพื่อการ พัฒนาระบบนำส่งสารเพื่อใช้ในการเสริมสร้างกระดูก ในงานด้านทันตกรรม งานวิจัยครั้งนี้จึงได้นำไฮโดรเจล จากกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้รับการปรับปรุงจากการศึกษา ของ Maturavongsadit และคณะ (9,10) มาทดสอบ ความเข้ากันได้ทางชีวภาพกับเซลล์กระดูกที่ได้รับการ เก็บเกี่ยวจากกระดูกเข้าฟันมนุษย์

การเก็บเกี่ยวและเพาะเลี้ยงเซลล์จากกระดูก เข้าฟันมนุษย์โดยเก็บจากผู้ป่วยทั้งหมด 3 ราย เพศหญิง อายุเฉลี่ย 21 ปี เซลล์ที่เก็บเกี่ยวมาสามารถนำมาเพาะ เลี้ยงและเจริญเติบโตได้ แต่ลักษณะการเจริญเติบโต ค่อนข้างแตกต่างกันเมื่อติดตามดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ หัวกลับ (inverted microscope) โดยเฉพาะในด้าน อัตราเร็วของการแบ่งตัว ซึ่งอาจเกิดขึ้นจากความหลากหลายของเซลล์ปฐมภูมิ ทั้งนี้เซลล์ทั้ง 3 โล้นที่นำมาใช้ ในงานวิจัยครั้งนี้ได้ผ่านการตรวจสอบคุณลักษณะของการเป็นเซลล์กระดูกแล้ว โดยให้ผลตอบสนองต่อการ ทดสอบระดับปฏิกิริยาอัลคาไลน์ฟอสฟาเตส การทดสอบ ความสามารถในการสะสมแร่ธาตุในแมทริกซ์ระหว่าง เซลล์โดยใช้ Alizarin red และการทดสอบยีนที่เป็นตัว ชีววัดความเป็นเซลล์กระดูก ได้แก่ ยีน COL-I, Runx2 และ OCN (รูปที่ 1) ซึ่งยีนทั้ง 3 นี้มีบทบาทที่สำคัญ และการแสดงออกในแต่ละช่วงของการเจริญของเซลล์ สร้างกระดูกที่แตกต่างกันออกไป โดยยีน Runx2 เป็น จุดเริ่มต้นในการกระตุ้นเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์ ให้มีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สร้าง กระดูก ควบคุมและกระตุ้นให้เซลล์สร้างกระดูกมีการ เจริญเติบโตอย่างสมบูรณ์ พบมากในขณะที่ยังอยู่ในระยะ การเจริญสูงสุด (late maturation) ยีน COL-I เป็นยีนที่ ควบคุมการสร้างโปรตีนคอลลาเจน ซึ่งคอลลาเจนชนิดที่ 1 เป็นโปรตีนที่พบได้มากที่สุดที่เซลล์สร้างกระดูกและมีหน้าที่ช่วยเป็นโครงร่างและเสริมความแข็งแรงให้แก่ แมทริกซ์ของกระดูก และยีน OCN ที่พบได้ในช่วงของ

การสะสมแร่ธาตุในแมทริกซ์นอกเซลล์ มีความสำคัญ ต่อการจับตัวและการสะสมของไฮดรอกซีอะพาไทต์ (hydroxyapatite) ในแมทริกซ์นอกเซลล์ เป็นต้น (14-17)

ในการศึกษานี้ใช้พอลิเมอร์ของเมทาคริลเลต ไฮยาลูโรนิกแอซิด (MeHA) ที่มีร้อยละการเกิดปฏิกิริยา (degree of modification) เท่ากับ 42.03 โดยใช้ ปริมาณร้อยละ 3 ของอัตราส่วนโดยมวลต่อปริมาตร ของไฮโดรเจลทั้งหมด พบว่าสามารถก่อตัวเป็นเจลโดยใช้ DTT ที่อัตราส่วน thiol:ene เท่ากับ 1:2 ได้ง่าย และมีระยะเวลาการก่อตัวเป็นเจลที่เหมาะสมกับการใช้งาน (15-30 นาที) ซึ่งเร็วกว่าในการศึกษาของ Maturavongsadit และคณะ ขณะใช้งานเมื่อเตรียมโดยละลายในอาหาร เพาะเลี้ยงเซลล์และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ พบว่ามีระยะเวลาการก่อตัวเป็นเจล สมบูรณ์ที่ 45 - 60 นาที ซึ่งใช้เวลานานขึ้นจากการ ทดสอบโดยละลายในสารละลาย PBS ความแตกต่างนี้อาจเป็นผลจากสัดส่วนโมเลกุลของ thiol:ene ที่เลือกใช้ ไม่เท่ากัน หรือเกิดจากค่าความเป็นกรด-ด่างที่เปลี่ยนไป จากผลของการใช้อาหารเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นส่วนประกอบ ซึ่งหากโดยรวมแล้วมีค่าความเป็นกรด-ด่างที่ต่ำลง จะส่งผลต่อระยะเวลาการก่อตัวเป็นเจลที่นานมากขึ้น (9,18)

การทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพของ เมทาคริลเลตไฮยาลูโรนิกไฮโดรเจล และเซลล์กระดูก เข้าฟันมนุษย์ ประเมินโดยดูจากความสามารถในการ ยึดเกาะและเจริญเติบโตของเซลล์เมื่อเพาะเลี้ยงบน ไฮโดรเจลในวันที่ 1, 3, 7 และ 14 เปรียบเทียบกับกลุ่ม ที่เพาะเลี้ยงในลักษณะ 2 มิติ บนจานเพาะเลี้ยงเซลล์ (polystyrene tissue culture plate) โดยดูจากเมแทบอลิซึม (metabolism) ของเซลล์ต่อสาร resazurin (Prestoblate™) ซึ่งวัดเป็นค่าความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่ 560/590 นาโนเมตร พบว่าที่ 24 ชั่วโมง อัตราการยึดเกาะของ เซลล์ในกลุ่มที่เพาะเลี้ยงบนเมทาคริลเลตไฮยาลูโรนิก ไฮโดรเจลด้อยกว่าในกลุ่มที่เลี้ยงบนจานเพาะเลี้ยง เซลล์อย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 3) โดยหลังจากทำการ หวานเซลล์ลงบนไฮโดรเจลที่ก่อตัวเป็นเจลและอิมมูบ์ แล้ว พบว่ามีลักษณะการกระจายตัวปกติ คือกระจาย

บนผิวของสารโดยทั่วบริเวณ แต่เมื่อติดตามดูที่เวลา 24 ชั่วโมงพบลักษณะของเซลล์เป็นกลุ่ม กระจุกบริเวณกึ่งกลางของวัสดุ (รูปที่ 4A) อาจเกิดจากเซลล์สามารถยึดเกาะบนพื้นผิวของเมทาคริลเลตไฮยาโลโรนิกไฮโดรเจลได้อย่างช้า ๆ เมื่อเวลาผ่านไปไฮโดรเจลสามารถดูดน้ำและเกิดการบวมน้ำขึ้น ทำให้ลักษณะของไฮโดรเจลหลังจากก่อตัวเป็นเจลในงานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 96 หลุมนั้น มีลักษณะเป็นแอ่งเว้า ซึ่งมีจุดลึกสุดอยู่บริเวณกลางจานเพาะเลี้ยง เซลล์กระดูกเบ้าฟันมนุษย์ที่เพาะเลี้ยงจึงกระจุกตัวอยู่บริเวณกึ่งกลางสาร โดยระบบขนส่งสารชนิดไฮโดรเจลนั้นถูกพัฒนาขึ้นเพื่อให้สามารถขนส่งสารและเพาะเลี้ยงเซลล์ได้ในลักษณะ 3 มิติ พบมีความเหมาะสมต่อเซลล์หลายชนิดเมื่อนำส่งเซลล์โดยการผสมเซลล์เข้ากับไฮโดรเจล (encapsulated) เช่น เซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์ เซลล์สร้างกระดูกเป็นต้น (9,10,19) อุปสรรคที่พบในงานวิจัยอย่างหนึ่งคือเมทาคริลเลตไฮยาโลโรนิกไฮโดรเจล เป็นสารลักษณะเจลกึ่งแข็งที่มีความสามารถอุ้มน้ำได้ดี มีขนาดรูพรุนที่เหมาะสมต่อการแลกเปลี่ยนสาร ดังนั้นจะยังมีสารคงค้างอยู่ใน ไม่สามารถดูดเก็บสาร PrestobluTM ที่ผ่านการสันดาปจากเซลล์แล้วนำมาวัดค่าความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์ได้หมด เมื่อเทียบกับกลุ่มที่เพาะเลี้ยงบนจานเพาะเลี้ยงเซลล์ ทำให้ผลที่ได้ อาจไม่สามารถบอกถึงการยึดเกาะของเซลล์กระดูกเบ้าฟันมนุษย์บนไฮโดรเจลได้อย่างแท้จริง อีกประเด็นวิเคราะห์คือพื้นเจlnั้นมีลักษณะอ่อนนุ่ม และไม่เรียบเท่ากับพื้นผิวของจานเพาะเลี้ยงเซลล์ (TCP) จึงไม่สามารถนำมาเปรียบเทียบโดยตรงได้กับการยึดเกาะบนจานเลี้ยงเซลล์แบบ 2 มิติ ระยะเวลาของการยึดเกาะของเซลล์กระดูกนั้นขึ้นกับหลายปัจจัย เช่น ลักษณะพื้นผิว ความขรุขระ และสารเคมีที่ใช้ปรับปรุงพื้นผิวเพื่อเอื้อต่อการยึดเกาะของเซลล์ ซึ่งอาจนำไปใช้ในการพัฒนาสูตรของระบบนำส่งสารชนิดเมทาคริลเลตไฮยาโลโรนิกไฮโดรเจลต่อไปโดยการเติมสารที่ช่วยให้โปรตีนตัวรับ (receptor) บนเซลล์สามารถจับกับพื้นผิวของสารได้ดีขึ้น เช่น กรดอะมิโน Arg-Gly-Asp (RGD) หรือ lysine-arginine-serine-arginine (KRSR) เป็นต้น (19-21)

เมื่อติดตามผลต่อเนื่องตั้งแต่วันที่ 1, 3, 7 จนถึงวันที่ 14 พบว่าเซลล์กระดูกเบ้าฟันมนุษย์ทั้ง 3 โលนสามารถมีชีวิตอยู่และมีการเพิ่มจำนวนบนเมทาคริลเลตไฮยาโลโรนิกไฮโดรเจลได้ (รูปที่ 5) โดยมีลักษณะรูปร่างของเซลล์เป็นทรงกลม (รูปที่ 4A) ไม่แผ่ขยายเป็นรูปเรียวยาวคล้ายเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (รูปที่ 4B) เหมือนในกลุ่มที่เพาะเลี้ยงบนจานเพาะเลี้ยงเซลล์ อัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ทั้ง 2 กลุ่มนั้นไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 6) ซึ่งแสดงว่าเมทาคริลเลตไฮยาโลโรนิกไฮโดรเจลรูปแบบชนิดนี้ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ในแง่การของเจริญเติบโต โดยเซลล์สามารถเจริญเติบโตได้ดีเทียบเท่ากับการเพาะเลี้ยงบนจานเพาะเลี้ยงเซลล์ (TCP) จากการศึกษาโดยวัดอัตราเมแทบอลิซึมของเซลล์ (metabolic rate) ที่เพิ่มขึ้นในช่วงเวลาต่าง ๆ กัน แม้ว่าอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์แต่ละโលนนั้นไม่เท่ากัน เช่น ในเซลล์ในโលนที่ 1 มีอัตราการเจริญช้ากว่าเมื่อเทียบกับโលนที่ 2 หรือ 3 และเซลล์ในโលนที่ 3 มีอัตราการเจริญได้ดีขึ้นเมื่อเพาะเลี้ยงบนเมทาคริลเลตไฮยาโลโรนิกไฮโดรเจล (รูปที่ 6) ซึ่งอาจเกิดจากผลของการใช้เซลล์ปฐมภูมิซึ่งจะมีความหลากหลายของการแสดงออกของเซลล์จากผู้บริจาคที่แตกต่างกันไป ระบบขนส่งสารชนิดไฮโดรเจลที่นำมาใช้ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูกนั้นมีการพัฒนาในหลายสูตร Castillo Diaz LA และคณะ (22) ศึกษาการปรับปรุงไฮโดรเจลโดยใช้สายโปรตีนชนิด FEFEFKFK ในหลายความเข้มข้นเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์และพัฒนาคุณสมบัติเพื่อให้เหมาะสมต่อเซลล์กระดูกมนุษย์ ในการทดสอบความมีชีวิตของเซลล์โดยการทำ live/ dead assay พบว่าลักษณะเจลที่อ่อนนุ่มเกินไปจะมีอัตราการรอดของเซลล์น้อย ลักษณะของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงเมื่อเวลาผ่านไป 14 วันพบว่าเซลล์ยังคงมีลักษณะรูปร่างกลมหรือลูกบาศก์ ไม่มีลักษณะเรียวยาวคล้ายเซลล์ไฟโบรบลาสต์เหมือนการเพาะเลี้ยง 2 มิติ บนจานเพาะเลี้ยงเซลล์ ซึ่งคล้ายกับลักษณะเซลล์กระดูกที่อยู่ในกระดูกตามธรรมชาติ ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาวิจัยในครั้งนี้

บทสรุป (Conclusion)

ไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกในรูปแบบชนิดที่ดัดแปลงแล้วนี้เป็นระบบนำส่งสารรูปแบบ 3 มิติ ที่มีความเหมาะสม สามารถเป็นโครงข่ายที่รองรับการเพาะเลี้ยงเซลล์ได้ใกล้เคียงกับสภาวะธรรมชาติ และมีความเข้ากันได้ทางชีวภาพต่อเซลล์กระดูกเข้าพื้นมนุษย์ โดยเมื่อเซลล์มีการยึดเกาะบนพื้นผิวของเมทาคริเลตไฮยาลูโรนิกไฮโดรเจลแล้วยังสามารถมีการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนต่อไปได้ ในการศึกษาครั้งต่อไปอาจเพิ่มเติมการทดสอบคุณสมบัติด้านการทำงานของเซลล์ เช่น ความสามารถในการสร้างเนื้อเยื่อกระดูก ปฏิกริยาอัลคาไลน์ฟอสฟาเตส หรือการเปลี่ยนแปลงไปของยีนเป็นต้น และทดลองร่วมกับการนำส่งโกรทแฟคเตอร์เพื่อพัฒนาเป็นระบบนำส่งสารที่เหมาะสมในการใช้งานด้านวิศวกรรมกระดูกในทางทันตกรรมได้ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement)

ได้รับทุนสนับสนุนจากทันตแพทยสมาคมแห่งประเทศไทย ในพระบรมราชูปถัมภ์ และทุนวิจัยเงินรายได้คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ปี 2561

เอกสารอ้างอิง (References)

1. Gaviria L, Salcido JP, Guda T, Ong JL. Current trends in dental implants. *Korean Assoc Oral Maxillofac Surg.* 2014;40(2):50–60.
2. Venkataraman N, Bansal S, Bansal P, Narayan S. Dynamics of bone graft healing around implants. *J Int Clin Dent Res Organ.* 2015;7(3):40-47.
3. Lo KW-H, Ulerly BD, Ashe KM, Laurencin CT. Studies of bone morphogenetic protein-based surgical repair. *Adv Drug Deliv Rev.* 2012;64(12):1277–91.
4. Abou Neel EA, Chrzanowski W, Salih VM, Kim HW, Knowles JC. Tissue engineering in dentistry. *J Dent.* 2014;42(8):915–28.

5. Amini AR, Laurencin CT, Nukavarapu SP. Bone Tissue Engineering: recent advances and challenges. *Crit Rev Biomed Eng.* 2012;40(5): 363–408.

6. Vo TN, Kasper FK, Mikos AG. Strategies for Controlled Delivery of Growth Factors and Cells for Bone Regeneration. *Adv Drug Deliv Rev.* 2012;64(12):1292-309.

7. Bhakta G, Rai B, Lim ZX., Hui JH, Stein GS, van Wijnen AJ, et al. Hyaluronic acid-based hydrogels functionalized with heparin that support controlled release of bioactive BMP-2. *Biomaterials.* 2012;33(26):6113–22.

8. Martínez-Sanz E, Ossipov DA, Hilborn J, Larsson S, Jonsson KB, Varghese OP. Bone reservoir: Injectable hyaluronic acid hydrogel for minimal invasive bone augmentation. *J Control Release.* 2011;152(2):232-40.

9. 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.

10. Maturavongsadit P, Bi X, Metavarayuth K, Luckanagul JA, Wang Q. Influence of Cross-Linkers on the in Vitro Chondrogenesis of Mesenchymal Stem Cells in Hyaluronic Acid Hydrogels. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2017;9(4):3318-29.

11. 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 Mar 25;9(3):e92969. doi: 10.1371/journal.pone.0092969.

12. Manokawinchoke J, Nattasit P, Thongngam T, Pavasant P, Tompkins K, Egusa H, et al. Indirect immobilized Jagged1 suppresses cell cycle progression and induces odonto/osteogenic differentiation in human dental pulp cells. *Sci Rep.* 2017;7(1):10124 doi:10.1038/s41598-017-10638-x.

13. Czekanska EM, Stoddart MJ, Ralphs JR, Richards RG, Hayes JS. A phenotypic comparison of osteoblast cell lines versus human primary osteoblasts for biomaterials testing. *J Biomed Mater Res A.* 2014;102(8):2636–43.

14. 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-Verlag; 2012. p.29-57.

15. Patti A, Gennari L, Merlotti D, Dotta F, Nuti R. Endocrine Actions of Osteocalcin. *Int J Endocrinol.* 2013;2013:846480. doi: 10.1155/2013/846480.

16. Huang W, Yang S, Shao J, Li YP. Signaling and transcriptional regulation in osteoblast commitment and differentiation. *Front Biosci.* 2007 May 1;12:3068-92.

17. Rutkovskiy A, Stenslkken KO, Vaage IJ. Osteoblast Differentiation at a Glance. *Med Sci Monit Basic Res.* 2016;22:95–106.

18. Pritchard CD, O'Shea Tm, Siegart DJ, Calo E, Anderson DG, Reynolds FM, et al. An injectable thiol-acrylate poly(ethylene glycol) hydrogel for sustained release of methylprednisolone sodium succinate. *Biomaterials.* 2011;32(2):587-97.

19. Vandrovцова M, Bacakova L. Adhesion, growth and differentiation of osteoblasts on surface-modified materials developed for bone implants. *Physiol Res.* 2011;60(3):403-17.

20. Luckanagul JA, Lee LA, You S, Yang X, Wang Q. Plant virus incorporated hydrogels as scaffolds for tissue engineering possess low immunogenicity in vivo. *J Biomed Mater Res A.* 2015;103(3):887-95.

21. 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. *Front Chem.* 2014 May 27;2:31 doi:10.3389/fchem.2014.00031.

22. Castillo Diaz LA, Saiani A, Gough JE, Miller AF. Human osteoblasts within soft peptide hydrogels promote mineralisation in vitro. *J Tissue Eng.* 2014 Jul 2. doi: 10.1177/2041731414539344.

ติดต่อบทความ:

รองศาสตราจารย์ ดร. ทันตแพทย์ สรลัณห์ รังสิยานนท์
ภาควิชาศัลยศาสตร์และเวชศาสตร์ช่องปาก
คณะทันตแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ สุขุมวิท 23
แขวงคลองเตยเหนือ เขตวัฒนา กรุงเทพฯ 10110
โทรศัพท์ : 02-6495000 ต่อ 15063
อีเมลล์ : peted2000@hotmail.com

Corresponding author:

Associate Professor Dr. Sorasun Rungsiyanont
Department of Oral Surgery and Oral Medicine,
Faculty of Dentistry, Srinakharinwirot University,
Sukhumvit 23, Klongtuoey Nue, Wattana,
Bangkok 10110
Tel: +662 6495000 Ext.15063
E-mail: peted2000@hotmail.com

Received Date: Jun 13, 2019

Revised Date: Jul 18, 2019

Accepted Date: Sep 13, 2019