



ความเข้ากันได้ทางชีวภาพระหว่างเมทาคริลเลตไฮยาลูโรนิกแอซิดไฮโดรเจลชนิดก่อดัวด้วย
แสงกับเซลล์ไลน์ไฟโบรบลาสต์แอล 929

The biocompatibility of Photopolymerized Methacrylated Hyaluronic Acid
Hydrogel to L929 Fibroblast Cell line

ธนกันต์ จิระเจริญ¹, จิตติมา ลักนากุล², นีรดา ธเนศวร³ และสรสัณห์ รังสิยานนท์³

Tanakan Jivacharoen¹, Jittima Luckanakul², Nirada Dhanesuan³

and Sorasun Rungsiyanont^{3*}

¹ นักศึกษาระดับปริญญาโท, หลักสูตรวิทยาการช่องปากและแม็กซิลโลเฟเชียล, คณะทันตแพทยศาสตร์,
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

¹ Graduate student, Master degree program in Oral and Maxillofacial Sciences, Faculty of Dentistry,
Srinakharinwirot University.

² ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร., คณะเภสัชศาสตร์, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

² Assistant Professor, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University.

³ รองศาสตราจารย์, คณะทันตแพทยศาสตร์, มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

³ Associate Professor, Faculty of Dentistry, Srinakharinwirot University.

*Corresponding author, E-mail: peted2000@hotmail.com

บทคัดย่อ

การพัฒนาโครงสร้างทางชีวภาพมีความสำคัญในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อ หนึ่งในวัสดุที่นิยมนำมาใช้
ในการศึกษาคือไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิก ในการศึกษาครั้งนี้จะนำเมทาคริลเลตไฮยาลูโรนิกแอซิด
ไฮโดรเจลชนิดก่อดัวด้วยแสงมาทดสอบหาความเข้ากันได้ทางชีวภาพกับเซลล์ไลน์ไฟโบรบลาสต์แอล 929
โดยจะทำการทดสอบ 3 ส่วนคือทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์แอล 929 โดยอ้อม ทดสอบความมีชีวิตของ
เซลล์แอล 929 เมื่อเลี้ยงบนพื้นผิวไฮโดรเจลแบบสองมิติ และทดสอบความมีชีวิตของเซลล์แอล 929
เมื่อถูกห่อหุ้มด้วยไฮโดรเจล พบว่าเซลล์แอล 929 สามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่สัมผัสกับ
ไฮโดรเจลและเซลล์แอล 929 สามารถเจริญเติบโตได้เมื่อเลี้ยงบนพื้นผิวไฮโดรเจลแบบสองมิติ
แต่เจริญเติบโตได้น้อยกว่าการเลี้ยงบนจานเลี้ยงเซลล์ปกติ เมื่อเซลล์แอล 929 ถูกห่อหุ้มด้วยไฮโดรเจล
พบว่าเซลล์แอล 929 ที่ถูกห่อหุ้มด้วยไฮโดรเจลที่ได้รับการฉายแสงสีฟ้าเป็นเวลา 60 วินาที จะเจริญได้
ดีกว่าเซลล์แอล 929 ที่ถูกห่อหุ้มด้วยไฮโดรเจลที่ได้รับการฉายแสงสีฟ้าเป็นเวลา 90 วินาที ข้อมูลจาก
การศึกษาในครั้งนี้สามารถใช้ต่อยอดเพื่อพัฒนาโครงสร้างทางชีวภาพเพื่อใช้ในการขนส่งเซลล์หรือตัวยา
เพื่อใช้ในการรักษารอยโรคในเนื้อเยื่ออ่อนต่อไป

คำสำคัญ: เซลล์แอล 929, ไฮโดรเจล, กรดไฮยาลูโรนิก, ความมีชีวิตของเซลล์

Abstract

Scaffold development plays an important role in the field of tissue engineering. Hyaluronic acid-hydrogel is one of the most promising materials. This study conducted 3 protocols to assess L929 cell viability when cultured in the presence of photopolymerized methacrylated hyaluronic acid-hydrogel. The protocols included an indirect cytotoxicity test, a 2-dimensional culture, and an encapsulation culture. The results showed that L929 cells were viable in the media containing an extract from the hydrogel. The cells were able to grow on top of the hydrogel but not as well as the one on the standard culture plate. The L929 encapsulated in the 60-second-cured hydrogel showed higher viability than the 90-second-cured one. These results provided background knowledge in scaffold development for cells or drug delivery for soft tissue treatment in the future.

Keywords: L929 cell, hydrogel, hyaluronic acid, cell viability

บทนำ

การศึกษากลไกการตอบสนองของเซลล์ต่อวัสดุโครงสร้างทางชีวภาพหรือปัจจัยทางเคมีโดยใช้กระบวนการทางวิศวกรรมนั้นเป็นแก่นหลักของวิชาวิศวกรรมเนื้อเยื่อ ซึ่งเป้าหมายของวิชาวิศวกรรมเนื้อเยื่อคือการสร้างเนื้อเยื่อใหม่หรือการทดแทนเนื้อเยื่อ (Berthiaume, Maguire, & Yarmush, 2011) ในบริเวณที่เกิดรอยโรคเพื่อให้การทำงานของเนื้อเยื่อในบริเวณนั้นกลับมาได้เหมือนเดิมหรือใกล้เคียงเดิม (Brittberg et al., 1994)

ในปัจจุบันได้มีการพัฒนาวัสดุโครงสร้างทางชีวภาพมากมายเพื่อนำมาใช้ทั้งในวิศวกรรมเนื้อเยื่ออ่อนและเนื้อเยื่อแข็ง วัสดุในกลุ่มไฮโดรเจลเป็นหนึ่งในวัสดุโครงสร้างทางชีวภาพที่ได้รับความสนใจมากในงานทางด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ เนื่องด้วยสมบัติที่เป็นโครงสร้างสามมิติของไฮโดรเจล มีความชอบน้ำสูง สามารถดึงดูดน้ำและพองตัวได้ดี ทำให้เหมาะที่จะนำมาใช้ในการขนส่งตัวยา (Gao, Zhang, Zhang, & Zhang, 2016) หรือเซลล์ซึ่งมักอยู่ในสิ่งแวดล้อมที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบ วัสดุในกลุ่มไฮโดรเจลนั้นสามารถผลิตจากสารตั้งต้นได้หลายชนิด หนึ่งในสารตั้งต้นที่นิยมนำมาใช้งานวิศวกรรมเนื้อเยื่อคือ กรดไฮยาลูโรนิก เนื่องจากไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกมีส่วนประกอบที่คล้ายกับสารที่พบในแมทริกซ์ระหว่างเซลล์จึงมีความเข้ากันได้ทางชีวภาพสูง สามารถย่อยสลายได้ด้วยเอนไซม์ภายในร่างกายมนุษย์และสามารถปรับปรุงโครงสร้างให้มีสมบัติทางกายภาพเหมาะสมกับงานในด้านต่าง ๆ ได้ (Chircov, Grumezescu, & Bejenaru, 2018)

Areevijit et al. (2019) ได้ศึกษาความเข้ากันได้ทางชีวภาพของเซลล์กระดูกเข้าพันมนุษย์กับไฮโดรเจลที่ผลิตจากกรดไฮยาลูโรนิกที่นำมาปรับปรุงโครงสร้างด้วยเมทาคริเลตและครอสลิงค์ด้วยไดไฮโอเทรอิทอลซึ่งเป็นไฮโดรเจลที่มีสมบัติทางกายภาพพื้นฐานเหมาะแก่การเจริญของเซลล์ โดยพบว่า

ไฮโดรเจลชนิดนี้มีความเข้ากันได้กับเซลล์กระดูกบ่าฟันมนุษย์ แต่มีข้อด้อยคือการเกิดการครอสลิงค์ของไฮโดรเจลชนิดนี้เป็นปฏิกิริยาเคมีซึ่งปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นเมื่อมีการสัมผัสกันของไดไฮดรอลิโธลและกรดไฮยาลูโรนิกที่ปรับปรุงโครงสร้างด้วยเมทาคริลเลตและใช้เวลาในการเกิดปฏิกิริยา 15-30 นาที ซึ่งยังไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการรักษาผู้ป่วย (Areevijit, Dhaneuan, Luckanagul, & Rungsianont, 2021; Trakiattikul N, 2018)

Chaopanitcharoen et al. (2021) ได้ศึกษาสมบัติของไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกที่ปรับปรุงโครงสร้างด้วยเมทาคริลเลตแล้วครอสลิงค์ด้วยลิเทียมไตรเมทิลเบนโซอิลฟอสฟิเนตแทนไดไฮดรอลิโธล ทำให้เปลี่ยนการครอสลิงค์จากปฏิกิริยาเคมีเป็นครอสลิงค์ด้วยการกระตุ้นจากแสงสีฟ้าแทน ทำให้สามารถกำหนดเวลาที่ต้องการให้ไฮโดรเจลสามารถครอสลิงค์ได้และการศึกษานี้พบว่าในกลุ่มที่ได้รับแสงสีฟ้าเป็นเวลา 90 วินาทีจะได้ไฮโดรเจลที่มีรูพรุนขนาดเท่ากันและมีโครงสร้างที่เป็นระเบียบ และมีสมบัติการพองตัวเมื่อดูดซับน้ำ เหมาะที่จะนำไปพัฒนาต่อเป็นโครงร่างทางชีวภาพสำหรับการนำส่งเซลล์หรือใช้เป็นระบบขนส่งยาหรือโกรทแฟกเตอร์ (Chaopanitcharoen P, 2021)

งานวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยได้เล็งเห็นถึงประโยชน์และความสำคัญของเมทาคริลเลตไฮยาลูโรนิกแอซิดไฮโดรเจลชนิดก่อดัวด้วยแสงต่องานทางด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อนำไฮโดรเจลดังกล่าวมาทดสอบความเข้ากันได้กับเซลล์ไลน์ไฟโบรบลาสต์แอล 929 ซึ่งเป็นเซลล์ไลน์ไฟโบรบลาสต์จากหนูที่แนะนำให้ใช้ในการทดสอบชีววัสดุทางการแพทย์ในห้องปฏิบัติการตามองค์การมาตรฐานสากล (ISO 10993-5) โดยคาดหวังว่าผลการศึกษาในครั้งนี้จะสามารถนำไปต่อยอดเพื่อสร้างโครงร่างทางชีวภาพที่มีประโยชน์ทางพันธุวิศวกรรมเนื้อเยื่อต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาความเข้ากันได้ทางชีวภาพของเซลล์แอล 929 และเมทาคริลเลตไฮยาลูโรนิกแอซิดไฮโดรเจลที่ก่อดัวด้วยแสง

แนวคิด ทฤษฎี กรอบแนวคิด

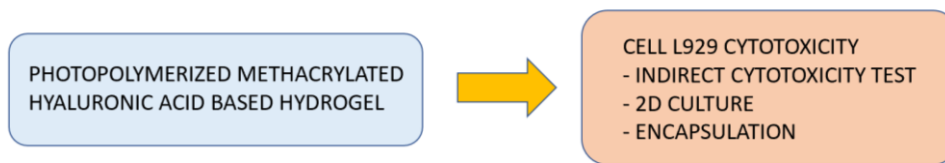
เซลล์แอล 929 เป็นเซลล์ไลน์ไฟโบรบลาสต์ที่ได้จากเนื้อเยื่อเกี่ยวพันชนิดเนื้อเยื่อไขมันใต้ผิวหนังของหนูเพศผู้ สปีชีส์ *Mus musculus* ที่มีอายุ 100 วัน ในปี ค.ศ.1948 ซึ่งโคลน 929 เกิดจากการแยกเซลล์ในรุ่นที่ 95 ด้วยเทคนิคแคลฟีลลารี เซลล์แอล 929 มีจุดประสงค์สำหรับใช้วิจัยในห้องปฏิบัติการเหมาะสมที่จะทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ ความเข้ากันได้กับวัสดุทางการแพทย์และทดสอบการติดเชื้อ

ไฮโดรเจลเป็นสารประกอบโพลิเมอร์สายยาวที่มีการครอสลิงค์ระหว่างสายโซ่โมเลกุลเกิดเป็นโครงร่างสามมิติขึ้น มีสมบัติในการพองตัวและเก็บกักน้ำได้ดี มีรูพรุนในโครงร่าง ทำให้นิยมนำมาใช้ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อ (Alvarez-Lorenzo & Concheiro, 2008) ไฮโดรเจลสามารถผลิตได้จากสารตั้งต้นหลายชนิด อาทิ โพลีเอทิลีนไกลคอล อัลจินเต โพลีไวนิลแอลกอฮอล์ ไคโตซาน เฮพาริน และกรดไฮยาลูโรนิก

Chaopanitcharoen et al. (2021) ได้ทดสอบสมบัติของไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกที่ปรับปรุงโครงสร้างด้วยเมทาคริเลตแล้วครอสลิงค์ด้วยลิเทียมไตรเมทิลเบนโซอิลฟอสเฟต ซึ่งเป็นไฮโดรเจลที่ก่อตัวเมื่อได้รับแสงสีฟ้า โดยทำการฉายแสงสีฟ้าเป็นเวลา 30-120 วินาที พบว่ากลุ่มที่ได้รับการฉายแสงสีฟ้านานกว่าจะมีพื้นผิวเป็นเนื้อเดียวกันมากกว่า กลุ่มที่ได้รับการฉายแสงเป็นเวลา 90 วินาทีมีลักษณะเป็นรูพรุนชัดเจนแตกต่างจากกลุ่มที่ฉายแสง 30 และ 60 วินาที ที่มีลักษณะเป็นแผ่นและมีโครงร่างที่ไม่ชัดเจน ไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกที่ปรับปรุงโครงสร้างด้วยเมทาคริเลตแล้วครอสลิงค์ด้วยลิเทียมไตรเมทิลเบนโซอิลฟอสเฟตที่ได้รับการฉายแสงเป็นเวลา 90 วินาทีเป็นระยะเวลาที่เหมาะสมทำให้ได้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไฮโดรเจลที่ดี มีขนาดรูพรุนสม่ำเสมอต่อเนื่องไปทั่วทั้งไฮโดรเจล (Chaopanitcharoen P, 2021)

ในการทดสอบความเป็นพิษของวัสดุทางการแพทย์ต่อเซลล์จะใช้วิธีวิเคราะห์ความมีชีวิตของเซลล์ในการทดสอบ วิธีที่นิยมใช้ในการทดสอบคือวิธีวิเคราะห์เอ็มทีทีและวิธีวิเคราะห์รีซาชูรินรีดักชัน ซึ่งหลักการของทั้ง 2 วิธีจะเหมือนกันคือสารตั้งต้นที่ใช้ในการทดสอบเป็นสารที่ไม่มีฟลูออเรสเซนส์แต่เมื่อได้รับอิเล็กตรอนจากตัวให้อิเล็กตรอนภายในเซลล์จะเกิดเป็นสารประกอบที่ให้ฟลูออเรสเซนส์เมื่อได้รับแสงความยาวคลื่นที่เหมาะสม (Berridge, Herst, & Tan, 2005) จึงนำมาใช้อ้างอิงในการดูความมีชีวิตของเซลล์ (Rampersad, 2012; Riss & Moravec, 2004) กล่าวคือเซลล์ที่มีชีวิตจะมีเมตาบอลิซึมภายในเซลล์และมีการแลกเปลี่ยนอิเล็กตรอนภายในเซลล์ทำให้สารตั้งต้นที่เข้าไปในเซลล์ที่มีชีวิตถูกเปลี่ยนเป็นรูปแบบที่มีฟลูออเรสเซนส์มากกว่าสารตั้งต้นที่เข้าไปในเซลล์ที่ตายแล้วนั่นเอง วิธีวิเคราะห์เอ็มทีทีจะใช้สารตั้งต้นเป็นเกลือเตตระโซเลียมซึ่งเมื่อได้รับอิเล็กตรอนจะเปลี่ยนเป็นฟอร์มazan ซึ่งไม่ละลายน้ำ (Berridge et al., 2005) เกิดเป็นผลึกภายในเซลล์และทำให้เซลล์ที่ทดสอบด้วยวิธีนี้ตายและเป็นการจบปฏิกิริยาในที่สุด (Mosmann, 1983) ส่วนวิธีวิเคราะห์รีซาชูรินรีดักชันจะใช้สารตั้งต้นเป็นรีซาชูรินเมื่อได้รับอิเล็กตรอน (de Fries & Mitsuhashi, 1995; Gonzalez & Tarloff, 2001; McMillian et al., 2002; Präbst, Engelhardt, Ringgeler, & Hübner, 2017) จะเปลี่ยนเป็นรีโซรูฟิน (O'Brien, Wilson, Orton, & Pognan, 2000) ซึ่งละลายน้ำและผ่านออกมาจากเยื่อหุ้มเซลล์ได้ ทำให้เซลล์ที่ทำการทดสอบยังคงมีชีวิตอยู่หลังจากการทดสอบ

จากแนวคิด ทฤษฎีและการศึกษาที่กล่าวมาเป็นที่มาของการศึกษาในครั้งนี้ซึ่งต่อยอดมาจากการศึกษาของ Chaopanitcharoen et al. (2021) โดยจะนำไฮโดรเจลจากกรดไฮยาลูโรนิกที่ปรับปรุงโครงสร้างด้วยเมทาคริเลตแล้วครอสลิงค์ด้วยลิเทียมไตรเมทิลเบนโซอิลฟอสเฟตมาทดสอบความเป็นพิษกับเซลล์แอล 929 ทางห้องปฏิบัติการ โดยกรอบแนวคิดการวิจัยเป็นดังภาพประกอบ 1



ภาพประกอบ 1 กรอบแนวคิดงานวิจัย

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การสังเคราะห์ไฮโดรเจล (Hydrogel synthesis)

นำกรดไฮยาลูโรนิกน้ำหนักโมเลกุล 47 กิโลดาลตันไปละลายในโพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีค่า pH มากกว่าหรือเท่ากับ 8 ให้ได้สัดส่วน 1% โดยน้ำหนัก จากนั้นเติมเมทาคริเลตแอนไฮไดรด์ลงไปให้ได้ 1 ส่วนต่อกรดไฮยาลูโรนิก 10 ส่วน ตลอดจนการเกิดปฏิกิริยาต้องควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ในช่วง 0-4 องศาเซลเซียส เมื่อครบ 24 ชั่วโมงจะนำออกมากรองในน้ำอัลตราเพียวเป็นเวลา 3 วัน แล้วจึงไปปั่นเหวี่ยงเพื่อเอาเมทาคริเลตส่วนเกินออก นำไปทำให้แห้งด้วยวิธีแช่แห้งแบบเยือกแข็ง จะได้เมทาคริเลต-ไฮยาลูโรนิกแอซิดที่มีลักษณะเป็นเส้นใย นำไปทดสอบหาปริมาณการเกิดการปรัปรองโครงสร้างด้วยวิธีโปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโคปี โดยต้องมีปริมาณการปรัปรองโครงสร้างมากกว่าร้อยละ 60 จึงจะนำมาใช้ในการทดสอบได้ เมื่อจะใช้ไฮโดรเจลให้นำเมทาคริเลตไฮยาลูโรนิกแอซิดไปทำการฆ่าเชื้อด้วย 99.99% เอทานอลและรังสีอัลตราไวโอเล็ตเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำมาผสมกับลิเทียมฟีนิลไทรเมทิล-เบนโซอิลฟอสฟิเนตในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดดิลแบคโคมอดิฟายอีเกิลให้ได้อัตราส่วนเมทาคริเลตเตตไฮยาลูโรนิกแอซิด 100 มิลลิกรัมต่อลิตรและลิเทียมฟีนิลไทรเมทิลเบนโซอิล-ฟอสฟิเนต 15 มิลลิกรัมต่อลิตร

2. การทดสอบ Indirect Cytotoxicity Assay

ขึ้นรูปไฮโดรเจลในแท่นพิมพ์ให้ได้ลักษณะเป็นวงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 20 มิลลิเมตรหนา 5 มิลลิเมตร จากนั้นนำไปแช่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดดีเอ็มอีเอ็มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำอาหารเลี้ยงเซลล์มาทดสอบกับเซลล์แอล 929 ในจานเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุมโดยใช้ความเข้มข้นของอาหารเลี้ยงเซลล์ 100%, 50%, 25%, 12.5% ในส่วนของกลุ่มควบคุมจะใช้ 10% Dimethyl Sulfoxide เป็นกลุ่มควบคุมลบและ 10% Fetal bovine serum เป็นกลุ่มควบคุมบวก ในแต่ละหลุมจะมีเซลล์แอล 929 10,000 เซลล์ หลังจากทดสอบเป็นเวลา 24 ชั่วโมงจะทำการวิเคราะห์ความมีชีวิตของเซลล์ด้วยวิธีวิเคราะห์เอ็มทีทีทำการทดสอบซ้ำ 9 ครั้ง

3. การทดสอบ 2D Culture Assay

ขึ้นรูปไฮโดรเจลในงานเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม โดยแบ่งไฮโดรเจลออกเป็นกลุ่มที่ได้รับการฉายแสงสีฟ้า 60 วินาทีและกลุ่มที่ได้รับการฉายแสงสีฟ้า 90 วินาที กำหนดปริมาตรไฮโดรเจลเท่ากับ 80 ไมโครลิตรต่อหลุม เติมหอาหารเลี้ยงเซลล์สมบูรณ์ลงไปหลุมละ 100 ไมโครลิตรแล้วทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการใส่เซลล์แอล 929 ลงไปบนพื้นผิวของไฮโดรเจลจำนวน 5,000 เซลล์ต่อหลุม กลุ่มควบคุมบวก็คือพื้นผิวของงานเลี้ยงเซลล์ กลุ่มควบคุมที่ไม่มีเซลล์คือไฮโดรเจลและอาหารเลี้ยงเซลล์ ทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก ๆ 2 วัน และทำการวิเคราะห์ความมีชีวิตของเซลล์ด้วย Prestoblu ในวันที่ 1, 3, 5 และ 12 ทำการทดสอบซ้ำ 9 ครั้ง

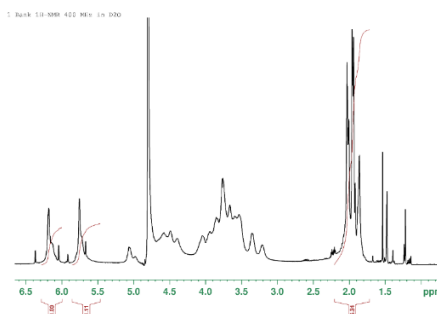
4. การทดสอบ Encapsulation Culture Assay

ผสมสารละลายไฮโดรเจลและเซลล์แอล 929 แล้วใส่ในงานเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุมปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม ทำการฉายแสงสีฟ้าเพื่อขึ้นรูปไฮโดรเจลโดยแบ่งเป็นกลุ่มที่ฉายแสง 60 วินาทีและกลุ่มที่ฉายแสง 90 วินาที จากนั้นทำการเติมหอาหารเลี้ยงเซลล์ที่สมบูรณ์หลุมละ 100 ไมโครลิตร ทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 2 วัน ทำการวิเคราะห์ความมีชีวิตของเซลล์ด้วย Prestoblu ในวันที่ 1, 3, 5 และ 12 ทำการทดสอบซ้ำ 9 ครั้ง

ผลการวิจัย

1. ผลการสังเคราะห์เมทาคริเลตไฮยาลูโรนิกแอซิด

ในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยได้ทำการสังเคราะห์เมทาคริเลตไฮยาลูโรนิกแอซิดเป็นจำนวน 4 ครั้ง โดยเมื่อทำการทดสอบหาปริมาณการเกิดการปรับปรุงโครงสร้าง (degree of modification) ด้วยวิธีโปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโคปีพบว่าเมทาคริเลตไฮยาลูโรนิกแอซิดที่สังเคราะห์ได้ทั้ง 4 ครั้งมีค่าปริมาณการเกิดการปรับปรุงโครงสร้างร้อยละ 100 ซึ่งเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนดไว้ว่าเมทาคริเลตไฮยาลูโรนิกแอซิดที่ใช้ในการศึกษาต้องมีค่าปริมาณการเกิดการปรับปรุงโครงสร้างมากกว่าร้อยละ 60 ตัวอย่างกราฟที่ได้จากการทดสอบโปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโคปีเป็นดังภาพประกอบที่ 2



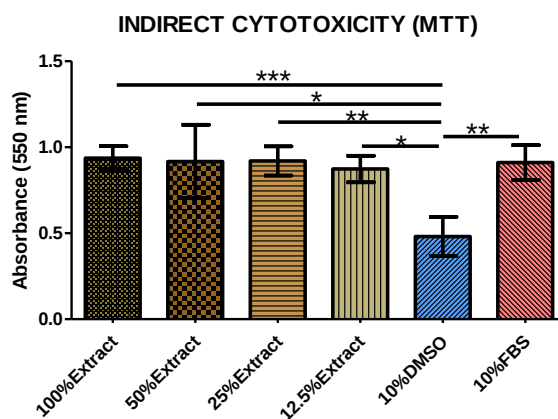
ภาพประกอบที่ 2 ตัวอย่างผลการทดสอบหาปริมาณการเกิดการปรับปรุงโครงสร้างด้วยวิธีโปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโคปีในการสังเคราะห์ครั้งที่ 1

2. การทดสอบ Indirect Cytotoxicity Assay

จากการนำอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ได้สัมผัสกับไฮโดรเจลเป็นเวลา 1 วันมาทดสอบกับเซลล์แอล 929 เป็นเวลา 1 วันแล้วทำการวิเคราะห์ความมีชีวิตของเซลล์ด้วยวิธีวิเคราะห์เอ็มทีทีพบว่า ในกลุ่มที่ได้รับอาหารเลี้ยงเซลล์ที่สัมผัสกับไฮโดรเจลความเข้มข้น 100% วัดค่าการดูดกลืนแสงได้ 0.9371 ± 0.0698 กลุ่มที่ได้รับอาหารเลี้ยงเซลล์ที่สัมผัสกับไฮโดรเจลความเข้มข้น 50% วัดค่าการดูดกลืนแสงได้ 0.9173 ± 0.2137 กลุ่มที่ได้รับอาหารเลี้ยงเซลล์ที่สัมผัสกับไฮโดรเจลความเข้มข้น 25% วัดค่าการดูดกลืนแสงได้ 0.9208 ± 0.0849 กลุ่มที่ได้รับอาหารเลี้ยงเซลล์ที่สัมผัสกับไฮโดรเจลความเข้มข้น 12.5% วัดค่าการดูดกลืนแสงได้ 0.8736 ± 0.0776 ในกลุ่มควบคุมบวกที่ได้รับอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี 10% Dimethyl Sulfoxide วัดค่าการดูดกลืนแสงได้ 0.4809 ± 0.1143 และในกลุ่มควบคุมลบที่ได้รับอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี 10% Fetal Bovine Serum วัดค่าการดูดกลืนแสงได้ 0.9111 ± 0.1015 ดังแสดงในตารางที่ 2 แสดงให้เห็นว่าในกลุ่มทดสอบที่ได้รับอาหารเลี้ยงเซลล์ที่สัมผัสกับไฮโดรเจลในทุกความเข้มข้นสามารถพบความมีชีวิตของเซลล์แอล 929 ได้ แผนภูมิแท่งแสดงผลการทดสอบ Indirect Cytotoxicity Assay เป็นดังภาพประกอบที่ 3

ตารางที่ 1 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้จากวิธีวิเคราะห์เอ็มทีทีในการทดสอบ Indirect Cytotoxicity Assay, n=9

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

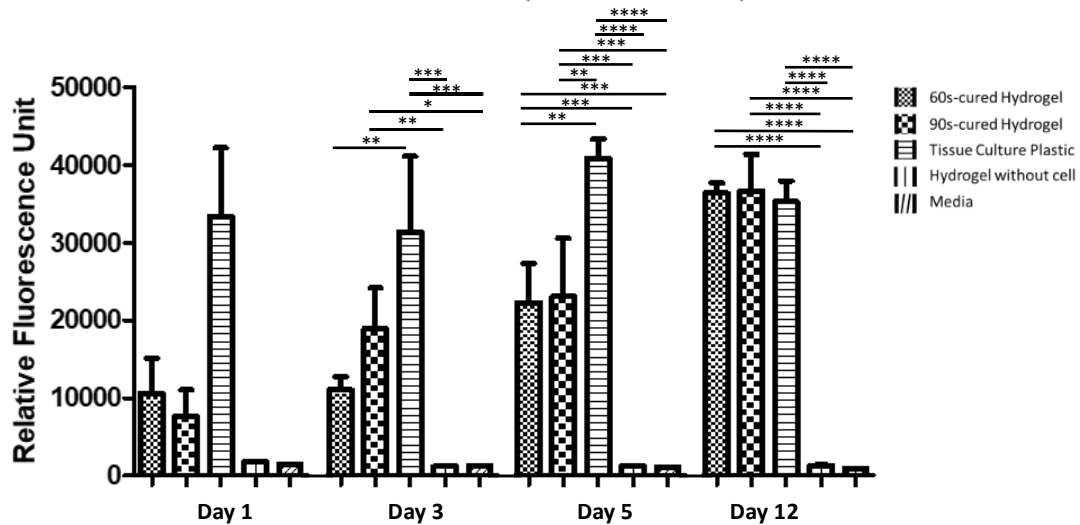


ภาพประกอบที่ 3 แผนภูมิแท่งแสดงผลการทดสอบ Indirect Cytotoxicity Assay ค่าที่แสดงคือ mean $\pm$ SD, n=9, โดยใช้สถิติ Kruskal-Wallis test ร่วมกับ Dunn's multiple comparisons test, $p < 0.05$

3. ผลการทดสอบ 2D Culture Assay

การทดสอบการเลี้ยงเซลล์แอล 929 บนพื้นผิวของไฮโดรเจลแล้วนำมาทดสอบความมีชีวิตด้วย Prestoblu ในวันที่ 1, 3, 5 และ 12 โดยมีกลุ่มควบคุมบวกคือ Tissue Culture Plate และกลุ่มควบคุมที่ไม่มีเซลล์คือไฮโดรเจลและอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดดีเอ็มอีเอ็มพบว่าในกลุ่มที่เลี้ยงบนผิวไฮโดรเจลที่ได้รับการฉายแสงสีฟ้าเป็นเวลา 60 วินาที วัดค่าฟลูออเรสเซนส์ในวันที่ 1, 3, 5 และ 12 ได้ $10,544.33 \pm 4,544.26$, $13,210.00 \pm 2,090.41$, $26,749.33 \pm 6,002.81$ และ $43,603.67 \pm 1,594.29$ ตามลำดับ ในกลุ่มที่เลี้ยงบนผิวไฮโดรเจลที่ได้รับการฉายแสงสีฟ้าเป็นเวลา 90 วินาที วัดค่าฟลูออเรสเซนส์ในวันที่ 1, 3, 5 และ 12 ได้ $7,607.33 \pm 3,440.67$, $22,667.66 \pm 6,270.75$, $27,623.33 \pm 9,056.13$ และ $44,008.67 \pm 5,609.76$ ตามลำดับ กลุ่มที่เลี้ยงบน Tissue Culture Plastic วัดค่าฟลูออเรสเซนส์ในวันที่ 1, 3, 5 และ 12 ได้ $33,339.00 \pm 8,822.09$, $37,684.33 \pm 11,611.77$, $48,941.67 \pm 3,004.50$ และ $42,285.67 \pm 3,259.84$ ตามลำดับ ในกลุ่มไฮโดรเจลที่ไม่มีเซลล์แอล 929 วัดค่าฟลูออเรสเซนส์ในวันที่ 1, 3, 5 และ 12 ได้ $1,811.00 \pm 1.41$, $1,426 \pm 9.90$, $1,466 \pm 14.14$ และ $1,591 \pm 71.42$ ตามลำดับ ในกลุ่มอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีเซลล์แอล 929 วัดค่าฟลูออเรสเซนส์ในวันที่ 1, 3, 5 และ 12 ได้ $1,492 \pm 0.00$, $1,503 \pm 0.00$, $1,287 \pm 0.00$ และ $1,122 \pm 0.00$ ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 3 แสดงให้เห็นว่าเซลล์แอล 929 สามารถเจริญเติบโตบนพื้นผิวของไฮโดรเจลได้แต่เจริญเติบโตได้น้อยกว่าบนผิวของ Tissue Culture Plate กราฟแสดงผลการทดสอบเป็นดังภาพประกอบที่ 4

2D CULTURE (PRESTOBLUE)



ภาพประกอบที่ 4 กราฟแสดงผลการทดสอบ 2D Culture Assay, mean $\pm$ SD, n=9, โดยใช้สถิติ One-way ANOVA ร่วมกับ Tukey's multiple comparisons test, $p < 0.05$

ตารางที่ 2 ค่าฟลูออเรสเซนส์จากการทดสอบด้วย PrestobluE ในการทดสอบ 2D Culture Assay, n=9

กลุ่มทดสอบ	ค่าฟลูออเรสเซนส์, mean $\pm$ SD			
	วันที่ 1	วันที่ 3	วันที่ 5	วันที่ 12
กลุ่มที่เลี้ยงบนผิวไฮโดรเจลที่ได้รับการฉายแสงสีฟ้าเป็นเวลา 60 วินาที	10,544.33 $\pm$ 4,544.26	13,210.00 $\pm$ 2,090.41	26,749.33 $\pm$ 6,002.81	43,603.67 $\pm$ 1,594.29
กลุ่มที่เลี้ยงบนผิวไฮโดรเจลที่ได้รับการฉายแสงสีฟ้าเป็นเวลา 90 วินาที	7,607.33 $\pm$ 3,440.67	22,667.66 $\pm$ 6,270.75	27,623.33 $\pm$ 9,056.13	44,008.67 $\pm$ 5,609.76
กลุ่มที่เลี้ยงบน Tissue Culture Plastic	33,339.00 $\pm$ 8,822.09	37,684.33 $\pm$ 11,611.77	48,941.67 $\pm$ 3,004.50	42,285.67 $\pm$ 3,259.84
กลุ่มไฮโดรเจลที่ไม่มีเซลล์แอล 929	1,811.00 $\pm$ 1.41	1,426 $\pm$ 9.90	1,466 $\pm$ 14.14	1,591 $\pm$ 71.42
กลุ่มอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีเซลล์แอล 929	1,492 $\pm$ 0.00	1,503 $\pm$ 0.00	1,287 $\pm$ 0.00	1,122 $\pm$ 0.00

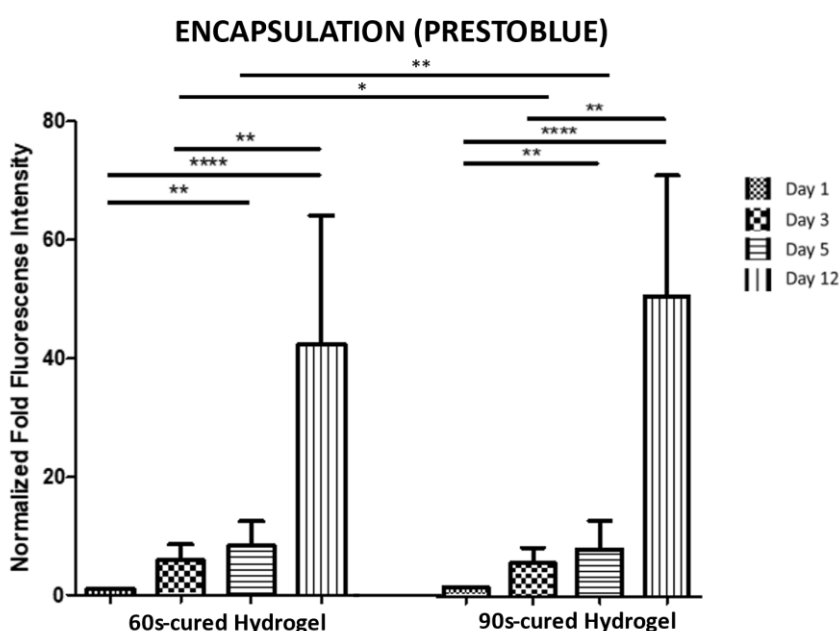
4. ผลการทดสอบ Encapsulation Culture Assay

การทดสอบการเลี้ยงเซลล์แอล 929 ในลักษณะสามมิติห่อหุ้มรอบเซลล์ด้วยไฮโดรเจลจากนั้นทำการทดสอบความมีชีวิตของเซลล์ในวันที่ 1, 3, 5 และ 12 แล้วแปลผลโดยใช้ค่าฟลูออเรสเซนส์สัมพันธ์ซึ่งเปรียบเทียบค่าฟลูออเรสเซนส์ที่วัดได้ในแต่ละวันกับค่าในวันแรก ในกลุ่มที่เลี้ยงในไฮโดรเจลที่ได้รับการฉายแสงสีฟ้าเป็นเวลา 60 วินาที พบว่าค่าฟลูออเรสเซนส์สัมพันธ์ในวันที่ 1, 3, 5 และ 12 มีค่า 1.00 ± 0.00 , 5.84 ± 2.76 , 8.29 ± 4.15 และ 42.30 ± 21.92 เท่า ตามลำดับ กลุ่มที่เลี้ยงในไฮโดรเจลที่ได้รับการฉายแสงสีฟ้าเป็นเวลา 90 วินาที พบว่าค่าฟลูออเรสเซนส์สัมพันธ์ในวันที่ 1, 3, 5 และ 12 มีค่า

1.00±0.00, 3.67±1.71, 5.23±3.09 และ 33.18±13.39 เท่าตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4 แสดงให้เห็นว่าในสภาวะที่เซลล์แอล 929 ถูกห่อหุ้มด้วยไฮโดรเจลเซลล์แอล 929 ยังสามารถเจริญเติบโตได้ โดยเซลล์แอล 929 เจริญเติบโตในไฮโดรเจลที่ได้รับการฉายแสงสีฟ้าเป็นเวลา 60 วินาที มากกว่าไฮโดรเจลที่ได้รับการฉายแสงสีฟ้าเป็นเวลา 90 วินาที แผนภูมิแท่งแสดงผลการทดสอบ Encapsulation Culture Assay เป็นดังภาพประกอบที่ 5

ตารางที่ 3 ค่าฟลูออเรสเซนส์สัมพันธ์จากการทดสอบด้วย Prestoblu e ในการทดสอบ Encapsulation Culture Assay, n=9

ชนิดของไฮโดรเจล ที่ห่อหุ้มเซลล์	ค่าฟลูออเรสเซนส์สัมพันธ์, mean ± SD			
	Day 1	Day 3	Day 5	Day 12
ไฮโดรเจลที่ได้รับการฉายแสง 60 วินาที	1.00±0.00	5.84±2.76	8.29±4.15	42.30±21.92
ไฮโดรเจลที่ได้รับการฉายแสง 90 วินาที	1.00±0.00	3.67±1.71	5.23±3.09	33.18±13.39



ภาพประกอบที่ 5 แผนภูมิแท่งแสดงผลการทดสอบ Encapsulation Culture Assay, mean ± SD, n=9, โดยใช้สถิติ Kruskal-Wallis test ร่วมกับ Dunn's multiple comparisons test ในการวิเคราะห์ภายในกลุ่มทดลองและใช้สถิติ Mann Whitney test ในการวิเคราะห์ระหว่างกลุ่มทดลอง, p<0.05

สรุปและอภิปรายผล

การศึกษาด้วยวิธี Indirect Cytotoxicity Assay ทำให้ทราบว่าเมทาคริเลตไฮยาโลโรนิกแอซิดไฮโดรเจลชนิดกึ่งตัวด้วยแสงมีความเข้ากันได้ทางชีวภาพกับเซลล์ไลน์ไฟโบรบลาสต์แอล 929 เนื่องจากเซลล์สามารถคงการเกิดปฏิกิริยาเคมีภายในเซลล์ได้แม้จะอยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่สัมผัสกับไฮโดรเจล อีกทั้งผลการทดสอบเอ็มทีทีที่ยังพบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับเซลล์ที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี 10%FBS ซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญของอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ช่วยเพิ่มการเจริญเติบโตของเซลล์อีกด้วย เมื่อนำเซลล์ไลน์ไฟโบรบลาสต์แอล 929 ซึ่งเป็นเซลล์ที่ต้องอาศัยการยึดเกาะพื้นผิวในการเจริญเติบโตมาเลี้ยงบนพื้นผิวไฮโดรเจลในการทดสอบ 2D Culture Assay พบว่าเซลล์ยังสามารถเพิ่มจำนวนบนผิวไฮโดรเจลได้โดยสังเกตได้จากการเพิ่มขึ้นของค่าฟลูออเรสเซนส์เมื่อทดสอบกับ Prestobblue ในวันที่ 3 ของการทดลองเซลล์ที่อยู่บนพื้นผิวไฮโดรเจลที่ได้รับการฉายแสงสีฟ้าเป็นเวลา 60 วินาที เพิ่มจำนวนได้น้อยกว่าเซลล์ที่เลี้ยงบนจานเลี้ยงเซลล์อย่างมีนัยสำคัญแต่ไม่แตกต่างกับเซลล์ที่อยู่บนพื้นผิวไฮโดรเจลที่ได้รับการฉายแสงสีฟ้าเป็นเวลา 90 วินาที ในวันที่ 5 เซลล์ที่เลี้ยงบนพื้นผิวไฮโดรเจลทั้ง 2 กลุ่มมีจำนวนน้อยกว่าเซลล์ที่เลี้ยงบนจานเลี้ยงเซลล์อย่างมีนัยสำคัญ ในวันที่ 12 ของการทดลองไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญของจำนวนเซลล์ที่เลี้ยงบนไฮโดรเจลและบนจานเลี้ยงเซลล์เนื่องจากเซลล์ได้เพิ่มจำนวนจนเต็มพื้นที่ของ 96-well plate แล้วนั่นเอง ทั้งนี้สาเหตุที่เซลล์ที่เลี้ยงบนพื้นผิวไฮโดรเจลที่ได้รับการฉายแสงสีฟ้า 60 วินาทีเพิ่มจำนวนได้น้อยกว่าในช่วงแรกน่าจะมาจากการที่เมทาคริเลตไฮยาโลโรนิกแอซิดไฮโดรเจลที่ได้รับการฉายแสงสีฟ้าเป็นเวลานานกว่าจะเกิดการครอสลิงค์ของสายโซ่โพลิเมอร์มากกว่าทำให้เกิดเป็นโครงร่างที่แข็งแรงและคงตัว (Chaopanitcharoen P, 2021) ซึ่งทำให้เซลล์จำพวกยึดเกาะพื้นผิวสามารถเกาะและเจริญเติบโตได้ดีกว่า อีกหนึ่งเหตุผลที่เซลล์ที่เลี้ยงในจานเลี้ยงเซลล์เพิ่มจำนวนได้ดีกว่าเซลล์ที่เลี้ยงบนไฮโดรเจลมาจากการที่เซลล์มีตัวรับที่สามารถจับกับพื้นผิวของจานเลี้ยงเซลล์ได้โดยตรงแต่ไฮโดรเจลที่ใช้ในการทดสอบนั้นเป็นไฮยาโลโรนิกแอซิดที่ถูกปรับปรุงโครงสร้างด้วยเมทาคริเลต 100% ทำให้บริเวณที่ตัวรับของเซลล์จะจับกับสายโพลิเมอร์มีไม่มาก(Wang et al., 2021) เป็นผลให้เซลล์ต้องใช้เวลาในการปรับตัวเพื่อที่จะเจริญเติบโตบนพื้นผิวของไฮโดรเจelnานกว่าจานเลี้ยงเซลล์ ในการทดลองสุดท้ายได้ทำการเลี้ยงเซลล์ในรูปแบบสามมิติโดยการห่อหุ้มเซลล์ด้วยไฮโดรเจล วิธีนี้ทำให้เซลล์แต่ละเซลล์ได้สัมผัสกับไฮโดรเจลโดยตรงและอยู่ภายในโครงร่างของไฮโดรเจลซึ่งจะส่งผลต่อการแสดงออกของเซลล์ (Edmondson, Broglie, Adcock, & Yang, 2014) พบว่าแม้ถูกห่อหุ้มด้วยไฮโดรเจลเซลล์ยังคงสามารถเพิ่มจำนวนจากวันแรกได้โดยสังเกตจากค่าฟลูออเรสเซนส์สัมพัทธ์ที่เพิ่มขึ้น ในวันที่ 3 ของการทดลองค่าฟลูออเรสเซนส์สัมพัทธ์ของทั้ง 2 กลุ่มเพิ่มขึ้นแต่ยังไม่แตกต่างจากในวันแรกอย่างมีนัยสำคัญ แต่ในวันที่ 5 และ 12 ของการทดลองทั้ง 2 กลุ่มมีค่าฟลูออเรสเซนส์สัมพัทธ์เพิ่มขึ้นจากวันแรกอย่างมีนัยสำคัญ ทำให้ทราบว่าเมื่อเซลล์ถูกห่อหุ้มด้วยไฮโดรเจลจะมีการเจริญเข้าในช่วงแรกและเริ่มเจริญเติบโตมากขึ้นเมื่อเวลาผ่านไป สาเหตุมาจากการที่มีปริมาณอาหารและพื้นที่จำกัดทำให้ไม่สามารถการทำงานของเซลล์ในระดับปกติเมื่อเวลาผ่านไปเซลล์จะเริ่มย่อยสลายไฮโดรเจลที่อยู่รอบตัวทำให้มีพื้นที่มากขึ้นและอาหารเลี้ยง

เซลล์สามารถเข้ามาภายในโครงร่างไฮโดรเจลได้มากขึ้นเซลล์จึงเจริญเติบโตได้มากขึ้น ในการศึกษาของ Ragain et al. (2021) พบว่า LED curing light มีผลกับเซลล์เยื่อบุผิวเหงือกโดยหากได้รับการฉายแสงเป็นเวลานานถึง 39, 60 หรือ 120 วินาทีเซลล์เยื่อบุผิวเหงือกจะมีอัตราการเพิ่มจำนวนลดลง ซึ่งผลแตกต่างจากการศึกษาของ Thamonwan Langlongsathit (2016) พบว่า LED light ไม่มีผลกับการเพิ่มจำนวนของ Periodontal ligament cell หากได้รับการฉายแสงเป็นระยะเวลาไม่เกิน 60 วินาที การได้รับการฉายแสง LED light นานจะส่งผลกับ flavin-containing oxidases, the cytochrome system, heme-containing proteins, and tryptophan-rich proteins ภายในไมโทคอนเดรียและเพอร์ออกซิโซม ทำให้เกิดไฮโดรเจนเพอออกไซด์ขึ้นในเซลล์ซึ่งส่งผลต่อการแสดงออกของเซลล์เป็นผลให้การแบ่งตัวของเซลล์ลดลง(Hockberger et al., 1999) ในการศึกษาครั้งนี้ เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่ถูกเลี้ยงในไฮโดรเจลที่ได้รับการฉายแสงสีฟ้าเป็นเวลา 60 วินาทีกับกลุ่มที่เลี้ยงในไฮโดรเจลที่ฉายแสงสีฟ้าเป็นเวลา 90 วินาที ในวันที่ 3 และ 5 กลุ่มที่ได้รับการฉายแสงสีฟ้าเป็นเวลา 60 วินาทีมีค่าฟลูออเรสเซนส์สัมพันธ์ที่มากกว่าอย่างมีนัยสำคัญ เนื่องมาจากโครงร่างของไฮโดรเจลในกลุ่มนี้มีการเกิดการครอสลิงค์ที่น้อยกว่าทำให้เกิดเป็นร่างแหที่หนาแน่นน้อย มีรูพรุนสูง(Chaopanitcharoen P, 2021) ทำให้อาหารเลี้ยงเซลล์จากรอบนอกเข้ามาถึงเซลล์ภายในไฮโดรเจลได้ อีกทั้งยังมีพื้นที่ให้เซลล์เพิ่มจำนวนได้มากขึ้น แต่ในวันที่ 12 ของการทดลองพบว่าค่าฟลูออเรสเซนส์สัมพันธ์ของทั้ง 2 กลุ่มไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ เนื่องจากเซลล์ที่ถูกห่อหุ้มด้วยไฮโดรเจลเริ่มมีการสลายไฮโดรเจลรอบ ๆ แล้วนั่นเอง Areevijit et al. (2019) ได้ทำการทดสอบความเข้ากันได้ของเซลล์กระดูกเบาพันธุ์กับเมทาคริลเลตไฮยาลูโรนิกแอซิดไฮโดรเจลที่ก่อตัวด้วยปฏิกิริยาเคมีโดยทำการเลี้ยงด้วยวิธีการห่อหุ้มเซลล์ด้วยไฮโดรเจลผลที่ได้คือเซลล์กระดูกเบาพันธุ์เจริญเติบโตได้ดีในช่วงวันที่ 1-7 ของการทดสอบซึ่งแตกต่างจากการศึกษาในครั้งนี้ โดยการศึกษาของ Areevijit ได้ใช้เมทาคริลเลตไฮยาลูโรนิกแอซิดที่มีอัตราการปรับปรุงโครงสร้างอยู่ที่ 42%-62% ซึ่งด้วยอัตราการปรับปรุงโครงสร้างที่แตกต่างกันอาจมีผลต่อการยึดเกาะและเจริญเติบโตของเซลล์

ข้อมูลจากการศึกษาในครั้งนี้สามารถใช้ในการพัฒนาเมทาคริลเลตไฮยาลูโรนิกแอซิดไฮโดรเจลชนิดก่อตัวด้วยแสงในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อเพื่อประยุกต์เป็นวัสดุขนส่งเซลล์ ด้วยหรือสารกระตุ้น เพื่อการประยุกต์ใช้สำหรับงานพันธุวิศวกรรมเนื้อเยื่อต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- Alvarez-Lorenzo, C., & Concheiro, A. (2008). Intelligent drug delivery systems: polymeric micelles and hydrogels. *Mini Rev Med Chem*, 8(11), 1065-1074.
doi:10.2174/138955708785909952



- Areevijit, K., Dhaneuan, N., Luckanagul, J. A., & Rungsiyanont, S. (2021). Biocompatibility study of modified injectable hyaluronic acid hydrogel with mannitol/BSA to alveolar bone cells. *J Biomater Appl*, 35(10), 1294-1303.
doi:10.1177/0885328220971746
- Berridge, M. V., Herst, P. M., & Tan, A. S. (2005). Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnol Annu Rev*, 11, 127-152.
doi:10.1016/s1387-2656(05)11004-7
- Berthiaume, F., Maguire, T. J., & Yarmush, M. L. (2011). Tissue engineering and regenerative medicine: history, progress, and challenges. *Annu Rev Chem Biomol Eng*, 2, 403-430. doi:10.1146/annurev-chembioeng-061010-114257
- Brittberg, M., Lindahl, A., Nilsson, A., Ohlsson, C., Isaksson, O., & Peterson, L. (1994). Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med*, 331(14), 889-895.
doi:10.1056/nejm199410063311401
- Chaopanitcharoen P, D. N., Luckanagul J, Rungsiyanont S. (2021). The Development of Blue Light Initiated Photopolymerized Hyaluronic Acid Based Hydrogel. *Proceeding in 9th Kasetsart University National Research*.
- Chircov, C., Grumezescu, A. M., & Bejenaru, L. E. (2018). Hyaluronic acid-based scaffolds for tissue engineering. *Rom J Morphol Embryol*, 59(1), 71-76.
- de Fries, R., & Mitsunashi, M. (1995). Quantification of mitogen induced human lymphocyte proliferation: comparison of alamarBlue assay to 3H-thymidine incorporation assay. *J Clin Lab Anal*, 9(2), 89-95. doi:10.1002/jcla.1860090203
- Edmondson, R., Broglie, J. J., Adcock, A. F., & Yang, L. (2014). Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. *Assay Drug Dev Technol*, 12(4), 207-218. doi:10.1089/adt.2014.573
- Gao, W., Zhang, Y., Zhang, Q., & Zhang, L. (2016). Nanoparticle-Hydrogel: A Hybrid Biomaterial System for Localized Drug Delivery. *Ann Biomed Eng*, 44(6), 2049-2061. doi:10.1007/s10439-016-1583-9
- Gonzalez, R. J., & Tarloff, J. B. (2001). Evaluation of hepatic subcellular fractions for Alamar blue and MTT reductase activity. *Toxicol In Vitro*, 15(3), 257-259.
doi:10.1016/s0887-2333(01)00014-5



- Hockberger, P. E., Skimina, T. A., Centonze, V. E., Lavin, C., Chu, S., Dadras, S., . . . White, J. G. (1999). Activation of flavin-containing oxidases underlies light-induced production of H₂O₂ in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(11), 6255-6260. doi:10.1073/pnas.96.11.6255
- McMillian, M. K., Li, L., Parker, J. B., Patel, L., Zhong, Z., Gunnett, J. W., . . . Johnson, M. D. (2002). An improved resazurin-based cytotoxicity assay for hepatic cells. *Cell Biol Toxicol*, 18(3), 157-173. doi:10.1023/a:1015559603643
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 65(1-2), 55-63. doi:10.1016/0022-1759(83)90303-4
- O'Brien, J., Wilson, I., Orton, T., & Pognan, F. (2000). Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem*, 267(17), 5421-5426. doi:10.1046/j.1432-1327.2000.01606.x
- Präbst, K., Engelhardt, H., Ringgeler, S., & Hübner, H. (2017). Basic Colorimetric Proliferation Assays: MTT, WST, and Resazurin. *Methods Mol Biol*, 1601, 1-17. doi:10.1007/978-1-4939-6960-9_1
- Ragain, J. C., Jr., Brodine, B. A., Zheng, Q., Blen, B. J., Garcia-Godoy, F., & Zhang, Y. H. (2021). Effects of curing lights on human gingival epithelial cell proliferation. *J Am Dent Assoc*, 152(4), 260-268. doi:10.1016/j.adaj.2020.12.006
- Rampersad, S. N. (2012). Multiple applications of Alamar Blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. *Sensors (Basel)*, 12(9), 12347-12360. doi:10.3390/s120912347
- Riss, T. L., & Moravec, R. A. (2004). Use of multiple assay endpoints to investigate the effects of incubation time, dose of toxin, and plating density in cell-based cytotoxicity assays. *Assay Drug Dev Technol*, 2(1), 51-62. doi:10.1089/154065804322966315
- Thamonwan Langlongsathit, W. S., Orakot Leysak, Rudee Surarit, Pirasut Rodanant. (2016). The effect of LED light on viability and proliferation of periodontal ligament fibroblast cells. *M Dent J*, 37, 7.
- Trakiattikul N, D. N., Luckanagul JA, Rungsiyanont S. (2018). The Development of Mannitol/BSA Methacrylated Hyaluronic Acid Hydrogels as an Injectable Drug Delivery Platform. *SWU Dent J*, 11, 41-54.



Wang, C., Hao, H., Wang, J., Xue, Y., Huang, J., Ren, K., & Ji, J. (2021). High-throughput hyaluronic acid hydrogel arrays for cell selective adhesion screening. *J Mater Chem B*, 9(19), 4024-4030. doi:10.1039/d1tb00429h