การศึกษาการสลายตัวของแมนนิทอล/โบวินซีรัมอัลบูมินเมตาคริเลตไฮยาลูโรนิกแอซิดไฮโดรเจลและความเข้ากันทางชีวภาพต่อเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกมนุษย์

นิรดา ธเนศวร* เบญจมาภรณ์ รังษีภาณุรัตน์ ฟ้าใส สัมมาวุฒิชัย** ศุภาพิชญ์ ฉัตรชัยสกุล** จิตติมา ลัคนากุล*** สรสัณห์ รังสิยานนท์******

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์: เพื่อศึกษาการสลายตัวของแมนนิทอล/โบวินซีรัมอัลบูมินเมตาคริเลตไฮยาลูโรนิกแอซิดไฮโดรเจล และความเข้ากันทางชีวภาพกับเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกมนุษย์

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ: สังเคราะห์เมตาคริเลตไฮยาลูโรนิกแอซิดไฮโดรเจล โดยใช้ไดไธโอธริอิทอลเป็นสารครอสลิงค์ เติมแมนนิทอลเพื่อเป็นตัวทำละลายยา และตัวเพิ่มปริมาตร เติมโบวินซีรัมอัลบูมินเพื่อเป็นตัวแทนโปรตีน ในอัตราส่วนแมนนิทอลต่อโบวินซีรัมอัลบูมินเป็น 1:1 ทำการศึกษาการสลายตัวโดยใช้เอ็นไซม์ไฮยาลูโรนิเดส ที่ความเข้มข้น 25, 50 และ 75 ยูนิต ประเมินการสลายตัวจากกรดยูโรนิกที่มีการปลดปล่อยออกมาโดยใช้การทดสอบคาร์บาโซล และทำการศึกษาความเข้ากันได้ทางชีวภาพกับเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกมนุษย์ โดยใช้เพรสโตบลูเป็นสารทดสอบความมีชีวิตของเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกมนุษย์ซึ่งเจริญเติบโตอยู่ภายในแมนนิทอล/โบวินซีรัมอัลบูมินเมตาคริเลตไฮยาลูโรนิกแอซิดไฮโดรเจลในลักษณะสามมิติ เปรียบเทียบกับในเมตาคริเลตไฮยาลูโรนิกแอซิดไฮโดรเจลดั้งเดิม

ผลการศึกษา: ในสภาวะที่มีเอ็นไซม์ไฮยาลูโรนิเดสทั้ง 3 ความเข้มข้น พบว่าแมนนิทอล/โบวินซีรัมอัลบูมิน-เมตาคริเลตไฮยาลูโรนิกแอซิดไฮโดรเจลมีการสลายตัวมากกว่าร้อยละ 70 ภายในเวลา 24 ชั่วโมงแรก และสลายตัวจนหมดภายใน 48 ชั่วโมง เซลล์สร้างเส้นใยเหงือกมนุษย์สามารถเจริญเติบโตได้ดีทั้งในเมตาคริเลตไฮยาลูโรนิกแอซิดไฮโดรเจลและในแมนนิทอล/โบวินซีรัมอัลบูมินเมตาคริเลตไฮยาลูโรนิกแอซิดไฮโดรเจลอย่างไม่แตกต่างกัน โดยเซลล์สามารถแผ่เป็นรูปกระสวย อีกทั้งมีการเจริญเติบโตของเซลล์สร้างใยเหงือกในทั้งสองสภาวะไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น $p < 0.05$

สรุป: ภายใต้สภาวะที่ได้ทำการศึกษา แมนนิทอล/โบวินซีรัมอัลบูมินเมตาคริเลตไฮยาลูโรนิกแอซิดไฮโดรเจลมีความเข้ากันได้กับเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกมนุษย์ แต่การสลายตัวที่รวดเร็วภายใน 48 ชั่วโมง จึงควรต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อปรับปรุงสูตรให้มีความคงทนและมีการย่อยสลายที่ช้าลงเพื่อความเหมาะสมต่อการใช้งานในทางคลินิกต่อไป

คำสำคัญ: เมตาคริเลตไฮยาลูโรนิกแอซิดไฮโดรเจล การสลายตัวของไฮโดรเจล เซลล์สร้างเส้นใยเหงือกมนุษย์ ความเข้ากันได้ทางชีวภาพ วิศวกรรมเนื้อเยื่อ

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

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

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

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

The Study of Mannitol/BSA MeHA Hydrogel on its Degradation Profile and Biocompatibility to Human Gingival Fibroblasts.

Nirada Dhanesuan* Benjamaporn Rungsipanurat Fasai Summawuthichai****
Supapich Chutchaisakul Jittima Luckanakul*** Sorasun Rungsiyanont******

Abstract

Objectives: To study the degradation of mannitol/bovine serum albumin methacrylate hyaluronic acid (Man/BSA MeHA) hydrogel and its biocompatibility to human gingival fibroblast.

Materials and Methods: MeHA hydrogel was synthesized using Dithiothreitol (DTT) as a crosslinking agent. Mannitol was added as a drug diluent and bulking agent whereas BSA was added as the representative of protein with 1:1 mannitol:BSA ratio. The degradation profile was investigated by adding 25, 50 and 75 U of hyaluronidase. Degradation was evaluated by the release of uronic acid from Carbazole assay. The biocompatibility test was performed using PrestoBlue™ to determine viability of human gingival fibroblast encapsulated in mannitol/BSA MeHA hydrogel compared to conventional MeHA hydrogel.

Results: In the presence of 3 doses of hyaluronidases used, the man/BSA MeHA hydrogel was degraded for over 70% within first 24 hours and completely degraded in 48 hours. Human gingival fibroblasts encapsulated in both Man/BSA MeHA hydrogel and conventional MeHA hydrogel showed normal spindle morphology. Also, there was no statistically significant difference in proliferation rate of human gingival fibroblasts encapsulated in both types of gel. ($p < 0.05$)

Conclusions: Under experimental condition, the man/BSA MeHA hydrogel showed biocompatibility to human gingival fibroblasts. However, the degradation rate was relatively fast, within 48 hours. Further study to improve the formula for more durable structure and slower degradation is required before future clinical application.

Keywords: Methacrylate hyaluronic acid hydrogel, Hydrogel degradation, Human gingival fibroblast, Biocompatibility, Tissue engineering

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

***Faculty of Dentistry, Srinakharinwirot University, 114 Sukhumvit 23, 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 Wang Mai, Pathumwan Bangkok 10330, Thailand.*

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

บทนำ (Introduction)

ในปัจจุบันงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อ (tissue engineering) ได้รับการศึกษาและพัฒนามาอย่างต่อเนื่อง มีการพัฒนาชีววัสดุ (biomaterial) เพื่อใช้ในการเสริมสร้างกระดูกแทนการใช้วัสดุปลูกถ่ายกระดูก (1) โดยพบว่าคุณสมบัติในการเหนี่ยวนำเซลล์สร้างกระดูก (osteoinduction) โดยใช้โกรทแฟคเตอร์ (growth factor) มีความสำคัญต่อผลสำเร็จของงาน เนื่องจากโกรทแฟคเตอร์เป็นปัจจัยที่สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์สร้างกระดูก (osteoprogenitor cell) เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก (osteoblast) และยังช่วยกระตุ้นเซลล์สร้างกระดูกให้เจริญเติบโต และทำงานได้ดียิ่งขึ้น (2) โกรทแฟคเตอร์ที่ถูกนำมาใช้มีหลายชนิด ทั้งชนิดที่เกี่ยวกับการสร้างหลอดเลือด ได้แก่ vascular endothelial growth factor (VEGF) และ basic fibroblast growth factor (bFGF) หรือประเภทที่ช่วยเร่งการเจริญเติบโตที่เกี่ยวข้องกับการเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างกระดูก ได้แก่ bone morphogenetic protein (BMP) transforming growth factor-b: (TGF-β) platelet-derived growth factor (PDGF) เป็นต้น อย่างไรก็ตามเปปไทด์หรือโปรตีนเหล่านี้มักมีขนาดโมเลกุลใหญ่ มีโครงสร้างที่ซับซ้อน และไม่เสถียรในเซลล์สิ่งมีชีวิต แตกต่างไปจากยาแบบดั้งเดิมที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก (3,4) จึงมีความพยายามในการพัฒนาระบบนำส่งยา (drug delivery system) ให้สามารถนำส่งโกรทแฟคเตอร์เหล่านี้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ สามารถรักษาระดับการคงอยู่และปลดปล่อยสารได้อย่างคงที่ อีกทั้งมีความเข้ากันได้ทางชีวภาพกับเนื้อเยื่อข้างเคียง สามารถละลายตัวได้หมดในระยะเวลาที่เหมาะสม รวมถึงสามารถใช้งานได้ง่ายอีกด้วย (3,5,6)

ระบบนำส่งยาด้วยไฮโดรเจล (hydrogel) เป็นระบบที่ได้รับความนิยม (7-9) และให้ผลสำเร็จได้เป็นอย่างดีเนื่องจากสามารถควบคุมการปลดปล่อยสารได้ ซึ่งคุณสมบัตินี้ส่วนหนึ่งขึ้นกับลักษณะโครงสร้าง ชนิด และปริมาณสารครอสลิงค์ (crosslinker) ที่ใช้ ไฮโดรเจลสามารถสังเคราะห์ได้จากสารหลายชนิด หนึ่งในรูปแบบที่นิยมได้แก่ ไฮยาลูโรนิกแอซิดไฮโดรเจล (hyaluronic acid hydrogel) ทั้งนี้กรดไฮยาลูโรนิกเป็นสารพื้น (ground substance) ที่สามารถพบได้ตามธรรมชาติในร่างกายในบริเวณเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue) ผิวหนัง (skin) และส่วนอื่น ๆ (10) โดยพบอยู่ภายนอกเซลล์ (extracellular matrix) มีโครงสร้างพื้นฐานเป็นไกลโคซามิโนไกลแคน (glycosaminoglycan) นอกจากนี้วิธีการนำไฮโดรเจลเข้าสู่ร่างกายด้วยการฉีดก็มีความสำคัญ เนื่องจากสามารถฉีดเข้าสู่บริเวณที่ต้องการได้โดยตรง ก่อให้เกิดความเสียหายต่อเนื้อเยื่อต่ำ สามารถควบคุมรูปร่างให้เข้ากับช่องว่างได้ด้วยสถานะของเหลว ในขณะที่ไฮโดรเจลยังเกิดการก่อตัวไม่สมบูรณ์ โดยภายหลังจากการกลายเป็นเจลโดยสมบูรณ์จะทำให้ไฮโดรเจลมีความคงตัว และคงรูปร่างอยู่ ณ ตำแหน่งที่ทำการฉีดเข้าไปได้ รวมถึงสามารถให้ออกซิเจนและสารอาหารแพร่ผ่านได้เช่นเดียวกับคุณสมบัติของเมทริกซ์นอกเซลล์ทั่วไป

Maturavongsadit และคณะ ในปี 2016 และ 2017 (11,12) ได้พัฒนาเมตาคริเลตไฮยาลูโรนิกแอซิดไฮโดรเจล (methacrylate hyaluronic acid hydrogel: MeHA hydrogel) เพื่อใช้ในการนำส่งเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์กระดูก (bone mesenchymal stem cells: BMSC) โดยศึกษาถึงสารครอสลิงค์ชนิดต่าง ๆ ที่ใช้ในการเชื่อมต่อพอลีเมอร์ของเมตาคริเลตไฮยาลูโรนิกแอซิด ผลที่ได้พบว่าเมตาคริเลตไฮยาลูโรนิกแอซิดไฮโดรเจลที่ใช้สารครอสลิงค์ชนิดไดไธโอธริอิทอล (dithiothreitol crosslinked: DTT) มีความเข้ากันได้กับเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์กระดูกมากที่สุดเมื่อเทียบกับสารครอสลิงค์กลุ่มอื่น ต่อมาได้มีการพัฒนาระบบนำส่งยาดังกล่าวโดยการเติมน้ำตาลแมนนิทอล (mannitol) และโบวินซีรัมอัลบูมอน (bovine serum albumin: BSA) ลงในมตาคริเลตไฮยาลูโรนิกแอซิดไฮโดรเจล เกิดเป็นแมนนิทอล/โบวินซีรัมอัลบูมินไฮยาลูโรนิกแอซิดโดรเจล (Man/BSA MeHA hydrogel) โดยมุ่งหวังให้แมนนิทอลทำหน้าที่เป็นตัวทำละลายยาและขึ้นรูป (diluent and bulking agent) ส่วนโบวินซีรัมอัลบูมินทำหน้าที่เป็นตัวแทนยาหรือสารออกฤทธิ์ที่ต้องการจะใช้ต่อไปในอนาคต ทั้งนี้พบว่าแมนนิทอล/โบวินซีรัมอัลบูมินไฮโดรเจลมีคุณสมบัติทางกายภาพที่ดี (physical property) และมีความเข้ากันได้กับเซลล์กระดูกเบ้าฟันมนุษย์ (13,14)

คุณสมบัติที่สำคัญประการหนึ่งของไฮโดรเจลเพื่อให้ได้มาซึ่งประโยชน์ทางการแพทย์สูงสุด ได้แก่ รูปแบบการปลดปล่อยยา อันรวมถึงระยะเวลาในการปลดปล่อยยา (สั้นหรือยาว) และลักษณะการปลดปล่อยยา (ต่อเนื่องหรือไม่ต่อเนื่อง ปล่อยเป็นจังหวะหรือปล่อยออกมาในครั้งเดียว) ที่สอดคล้องกับวัตถุประสงค์และรูปแบบการรักษาที่ต้องการ ปัจจัยหนึ่งที่จะส่งผลต่อรูปแบบการปลดปล่อยยาให้เหมาะสมได้แก่ การควบคุมการสลายตัวของโครงข่ายไฮโดรเจล โดยขนาดของรูพรุนภายในโครงตาข่ายที่เพิ่มมากขึ้นตามการสลายตัวของไฮโดรเจลจะส่งผลให้เกิดการปลดปล่อยยาออกจากไฮโดรเจล นอกจากนี้หลังจากการปลดปล่อยยาจนหมด ไฮโดรเจลควรจะมีคุณสมบัติที่เหมาะสมต่อวัตถุประสงค์ในการใช้งาน ได้แก่ สลายตัวเพื่อหลีกเลี่ยงการผ่าตัดนำออกจากร่างกายหรือยังคงอยู่โดยสามารถเติมยาเพื่อให้นำกลับมาใช้ได้ใหม่ รวมถึงควรปรับปรุงลักษณะการสลายตัวของไฮโดรเจลให้สอดคล้องกับการฟื้นฟูของเนื้อเยื่อ(15,16) จากงานวิจัยของ Maturavongsadit และคณะปี 2017 (11) ที่ศึกษาการสลายตัวของเมตาคริเลตไฮยาลูโรนิกแอซิดไฮโดรเจล ซึ่งใช้ไดไฮโอธริอิทอลเป็นสารครอสลิงค์ เมื่อถูกย่อยในเอ็นไซม์ไฮยาลูโรนิเดส 100 ยูนิต พบว่ามีการสลายตัวปลดปล่อยกรดยูโรนิกมากว่าร้อยละ 65 ในวันแรก และมีการสลายตัวจนหมดในวันที่ 2

ต่อเนื่องจากการศึกษาที่ผ่านมา แมนนิทอล/โบวินซีรัมอัลบูมินไฮโดรเจลมีความเข้ากันได้กับเซลล์กระดูกเบ้าฟันมนุษย์ (13) ทั้งนี้ภายในช่องปากกระดูกเบ้าฟันจะถูกปกคลุมอยู่ภายใต้เนื้อเยื่อเหงือก (gingival tissue) การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาระยะเวลาในการสลายตัว และความเข้ากันได้ทางชีวภาพของแมนนิทอล/โบวินซีรัมอัลบูมินไฮยาลูโรนิกแอซิดโดรเจลกับเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกมนุษย์ (human gingival fibroblast) เพื่อพัฒนาระบบนำส่งยาที่มีประสิทธิภาพสำหรับการรักษาภายในช่องปากต่อไป

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ (Materials and Methods)

งานวิจัยครั้งนี้ศึกษาโดยการเพาะเลี้ยงเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกมนุษย์ โดยผ่านการอนุมัติจากคณะกรรมการจริยธรรมสำหรับพิจารณาโครงการวิจัยที่ทำในมนุษย์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เลขที่ SWUEC-228/2562X

การเตรียมเมตาคริเลตไฮยาลูโรนิกไฮโดรเจล

เตรียมเมตาคริเลตไฮยาลูโรนิกแอซิดไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิก ตามขั้นตอนของ Maturavongsadit และคณะ ปี 2016 และ 2017 (11,12) โดยนำกรดไฮยาลูโรนิก น้ำหนักโมเลกุล 47 กิโลดาลตัน ละลายในโพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (potassium phosphate buffer) สัดส่วน ร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก ในสภาวะที่มีค่าพีเอชเท่ากับ 8 แล้วหยดเมตาคริเลตแอนไฮไดรด์ (methacrylic anhydride; Sigma-Aldrich, USA) สัดส่วนเชิงมวล 10:1 ของปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกลงในสารละลายที่มีอุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส และควบคุมให้เกิดปฏิกิริยาขึ้นในช่วงอุณหภูมิ 0-4 องศาเซลเซียส จากนั้นคอยตรวจวัดและปรับค่าพีเอชของสารทั้ง 2 สถานะให้มีค่าเท่ากับ 8 โดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 5 โมลาร์ และปล่อยให้ปฏิกิริยาดำเนินต่อไป 24 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปปั่นด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 10,000 รอบ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนที่ตกตะกอนออกแล้วนำไปแช่ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสก่อนนำไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze-dried technique: Labconco lyophilizer, Missouri) และนำไปตรวจดูระดับการเกิดปฏิกิริยา (degree of modification) ด้วยเทคนิคโปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปคโตรสโคปี (^{1}H–NMR spectroscopy)

เพื่อทดสอบความสามารถในการก่อตัวเป็นเจลก่อนนำไปเพาะเลี้ยงเซลล์ จึงเตรียมพอลิเมอร์ของเมตาคริเลตไฮยาลูโรนิกแอซิดร้อยละ 3 โดยน้ำหนักในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer:

PBS) ทำการปรับค่าพีเอชด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 5 โมลาร์ ให้มีค่าพีเอชเท่ากับ 8 แล้วนำไปครอสลิงค์โดยเติมไดไธโอธริอิทอลในสัดส่วนโมเลกุล Thiol:ene เท่ากับ 1:2 แล้วทำการวัดระยะเวลาการก่อตัวเป็นเจลด้วยวิธีการพลิกหลอด (vial tilting)

การเตรียมแมนนิทอล/โบวินซีรัมอัลบูมินเมตาคริเลตไฮยาลูโรนิกแอซิดไฮโดรเจล

แมนนิทอลและโบวินซีรัมอัลบูมิน ถูกนำมาเตรียมในอัตราส่วน 1:1 โดยเตรียมแมนนิทอล 2.5 มิลลิกรัม ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 50 ไมโครลิตร และเตรียมโบวินซีรัมอัลบูมิน 2.5 มิลลิกรัม ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 50 ไมโครลิตร ผสมแมนนิทอลและโบวินซีรัมอัลบูมินที่เตรียมไว้เข้าด้วยกัน จากนั้นนำสารละลายข้างต้นปริมาตร 46 ไมโครลิตร มาผสมกับเมตาคริเลตไฮยาลูโรนิกแอซิด 6.9 มิลลิกรัม ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 166.5 ไมโครลิตร หลังจากนั้นปรับค่าพีเอชของส่วนผสมให้เป็น 8.0 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 5 โมลาร์ ก่อนจะเติมไดไธโอธริอิทอล 17.5 ไมโครลิตรเพื่อเปลี่ยนให้เป็นเจล

การเตรียมเอ็นไซม์ไฮยาลูโรนิเดสและคาร์บาโซล

จากงานวิจัยของ Maturavongsadit และคณะ ปี 2017 (11) ได้เตรียมเอ็นไซม์ไฮยาลูโรนิเดสที่ความเข้มข้น 100 ยูนิต ซึ่งพบว่าไฮโดรเจลได้ถูกย่อยสลายทั้งหมดภายใน 2 วัน ซึ่งเป็นการย่อยสลายอย่างรวดเร็วเกินความต้องการ ในงานวิจัยครั้งนี้จึงได้ปรับลดความเข้มข้นของเอ็นไซม์ไฮยาลูโรนิเดสลงมา โดยเตรียมเอ็นไซม์ไฮยาลูโรนิเดสที่ความเข้มข้น 3 ระดับ ได้แก่ 25, 50 และ 75 ยูนิต โดยจะใช้เอ็นไซม์ปริมาณ 0.08, 0.16 และ 0.24 มิลลิกรัมตามลำดับ ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 400 ไมโครลิตร ต่อ 1 หลุม ในส่วนของ 0.125% คาร์บาโซลทำการเตรียมโดยใช้ผงคาร์บาโซล 0.0125 กรัมละลายในเอทานอลบริสุทธิ์ 10 มิลลิลิตร

การศึกษาการสลายตัวของแมนนิทอล/โบวินซีรัมอัลบูมิน เมตาคริเลตไฮยาลูโรนิกแอซิดไฮโดรเจล

เตรียมแมนนิทอล/โบวินซีรัมอัลบูมินเมตาคริเลตไฮยาลูโรนิกแอซิดไฮโดรเจล 40 ไมโครลิตร ลงในจานเลี้ยงเซลล์ขนาด 24 หลุม ตัวอย่างดังกล่าวจะถูกย่อยสลายโดยเอ็นไซม์ไฮยาลูโรนิเดสที่ความเข้มข้น 25, 50 และ 75 ยูนิต ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 400 ไมโครลิตรที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยจะเก็บสารละลายจากการทดลองทั้งหมด และเติมเอ็นไซม์ไฮยาลูโรนิเดสในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ใหม่ลงไปที่แทนที่ ณ เวลา 1, 2, 24 และ 48 ชั่วโมง เก็บสารละลายที่ได้มาทั้งหมดที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนครบเวลา 48 ชั่วโมง ทำการทดลองแบบซ้ำสอง (duplication) โดยทำการทดลอง 3 ครั้ง (3 separate experiments)

จากนั้นทำการทดสอบคาร์บาโซลเพื่อหาปริมาณกรดยูโรนิกที่ถูกปลดปล่อยออกมาขณะเกิดการสลายตัว โดยการใส่สารละลายที่เก็บมาได้ 50 ไมโครลิตรลงในหลอดเอพเพนดอร์ฟ เติมสารละลาย 25 มิลลิโมลโซเดียมเตตระโบเรต (sodium tetraborate) ในกรดซัลฟูริก ปริมาณ 200 ไมโครลิตรลงในแต่หลอด และให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และทิ้งให้เย็นตัวลงที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติม 0.125% คาร์บาโซลในเอทานอลบริสุทธิ์ 50 ไมโครลิตรลงในแต่ละหลอด และให้ความร้อนที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และทิ้งให้เย็นตัวลงที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที สารละลายจะถูกถ่ายลงในจานเลี้ยงเซลล์ขนาด 96 หลุม โดยสารใน 1 หลอดเอพเพนดอร์ฟ จะถูกแบ่งเป็น 100 ไมโครลิตร จำนวน 3 หลุม และถูกนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร (spectraaxm2 multi-mode microplate reader) ร้อยละของการสลายตัว ณ ที่เวลาแต่ละจุดจะถูกคำนวณโดยการนำจำนวนกรดยูโรนิกที่ถูกปล่อยออกมาในแต่ละช่วงเวลา หารด้วยปริมาณกรดยูโรนิกสุดท้ายหลังจากที่การสลายตัวที่สมบูรณ์

เมื่อบันทึกค่าได้นำมาเปรียบเทียบค่าความเข้มข้นที่แท้จริงกับกราฟมาตรฐานความเข้มข้นกรดไฮยาลูโรนิกต่อค่าดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร จากงานวิจัยของ Cesaretti และคณะ ในปี 2003 (17)

การเตรียมเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกมนุษย์ให้เจริญเติบโตภายใน (encapsulation) เมตาคริเลตไฮยาลูโรนิกแอซิดไฮโดรเจล และแมนนิทอล/โบวินซีรัมอัลบูมิน เมตาคริเลตไฮยาลูโรนิกแอซิดไฮโดรเจล

เซลล์สร้างเส้นใยเหงือกมนุษย์จำนวน 2 ไลน์ ได้มาจากเนื้อเยื่อที่ติดฟันถอนของผู้ป่วยที่เข้ารับบริการถอนฟันที่คลินิกศัลยศาสตร์ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ โดยได้รับความยินยอมจากผู้ป่วย (informed consent) แล้ว จากนั้นทำการตัดเนื้อเยื่อส่วนเหงือกที่ติดมากับฟันถอนให้เป็นชิ้นเล็กๆ ด้วยใบมีดปราศจากเชื้อในห้องปฏิบัติการ และทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดดีเอ็มอีเอ็ม ที่ประกอบด้วย FBS ร้อยละ 10, 200 มิลลิโมลาร์ ของแอล-กลูตามีนร้อยละ 1 และเพนนิซิลิน 10,000 ยูนิตต่อมิลลิลิตร/สเตร็ปโตไมซิน 10,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร/แอมโฟเทอริซินบี 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ร้อยละ 1 เลี้ยงเซลล์ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยมีคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 ทั้งนี้เซลล์ที่ใช้ในการทดลองนี้อยู่ในช่วง passage ที่ 3-6

เตรียมเมตาคริเลตไฮยาลูโรนิกแอซิดไฮโดรเจล โดยชั่งเมตาคริเลตไฮยาลูโรนิกแอซิดพอลิเมอร์อัตราส่วนร้อยละ 3 ของปริมาณไฮโดรเจลที่ต้องการ ทำให้ปราศจากเชื้อโดยแช่ในเอทานอลบริสุทธิ์นาน 15 นาที แล้วทำให้แห้งบนภาชนะที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อ ละลายเมตาคริเลตไฮยาลูโรนิกแอซิดพอลิเมอร์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ โดยการเติมแมนนิทอล/โบวินซีรัมอัลบูมิน (ผ่านการฆ่าเชื้อโดยการกรองผ่านตัวกรอง (sterile syringe filter) ขนาด 0.22 ไมโครเมตร) เติมในอัตราส่วนร้อยละ 1 โดยมวลต่อปริมาตรของไฮโดรเจลทั้งหมด แล้วปรับค่าพีเอชให้เท่ากับ 8 จึงทำการครอสลิงค์โดยเติม DTT ในสัดส่วนโมเลกุล thiol ต่อ ene 1:2 ปรับค่าพีเอชให้อยู่ในช่วง 8 อีกครั้ง ใส่เซลล์ความหนาแน่น $1x10^4$ เซลล์ต่อไฮโดรเจล 50 ไมโครลิตร จากนั้นใช้ปิเปตดูดสารขึ้นลงเบา ๆ เพื่อผสม แล้วใส่สารละลายไฮโดรเจลที่มีเซลล์อยู่ลงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 96 หลุม หลุมละ 50 ไมโครลิตร รอจนการก่อตัวเป็นเจลเกิดขึ้นเต็มที่ที่อุณหภูมิห้อง แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาณ 100 ไมโครลิตร นำจานเลี้ยงเซลล์เข้าตู้เลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 จากนั้นเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก ๆ 2-3 วัน และศึกษารูปร่างเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับทำการทดลองแบบซ้ำสองในแต่ละเซลล์ไลน์

การศึกษาความมีชีวิตของเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกมนุษย์ ในแมนนิทอล/โบวินซีรัมอัลบูมิน เมตาคริเลตไฮยาลูโรนิกแอซิดไฮโดรเจล เปรียบเทียบกับ เมตาคริเลตไฮยาลูโรนิกแอซิดไฮโดรเจล โดยใช้เพรสโตบลู

เตรียมเพรสโตบลู 230 ไมโครลิตร (PrestoBlue™ Cell Viability Reagent, Invitrogen, ThermoFisher Scientific) ในอาหารเลี้ยงเชื้อดีเอ็มอีเอ็ม 2,070 ไมโครลิตร อุ่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยห่อแผ่นฟอยล์เพื่อป้องกันการทำปฏิกิริยากับแสง ทั้งนี้เพรสโตบลูสามารถวัดอัตราการเกิดเมตาบอลิซึมและบ่งบอกถึงการเจริญเติบโตของเซลล์ได้ ในการศึกษาครั้งนี้ทำการทดสอบความมีชีวิตของเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกมนุษย์ทั้ง 2 ไลน์ (เอและบี) จำนวน 2 ครั้ง ครั้งแรกทดสอบในวันที่ 1, 4 และ 7 ครั้งที่สองทดสอบในวันที่ 1, 3 และ 7 โดยเตรียมในอัตราส่วนสารละลายเพรสโตบลูต่ออาหารเลี้ยงเซลล์ 1 ต่อ 10 ใส่สารละลายหลุมละ 100 ไมโครลิตรนำเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ดูดสารละลายทดสอบออก เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ 100 ไมโครลิตร กลับลงไปบนเจลเพื่อให้เซลล์ได้มีการเจริญต่อไป สำหรับอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ดูดออกมา นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 570 และ 600 นาโนเมตร

การวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลที่ได้จากการวิจัยนี้จะเสนอข้อมูลด้วยค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ทดสอบการแจกแจงปกติด้วย Shapiro-Wilk test ที่ระดับความเชื่อมั่นทางสถิติ $p < 0.05$ ในกลุ่มที่มีจะการแจกแจงปกติวิเคราะห์ผลการทดสอบโดยใช้สถิติ t-test ที่ระดับความเชื่อมั่นทางสถิติ $p < 0.05$ ส่วนในกลุ่มการแจกแจงไม่ปกติวิเคราะห์ผลการทดลองโดยใช้สถิติ Mann-Whitney U test ที่ระดับความเชื่อมั่นทางสถิติ $p < 0.05$

ผลการศึกษา (Results)

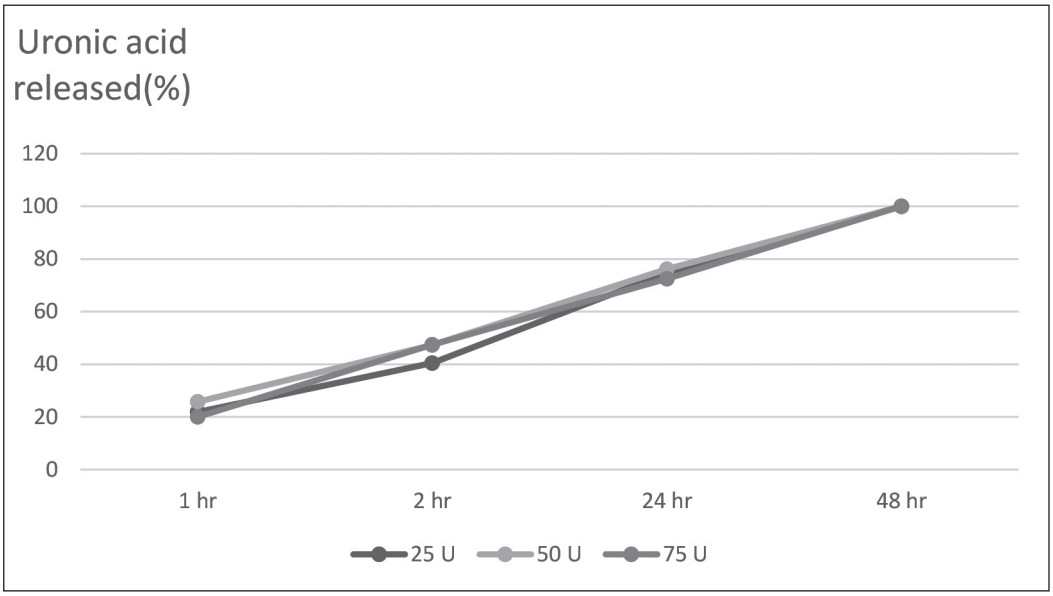
การศึกษาการสลายตัวของแมนนิทอล/โบวินซีรัมอัลบูมิน เมตาคริเลตไฮยาลูโรนิกแอซิดไฮโดรเจล

เมื่อทำการย่อยสลาย แมนนิทอล/โบวินซีรัมอัลบูมิน เมตาคริเลตไฮยาลูโรนิกแอซิดไฮโดรเจล ด้วยเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส ที่ความเข้มข้น 25, 50 และ 75 ยูนิต แล้วทำการตรวจวัดปริมาณกรดยูโรนิกที่ถูกปลดปล่อยออกมาเป็นร้อยละ ผลที่ได้ดังแสดงในตารางที่ 1 และรูปที่ 1 โดยในชั่วโมงที่ 1 และ 2 เอนไซม์ทั้ง 3 ความเข้มข้นก่อให้เกิดการปลดปล่อยกรดยูโรนิกออกมาได้ในปริมาณใกล้เคียงกัน กล่าวคือ คิดเป็นร้อยละ 21.86, 25.75 และ 20.02 สำหรับเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสความเข้มข้น 25, 50 และ 75 ยูนิต ตามลำดับในชั่วโมงแรก และ ร้อยละ 40.41, 47.28 และ 47.44 สำหรับเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสความเข้มข้น 25, 50 และ 75 ยูนิต ตามลำดับในชั่วโมงที่สอง ต่อมาในเวลา 24 ชั่วโมง กรดยูโรนิกที่ถูกปลดปล่อยออกมามีมากกว่าร้อยละ 70 ในทั้ง 3 ความเข้มข้นของเอนไซม์ โดยสามารถมองเห็นได้ด้วยตาว่าไฮโดรเจลมีขนาดเล็กลงอย่างชัดเจน และในเวลา 48 ชั่วโมงเอนไซม์ทั้ง 3 ความเข้มข้นสามารถย่อยสลายแมนนิทอล/โบวินซีรัมอัลบูมิน เมตาคริเลตไฮยาลูโรนิกแอซิดไฮโดรเจล ได้ทั้งหมด โดยไม่เหลือไฮโดรเจลอยู่ในจานเลี้ยงเซลล์เลย

ตารางที่ 1 แสดงร้อยละกรดยูโรนิกที่ถูกปล่อยออกมาในชั่วโมงที่ 1, 2, 24 และ 48 ในสภาวะที่มีเอ็นไซม์ไฮยาลูโรนิเดส ความเข้มข้น 25, 50 และ 75 ยูนิต

Table 1. Percentage of released uronic acid at 1, 2, 24 and 48 hrs respectively in the presence of 25, 50 and 75 U hyaluronidase.

Hyaluronidase (Unit)	Time (hour)	OD 550		Mean uronic acid (µg)	Mean uronic acid released (%)
		Mean	SD		
25	1	0.36	0.14	18.56	21.86
	2	0.34	0.13	15.75	40.41
	24	0.42	0.11	29.06	74.64
	48	0.38	0.15	21.53	100.00
50	1	0.38	0.09	22.19	25.75
	2	0.36	0.09	18.56	47.28
	24	0.40	0.07	24.86	76.12
	48	0.37	0.08	20.58	100.00
75	1	0.35	0.11	16.53	20.02
	2	0.38	0.09	22.64	47.44
	24	0.37	0.10	20.72	72.54
	48	0.39	0.08	22.67	100.00

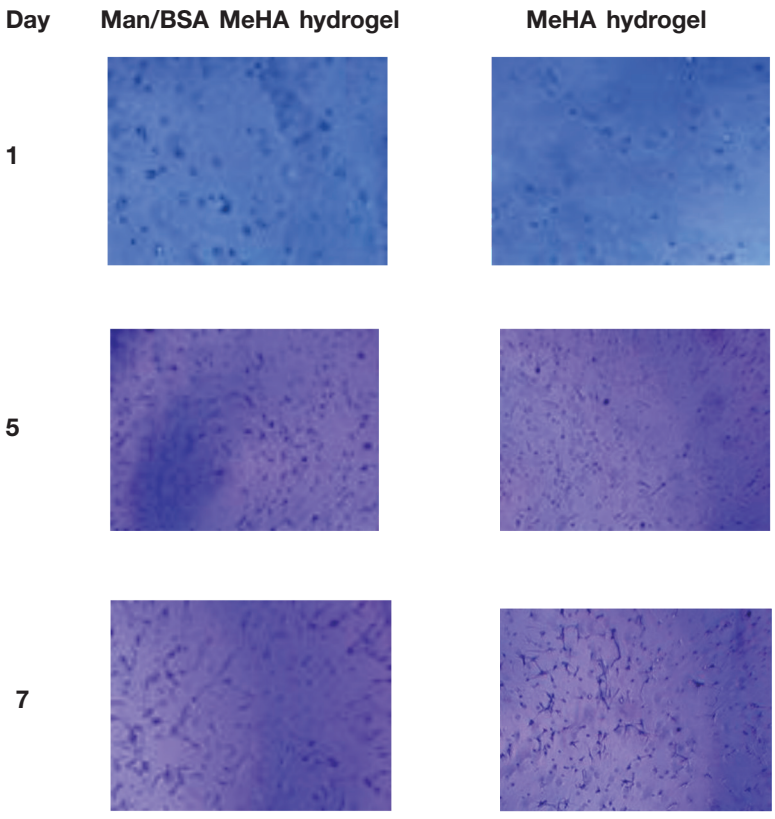


รูปที่ 1 แสดงรูปแบบการย่อยสลายของแมนนิทอล/โบวินซีรัมอัลบูมิน เมตาคริเลตไฮยาลูโรนิกแอซิดไฮโดรเจล ในเอ็นไซม์ไฮยาลูโรนิเดสความเข้มข้น 25, 50 และ 75 ยูนิต ณ ชั่วโมงที่ 1, 2, 24 และ 48

Fig 1. Degradation profile of Manitol/BSA MeHA hydrogel in 25, 50 and 75 U hyaluronidase at 1, 2, 24 and 48 hrs timepoint.

การเจริญเติบโตของเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกมนุษย์ภายในแมนนิทอล/โบวินซีรัมอัลบูมินเมตาคริเลตไฮยาลูโรนิกแอซิดไฮโดรเจล เปรียบเทียบกับ เมตาคริเลตไฮยาลูโรนิกแอซิดไฮโดรเจล

เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกมนุษย์ภายในไฮโดรเจล ทั้งแบบแมนนิทอล/โบวินซีรัมอัลบูมินเมตาคริเลตไฮยาลูโรนิกแอซิดไฮโดรเจล และเมตาคริเลตไฮยาลูโรนิกแอซิดไฮโดรเจลดั้งเดิมที่ไม่ได้เติมแมนนิทอล/โบวินซีรัมอัลบูมิน เมื่อสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับ (Inverted microscope) พบว่าเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกมนุษย์สามารถเจริญเติบโตในไฮโดรเจลทั้ง 2 ชนิดได้ไม่แตกต่างกัน โดยในช่วงแรกเซลล์จะยังมีรูปร่างกลม ในวันต่อ ๆ มาประมาณวันที่ 3 จะสามารถแผ่ออกเป็นรูปกระสวยได้ตามปกติ และมีการเพิ่มปริมาณเซลล์หนาแน่นขึ้นเมื่อเวลาผ่านไปในวันที่ 1, 5 และ 7 ดังแสดงในรูปที่ 2

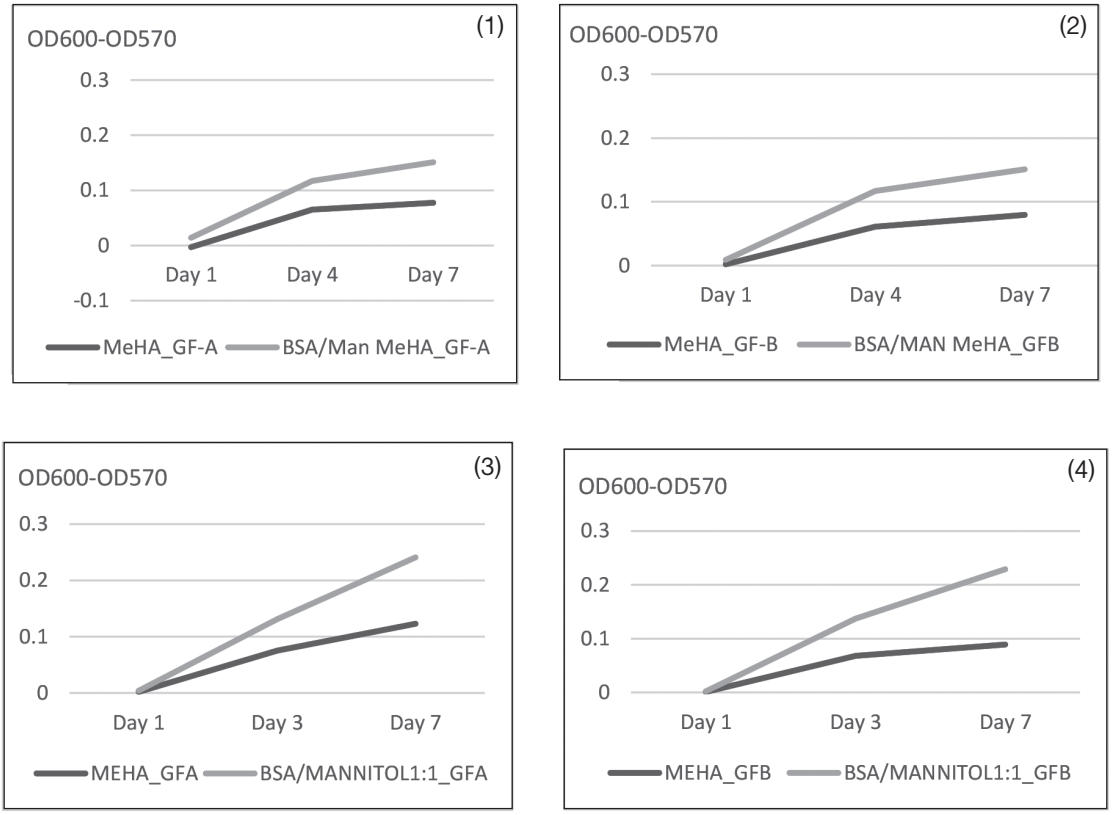


รูปที่ 2 แสดงรูปร่างเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกมนุษย์เมื่อเพาะเลี้ยงภายในแมนนิทอล/โบวินซีรัมอัลบูมิน เมตาคริเลตไฮยาลูโรนิกแอซิดไฮโดรเจล เปรียบเทียบกับเมตาคริเลตไฮยาลูโรนิกแอซิดไฮโดรเจล (กล้องจุลทรรศน์หัวกลับ กำลังขยาย x10)

Fig 2 Morphology of human gingival fibroblast encapsulated in Man/BSA MeHA hydrogel versus conventional MeHA hydrogel. (Inverted microscope x10 magnification)

การศึกษาความมีชีวิตของเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกมนุษย์ ที่เจริญเติบโตภายในแมนนิทอล/โบวินซีรัมอัลบูมินเมตาคริเลตไฮยาลูโรนิกแอซิดไฮโดรเจล เปรียบเทียบกับเมตาคริเลตไฮยาลูโรนิกแอซิดไฮโดรเจล

การศึกษาครั้งนี้ได้ทำการศึกษาในเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกมนุษย์ 2 ไลน์ (เอและบี) โดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ภายในไฮโดรเจลแล้วทำการประเมินความมีชีวิตของเซลล์ ทำการทดลอง 2 ครั้ง (Two separate experiments) จากนั้นติดตามประเมินความมีชีวิตของเซลล์ด้วยเพรสโตบลู โดยในครั้งแรกทำการประเมินในวันที่ 1, 4 และ 7 ส่วนครั้งที่ 2 ทำการประเมินในวันที่ 1, 3 และ 7 ผลที่ได้พบว่า ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างความมีชีวิตของเซลล์ไลน์เอและบี ที่เจริญเติบโตภายในแมนนิทอล/โบวินซีรัมอัลบูมินเมตาคริเลตไฮยาลูโรนิกแอซิดไฮโดรเจล เมื่อเปรียบเทียบกับเมตาคริเลตไฮยาลูโรนิกแอซิดไฮโดรเจลในทั้ง 2 ครั้งการทดลอง ดังแสดงในรูปที่ 3



รูปที่ 3 แสดงความมีชีวิตของเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกมนุษย์ (เอและบี) ภายในแมนนิทอล/โบวินซีรัมอัลบูมินเมตาคริเลตไฮยาลูโรนิกแอซิดไฮโดรเจล หรือเมตาคริเลตไฮยาลูโรนิกแอซิดไฮโดรเจล

(1) เซลล์ไลน์เอ การทดลองครั้งที่ 1 **(2) เซลล์ไลน์บี การทดลองครั้งที่ 1**

(3) เซลล์ไลน์เอ การทดลองครั้งที่ 2 **(4) เซลล์ไลน์บี การทดลองครั้งที่ 2**

Fig 3 Viability of human gingival fibroblast (Line A and B) in mannitol/BSA MeHA hydrogel in comparison to conventional MeHA hydrogel.

(1) Line A First experiment **(2) Line B First experiment**

(3) Line A Second experiment **(4) Line B Second experiment**

บทวิจารณ์ (Discussion)

กรดไฮยาลูโรนิกหรือที่เรียกว่าไฮยาลูโรแนน (hyaluronan) จัดเป็นเมทริกซ์ที่พบภายนอกเซลล์ ที่มีองค์ประกอบของไกลโคอะมิโนไกลแคน (GAG) ที่พบมากสุดในชั้นผิวหนังแท้ โดยกรดไฮยาลูโรนิกไม่ได้ถูกสร้างจากเซลล์สร้างเส้นใยของชั้นผิวหนังแท้แต่เพียงอย่างเดียว แต่ยังสร้างมาจากเซลล์เคราติโนไซต์ที่ผิวหนังชั้นนอกอีกด้วย ซึ่งผ่านการสร้างมาจากพลาสม่าเมมเบรนบาวนด์เอ็นไซม์ ส่วนเอ็นไซม์ไฮยาลูโรนิกซินเทสต์ -1, -2, และ -3 (HAS1-3) เป็นกลุ่มเอ็นไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในการดันกรดไฮยาลูโรนิกไปยังแมทริกซ์นอกเซลล์ (10) กรดไฮยาลูโรนิกจะถูกย่อยสลายด้วยเอ็นไซม์ไฮยาลูโรนิเดส (hyaluronidase) ในร่างกาย ซึ่งวงรอบผลัดเปลี่ยนของกรดไฮยาลูโรนิกมีความ

แตกต่างกันไปตามแต่ละตำแหน่งในร่างกาย ตัวอย่าง เช่น ครึ่งชีวิตของสารนี้ที่พบในผิวหนังจะมีระยะสั้น เพียงแค่หนึ่งวันหรือน้อยกว่านั้น (10) ในร่างกายมนุษย์มีเอ็นไซม์ไฮยาลูโรนิเดสอยู่ประมาณ 6 ชนิดตามที่ถูกค้นพบ ได้แก่ HYAL-1, -2, -3, -4, PH-20, และ HYALP1

การศึกษาครั้งนี้แสดงถึงความเข้ากันทางชีวภาพของของเมตาคริเลตไฮยาลูโรนิกแอซิดไฮโดรเจลทั้งชนิดที่มีหรือไม่มีแมนนิทอล/โบวินซีรัมอัลบูมิน กับเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกมนุษย์ เพิ่มเติมจากที่เคยมีรายงานความเข้ากันได้กับเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์ กระดูก และเซลล์กระดูกเบ้าฟันมนุษย์ก่อนหน้านี้ (11,13) โดยในการศึกษาครั้งนี้พบเซลล์สร้างเส้นใยเหงือมนุษย์มีรูปร่างกระสวยตามปกติ สามารถเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนภายในไฮโดรเจลทั้ง 2 ประเภทได้ไม่แตกต่างกัน จากการศึกษาที่ผ่านมาถึงพื้นผิวภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน เมื่อเปรียบเทียบกับเมตาคริเลตไฮยาลูโรนิกแอซิดไฮโดรเจลดั้งเดิม พบว่า แมนนิทอล/โบวินซีรัมอัลบูมินเมตาคริเลตไฮยาลูโรนิกแอซิดไฮโดรเจลมีลักษณะพื้นผิวที่มีความขรุขระ ไม่เป็นเนื้อเดียวกันมากขึ้น ด้วยโครงสร้างของผลึกที่มีขนาดใหญ่ขึ้น (14) อาจกล่าวได้ว่าการที่เซลล์สามารถเข้าไปอาศัยอยู่ในโครงร่างสามมิติของแมนนิทอล/โบวินซีรัมอัลบูมินเมตาคริเลตไฮยาลูโรนิกแอซิดไฮโดรเจลได้ โดยไม่พบปัญหาในเรื่องการขนส่งอาหาร ออกซิเจน รวมถึงการขับของเสียภายใต้สภาวะการทดลองนี้แต่อย่างใด

เมื่อพิจารณาในส่วนของน้ำตาลแมนนิทอลที่ได้เติมเข้าไปนั้น เคยมีรายงานความเป็นพิษของแมนนิทอลต่อเซลล์เยื่อบุผิวท่อไต (renal tubular epithelial cell) เมื่อใช้ในความเข้มข้นสูง (18) อย่างไรก็ตามแมนนิทอลมีประโยชน์ในทางการแพทย์หลากหลาย จากคุณสมบัติที่แมนนิทอลมีค่าออสโมลาริตี้สูง (hyperosmolarity) ได้มีการนำแมนนิทอลมาใช้ในการควบคุมแรงดันภายในกะโหลกศีรษะ (intracranial pressure) ที่เพิ่มขึ้นจากการบาดเจ็บที่ศีรษะ (19) นอกจากนั้นยังมีรายงานการใช้แมนนิทอลช่วยนำส่งเซลล์ต้นกำเนิด (stem cell) และโกรทแฟคเตอร์ผ่านเยื่อบุกรองกั้นระหว่างเลือดไปสู่สมอง (blood brain barrier) ได้ด้วย (20) ในส่วนของโบวินซีรัมอัลบูมิน งานวิจัยของ Liu และคณะ ปี 2014 ได้ทำการทดลองการปรับเปลี่ยนพื้นที่ผิวของไทเทเนียมนาโนทิวบ์ด้วยการใช้โบวินซีรัมอัลบูมิน พบว่าโบวินซีรัมอัลบูมินก่อให้เกิดความขรุขระของพื้นผิว และช่วยเพิ่มการยึดติดของโมเลกุลขนาดใหญ่ รวมทั้งเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกมนุษย์ได้ดียิ่งขึ้น (21) สำหรับของสารครอสลิงค์ชนิดไดไธโอธริอิทอลที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ก็ไม่พบปัญหาความเป็นพิษต่อเซลล์แต่อย่างใด อาจจะเนื่องมาจากใช้ในความเข้มข้นต่ำ เมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาที่ผ่านมาซึ่งใช้ชนิดไดไธโอธริอิทอลสูงกว่านี้ถึง 4 เท่าตัว ก็ไม่พบความเป็นพิษต่อเซลล์ต้นกำเนิดกระดูกเช่นกัน (11)

คุณสมบัติอีกประการที่สำคัญของโครงร่าง (scaffold) ในระบบนำส่งยาที่ดีคือ จะต้องย่อยสลายในเวลาที่เหมาะสม หมายความถึงเมื่อได้ทำหน้าที่ที่ตามวัตถุประสงค์เสร็จเรียบร้อยแล้ว ก็ไม่ควรคงค้างอยู่เป็นสิ่งแปลกปลอมในร่างกาย โดยทั่วไปแล้วแผลในช่องปากต้องการระยะเวลาเป็นสัปดาห์ ในการที่เซลล์สร้างเส้นใยจะเข้ามาเติมในช่องว่างของแผล และใช้เวลาประมาณ 1 เดือนในการที่เนื้อเยื่อเกี่ยวพันจะสร้างทดแทนที่ได้ (22) งานวิจัยนี้ครั้งนี้ทำการศึกษาระยะเวลาการสลายตัวของแมนนิทอล/โบวินซีรัมอัลบูมินเมตาคริเลตไฮยาลูโรนิกแอซิดไฮโดรเจล ทั้งนี้เอนไซม์ที่เป็นหลักในการย่อยสลายไฮยาลูโรนิกแอซิด ได้แก่ เอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส ซึ่งพบได้ในร่างกายมนุษย์และมีการนำมาประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์อย่างหลากหลาย (23) ยังไม่มีรายงานที่ชัดเจนเกี่ยวกับความเข้มข้นของเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสในร่างกายมนุษย์ แต่มีการประยุกต์ใช้เอ็นไซม์ไฮยาลูโรนิเดสร่วมกับยาชาเฉพาะที่ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของยาชา โดยใช้ที่ความเข้มข้น 51-150 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (24,25) นอกจากนั้นในการศึกษาที่ผ่านมา (12) พบว่า เมื่อใช้เอ็นไซม์ไฮยาลูโรนิเดสความเข้มข้น 100 ยูนิต จะทำการย่อยสลายเมตาคริเลตไฮยาลูโรนิกแอซิดไฮโดรเจลดังกล่าว ทั้งหมดในเวลาเพียง 48 ชั่วโมง ระดับเอ็นไซม์ไฮยาลูโรนิเดสที่ใช้ในงานวิจัยครั้งนี้ ได้ทำการปรับลดความเข้มข้นของเอนไซม์ลงถึง 4 เท่าตัว แต่ยังพบว่าใช้เวลาเพียง 48 ชั่วโมง ในการสลายแมนนิทอล/โบวินซีรัมอัลบูมิน

เมตาคริเลตไฮยาลูโรนิกแอซิดไฮโดรเจลจนหมดเช่นเดิม จึงไม่สามารถสรุปได้ว่าแมนนิทอล/โบวินซีรัมอัลบูมินเมตาคริเลตไฮยาลูโรนิกแอซิดไฮโดรเจลรูปแบบนี้ จะมีความคงทนเพียงไร จำเป็นจะต้องมีการศึกษาเพิ่มเติม ซึ่งในประเด็นความคาดหวังในการคงอยู่ของไฮโดรเจลนี้ มีเรื่องที่ต้องคำนึงสำคัญ 2 ประการ คือ ไฮโดรเจลนี้จะนำมาใช้ประโยชน์สำหรับงานเนื้อเยื่ออ่อนหรือเนื้อเยื่อแข็ง ซึ่งพบว่าระยะเวลาที่คาดหวังในการคงอยู่ในเนื้อเยื่อแข็งจะยาวนานกว่า อีกประเด็นคือ สารเหนี่ยวนำ หรือ growth factor ที่จะใส่ร่วมกับไฮโดรเจลเพื่อหวังผลบางอย่างนั้น มีรูปแบบที่ต้องการในการปลดปล่อยออกมาอย่างไร อาทิเช่น ให้ออกมาเป็นปริมาณมากในช่วงต้น หรือค่อย ๆ ปล่อยออกมาอย่างช้า ๆ โดยทีมผู้วิจัยกำลังศึกษาประเด็นดังกล่าวอยู่และกำหนดทิศทางให้เหมาะสมกับการนำมาประยุกต์ใช้ทางคลินิกได้ต่อไป โดยอาจทำการปรับสูตรของแมนนิทอล/โบวินซีรัมอัลบูมินเมตาคริเลตไฮยาลูโรนิกแอซิดไฮโดรเจลให้มีความคงทนต่อการย่อยสลายได้มากขึ้น โดยทั่วไปแล้วการหายของแผลในช่องปาก ที่มีการสูญเสียทั้งเนื้อเยื่อเหงือกและกระดูกเบ้าฟัน เช่น แผลถอนฟัน จะต้องใช้ระยะเวลาประมาณ 12 สัปดาห์ ซึ่งไฮโดรเจลก็ควรจะย่อยสลายหมดไปในช่วงเวลาดังกล่าว แต่ก็ไม่ควรจะเร็วเกินไปเนื่องจากเราต้องการให้ยาหรือโกรทแฟคเตอร์ที่ใส่เข้าไปนั้นถูกปลดปล่อยอย่างช้า ๆ ต่อเนื่อง (sustained release) ในประเด็นการก่อตัวของไฮโดรเจลที่ต้องมีการปรับค่าพีเอชให้ได้ 8 ในการศึกษาครั้งนี้ เป็นการกระตุ้นให้กระบวนการครอสลิงค์เริ่มต้นขึ้น ซึ่งจะไม่เป็นปัญหาในร่างกายที่มีความเป็นกลางและมีบัฟเฟอร์ โดยสามารถเริ่มต้นการครอสลิงค์ก่อนใส่ไฮโดรเจลเข้าไปในร่างกาย (preformed) ซึ่งแม้ค่าพีเอชจะลดลงมาในภายหลังก็ไม่เป็นปัญหากับการก่อตัวของเจล ดังที่เคยศึกษาในโดยทำการฝังในกะโหลกศีรษะ (cranial bone) ของหนู (26) โดยใช้เมตาคริเลตไฮยาลูโรนิกแอซิดไฮโดรเจลร่วมกับไวรัสยาสูบ (Tabacco mosaic virus) ซึ่งจากการติดตามเป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์ พบว่าสามารถกระตุ้นการสร้างกระดูก และจากการเจาะเลือดติดตามผลก็ไม่พบความเป็นพิษทางระบบ (systemic toxicity) แต่อย่างใด ซึ่งแสดงให้เห็นถึงการยึดอยู่ของเมตาคริเลตไฮยาลูโรนิกแอซิดไฮโดรเจลกับเนื้อเยื่อ และความเป็นไปได้ในการนำมาใช้งานในเนื้อเยื่อจริง

บทสรุป (Conclusion)

กล่าวโดยสรุปได้ว่าแมนนิทอล/โบวินซีรัมอัลบูมินเมตาคริเลตไฮยาลูโรนิกแอซิดไฮโดรเจลในรูปแบบที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ซึ่งทำการครอสลิงค์ด้วยไดไฮโอธริอิทอล มีรูภายในขนาดใหญ่ โครงสร้างไม่แน่นหนา ทำให้เกิดการแลกเปลี่ยนถ่ายเทสารภายในไฮโดรเจลได้เป็นอย่างดีเหมาะกับการเจริญของเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกมนุษย์ แต่ขณะเดียวกัน เนื่องด้วยคุณสมบัติที่เป็นรูพรุนและขนาดรูใหญ่นั้นก็ทำให้โครงสร้างถูกย่อยสลายได้โดยง่ายเช่นกัน จึงควรจะต้องมีการปรับสูตร พัฒนาให้มีคุณสมบัติทางด้านความคงทนที่เหมาะสม การย่อยสลายให้เกิดช้าลงเพื่อที่จะนำมารักษาแผลหรือเนื้อเยื่อภายในช่องปากได้ต่อไป

เอกสารอ้างอิง (References)

1. Cha HS, Kim JW, Hwang JH, Ahn KM. Frequency of bone graft in implant surgery. Maxillofac Plast Reconstr Surg. 2016;38(1):19. doi: 10.1186/s40902-016-0064-2.

2. Han J, Menicanin D, Gronthos S, Bartold PM. Stem cells, tissue engineering and periodontal regeneration. Aust Dent J. 2014;59 (Suppl 1):117-30.

3. Abou Neel EA, Chrzanowski W, Salih VM, Kim HW, Knowles JC. Tissue engineering in dentistry. J Dent. 2014;42(8):915-28.

4. Lo KW, Ulery BD, Ashe KM, Laurencin CT. Studies of bone morphogenetic protein-based surgical repair. Adv Drug Deliv Rev. 2012; 64(12):1277-91.

5. Amini AR, Laurencin CT, Nukavarapu SP. Bone tissue engineering: recent advances and challenges. Crit Rev Biomed Eng. 2012;40(5): 363-408.

6. Vega SL, Kwon MY, Burdick JA. Recent advances in hydrogels for cartilage tissue engineering. Eur Cell Mater. 2017;33:59-75.

7. Kharkar PM, Rehmann MS, Skeens KM, Maverakis E, Kloxin AM. Thiol-ene click hydrogels for therapeutic delivery. ACS Biomater Sci Eng. 2016;2(2):165-79.

8. Pena B, Laughter M, Jett S, Rowland TJ, Taylor MRG, Mestroni L, et al. Injectable hydrogels for cardiac tissue engineering. Macromol Biosci. 2018;18(6):e1800079. doi: 10.1002/mabi.201800079.

9. 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.

10. Casale M, Moffa A, Vella P, Sabatino L, Capuano F, Salvinelli B, et al. Hyaluronic acid: Perspectives in dentistry. A systematic review. Int J Immunopathol Pharmacol. 2016;29(4):572-82.

11. 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.

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. Areevijit K, Dhanesuan N, Luckanagul JA, Rungsiyanont S. Biocompatibility study of modified injectable hyaluronic acid hydrogel with mannitol/BSA to alveolar bone cells. J Biomater Appl. 2021;35(10):1294-303.

14. Trakiattikul N DN, Luckanagul JA, Rungsiyanont S. The development of mannitol/BSA methacrylated hyaluronic acid hydrogels as an injectable drug delivery platform. SWU Dent J. 2018;11(2):41-54.

15. Li J, Mooney DJ. Designing hydrogels for controlled drug delivery. Nat Rev Mater. 2016;1(12):16071. doi: 10.1038/natrevmats.2016.71.

16. Trombino S, Cassano R. Special issue on designing hydrogels for controlled drug delivery: guest editors' introduction. Pharmaceutics. 2020;12(1):57. doi: 10.3390/pharmaceutics 12010057.

17. Cesaretti M, Luppi E, Maccari F, Volpi N. A 96-well assay for uronic acid carbazole reaction. Carbohydr Polym. 2003;54(1):59-61.

18. Shi J, Qian J, Li H, Luo H, Luo W, Lin Z. Renal tubular epithelial cells injury induced by mannitol and its potential mechanism. Ren Fail. 2018;40(1):85-91.

19. Brain Trauma Foundation, American Association of Neurological Surgeons, Congress of Neurological Surgeons, Joint Section on Neurotrauma and Critical Care, AANS/CNS, Bratton SL, Chestnut RM, et al. Guidelines for the management of severe traumatic brain injury. IX. Cerebral perfusion thresholds. J Neurotrauma. 2007;24(Suppl 1):S59-64. doi: 10.1089/neu.2007.9987.

20. Gonzales-Portillo GS, Sanberg PR, Franzblau M, Gonzales-Portillo C, Diamandis T, Staples M, et al. Mannitol-enhanced delivery of stem cells and their growth factors across the blood-brain barrier. Cell Transplant. 2014;23(4-5): 531-9.

21. Liu X, Zhou X, Li S, Lai R, Zhou Z, Zhang Y, et al. Effects of titania nanotubes with or without bovine serum albumin loaded on human gingival fibroblasts. Int J Nanomedicine. 2014;9:1185-98.

22. Chhabra S, Chhabra N, Kaur A, Gupta N. Wound healing concepts in clinical practice of OMFS. J Maxillofac Oral Surg. 2017;16(4):403-23.

23. Buhren BA, Schrumpf H, Hoff NP, Bolke E, Hilton S, Gerber PA. Hyaluronidase: from clinical applications to molecular and cellular mechanisms. Eur J Med Res. 2016;21:5. doi: 10.1186/s40001-016-0201-5.

24. Moharib MM, Mitra S. Alkalinized lidocaine and bupivacaine with hyaluronidase for sub-tenon's ophthalmic block. Reg Anesth Pain Med. 2000;25(5):514-7.

25. Sarvela J, Nikki P, Paloheimo M. Orbicular muscle akinesia in regional ophthalmic anaesthesia with pH-adjusted bupivacaine: effects of hyaluronidase and epinephrine. Can J Anaesth. 1993;40(11):1028-33.

26. Yuan J, Maturavongsadit P, Zhou Z, Lv B, Lin Y, Yang J, et al. Hyaluronic acid-based hydrogels with tobacco mosaic virus containing cell adhesive peptide induce bone repair in normal and osteoporotic rats. Biomater Transl. 2020;1(1):89-98.

ติดต่อบทความ:
รศ.ดร.ทพ.สรสัณห์ รังสิยานนท์
ภาควิชาศัลยศาสตร์และเวชศาสตร์ช่องปาก
คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
สุขุมวิท 23 เขตวัฒนา กทม 10110
โทรศัพท์ 02 649 5000 ต่อ 15063
อีเมล์: peted2000@hotmail.com

Corresponding author:
Assoc.Prof.Dr. Sorasun Rungsiyanont
Department of Oral Surgery and Oral Medicine, Faculty of Dentistry, Srinakarinwirot University, Sukhumvit 23, Wattana, Bangkok, 10110, Thailand.
Tel: (662) 649 5000 ext. 15063
E-mail: peted2000@hotmail.com

Received Date: Aug 20, 2021
Revised Date: Sep 13, 2021
Accepted Date: Nov 25, 2021