



รายงานการวิจัย

เรื่อง

การศึกษาประสิทธิภาพของแผ่นปิดแผลจากวัสดุเชิงประกอบไฮโดรเจลต่อ
กระบวนการซ่อมแซมของแผลในหนูขาว
**Efficiency of hydrogel-based wound dressings on
wound healing in rats**

โดย

อาจารย์ ดร.ศักรินทร์ ภูพานิล

คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสยาม

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยสยาม

การศึกษาประสิทธิภาพของแผ่นปิดแผลจากวัสดุเชิงประกอบไฮโดรเจลต่อ
กระบวนการซ่อมแซมของแผลในหนูขาว
**Efficiency of hydrogel-based wound dressings on
wound healing in rats**



ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยสยาม

ชื่อโครงการ การศึกษาประสิทธิภาพของแผ่นปิดแผลจากวัสดุเชิงประกอบไฮโดรเจลต่อ
กระบวนการซ่อมแซมของแผลในหนูขาว

ผู้วิจัย

1. ดร.ศักรินทร์ ภูพานิต คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสยาม
2. ดร.ศราวุธ ลาภมณีย์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสยาม
3. ดร.คทาวุธ นามดี ศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ
4. ดร.มัตถกา คงขาว ศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ
5. ผศ.ดร.ศิรินันท์ กุลชาติ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
6. รศ.ดร.ประพิมพรรณ วงศ์จิตรรัตน์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล

บทคัดย่อ

การศึกษาวัสดุชีวภาพทางการแพทย์ได้รับการพัฒนาอย่างต่อเนื่องโดยเฉพาะอย่างยิ่ง วัสดุเชิงประกอบไฮโดรเจลร่วมกับอนุภาคนาโนในการรักษาและฟื้นฟูจากการบาดเจ็บ คณะวิจัยได้สังเคราะห์ไฮโดรเจลอนุภาคเงินนาโนที่สามารถลดการเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย จึงได้พัฒนาไฮโดรเจลที่มีส่วนประกอบสารเคอร์คูมินห่อหุ้มอนุภาคเงินนาโน อย่างไรก็ตามยังไม่มีหลักฐานเกี่ยวกับความปลอดภัยและประสิทธิภาพในการสมานแผล เซลล์ผิวหนังไฟโบรบลาสต์มนุษย์เพาะเลี้ยงถูกนำมาบ่มด้วยสารเคอร์คูมินห่อหุ้มอนุภาคเงินนาโน จากนั้นประเมินความเป็นพิษ การเพิ่มจำนวนเซลล์ การสร้างคอลลาเจน และอัตราการสมานแผล นอกจากนี้สารเคอร์คูมินห่อหุ้มอนุภาคเงินนาโนไฮโดรเจลถูกนำมารักษาแผลเปิดที่ผิวหนังของหนูแรทและศึกษาการติดเชื้อแบคทีเรีย โครงสร้างผิวหนังในระดับจุลภาคและกลไกระดับโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับการสมานแผล ผลการศึกษาพบว่าสารเคอร์คูมินห่อหุ้มอนุภาคเงินนาโนมีความเป็นพิษต่ำ เพิ่มจำนวนเซลล์ การปิดแผล และการสร้างคอลลาเจนในเซลล์ผิวหนังไฟโบรบลาสต์เพาะเลี้ยง นอกจากนี้สารเคอร์คูมินห่อหุ้มอนุภาคเงินนาโนไฮโดรเจลสามารถลดจำนวนเชื้อแบคทีเรียและทำให้เกิดการสมานแผลด้วยการปรับปริมาณเซลล์ชักนำการอักเสบและการสะสมคอลลาเจนผ่านการแสดงออกของยีนควบคุมการสมานแผล ได้แก่ IL-6, EGF, collagen 1, collagen 3, FGF2 และ TGF- β 1 ภายหลังได้รับการรักษาในวันที่ 4, 8, 12 และ 16 ผลการศึกษานี้บ่งชี้การนำสู่ขบวนการหายของแผลได้เร็วกว่าแผลฆ่าเชื้อแบคทีเรียทั่วไป ฉะนั้นสารเคอร์คูมินห่อหุ้มอนุภาคเงินนาโนไฮโดรเจลสูตรนี้สามารถเป็นวัสดุชีวภาพสมานแผลที่ไม่มีความเป็นพิษและต้านการติดเชื้อจุลชีพ

คำสำคัญ เคอร์คูมิน, ไฮโดรเจล, การอักเสบ, สมานแผล, แผ่นปิดแผล

Research title EFFICIENCY OF HYDROGEL-BASED WOUND DRESSINGS ON WOUND HEALING IN RATS

Researcher

1. Dr. Sakkarin Bhubhanil, Faculty of Medicine, Siam University
2. Dr. Sarawut Lapmanee, Faculty of Medicine, Siam University
3. Dr. Katawut Namdee, National Nanotechnology Centre
4. Dr. Mattaka Kongkow, National Nanotechnology Centre
5. Asst. Prof. Dr. Sirinan Kulchat, Department of Chemistry, Faculty of Science, Khon Kaen University
6. Assoc. Prof. Dr. Prapimpun Wongchitrat, Faculty of Medical Technology, Mahidol University

ABSTRACT

Medical biomaterials are continuously being developed, especially hydrogel composites with nanoparticles for recovery after injury. The recent study has developed hydrogel mixed silver nanoparticles to reduce bacteria growth. We further synthesize hydrogels combined curcumin-loaded silver nanoparticles (Cur-AgNP); however, still remains no evidence regarding biosafety and wound healing efficacy *in vitro* and *in vivo* studies. Human dermal fibroblasts were incubated Cur-AgNPs and evaluated cell toxicity, cell proliferation, collagen production and wound contraction rate. In addition, Cur-AgNP hydrogels were treated on rat skin excision wounds to determine bacterial contamination, skin histology and molecular mechanisms related wound healing. The results found that Cur-AgNPs exhibited low cytotoxicity and enhance proliferation, gap filling, collagen production and wound healing in dermal fibroblast cell culture. Furthermore, Cur-AgNP hydrogels could reduce bacterial colonies and promoted wound healing with modulation of inflammatory markers and collagen deposition through the expression of gene regulated wound healing (i.e., IL-6, EGF, collagen 1, collagen 3, FGF2 and TGF- β 1) on days 4, 8, 12, and 16 after treatment. These results indicated that Cur-AgNP hydrogels could improve wound healing faster than common antibacterial gels. In conclusion, the formulation of this Cur-AgNP hydrogel is an effective wound healing biomaterial with non-toxicity and antimicrobial effects.

Keywords: curcumin, hydrogel, inflammation, wound healing, wound dressing

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยสำเร็จลุล่วงได้ตามความมุ่งหมาย ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.ศิรินันท์ กุลชาติ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น และ รศ.ดร.ประพิมพ์พรรณ วงศ์จิตรรัตน์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ให้ความช่วยเหลือในการสังเคราะห์สารและวิเคราะห์ข้อมูลด้วยเครื่องมือวิจัยขั้นสูงและให้คำแนะนำซึ่งเป็นประโยชน์ในการทำวิจัยเป็นอย่างสูง

อีกทั้งขอขอบพระคุณอนุกรรมการจรรยาบรรณการวิจัยในสัตว์ และคณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและใช้สัตว์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ในอนุมัติให้ดำเนินงานวิจัย รวมทั้ง น.สพ. วีรยุทธ ยังมีมา สัตวแพทย์ และนางสาวสิริวรรณ ศรีวงศ์ นักวิทยาศาสตร์ ศูนย์สัตว์ทดลอง มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ที่ให้ความช่วยเหลือด้านสัตว์ทดลอง

ผู้วิจัยขอขอบคุณผู้ร่วมวิจัย ดร.มัตถกา คงขาว และ ดร.กทาวุธ นามดี นักวิจัยห้องปฏิบัติการนาโนเวชสำอาง ศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ และอาจารย์ ดร.ศราวุธ ลาภมณีย์ สาขาชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสยาม ในการสนับสนุนงานวิจัยนี้ให้ประสบความสำเร็จ

นอกจากนี้ผู้วิจัยขอขอบพระคุณทุนอุดหนุนการวิจัย สำนักส่งเสริมและพัฒนางานวิจัย ปีการศึกษา 2562 และทุนสมทบการวิจัยเพิ่มเติม คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสยาม ปีการศึกษา 2563 ในการส่งเสริมและสนับสนุนทุนวิจัยครั้งนี้

อาจารย์ ดร.ศักรินทร์ ภูพานิล

สารบัญ

| | หน้า |
|--|------|
| บทคัดย่อภาษาไทย | ก |
| บทคัดย่อภาษาอังกฤษ | ข |
| กิตติกรรมประกาศ | ค |
| สารบัญ | ง |
| สารบัญตาราง | ฉ |
| สารบัญภาพ | ช |
| บทที่ 1 บทนำ | |
| หลักการและเหตุผล | 1 |
| วัตถุประสงค์การวิจัย | 2 |
| กรอบแนวคิดการวิจัย | 2 |
| สมมติฐานการวิจัย | 3 |
| ขอบเขตของการวิจัย | 3 |
| นิยามศัพท์เฉพาะ | 4 |
| ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ | 4 |
| บทที่ 2 วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง | |
| คุณสมบัติและการพัฒนาไฮโดรเจล | 5 |
| แผลและกระบวนการซ่อมแซมของแผล | 12 |
| บทที่ 3 การดำเนินการวิจัย | |
| วิธีการสังเคราะห์ไฮโดรเจล | 15 |
| สัตว์ทดลอง | 16 |
| การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนังไฟโบรบลาสต์ | 17 |
| การศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์ผิวหนังเพาะเลี้ยง | 18 |
| การศึกษาปริมาณคอลลาเจนด้วยวิธี Sirius red staining | 18 |
| การสลับหนูและการเก็บอวัยวะตัวอย่าง | 19 |

สารบัญ (ต่อ)

| | หน้า |
|--|------|
| การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างผิวหนังระดับจุลภาค..... | 19 |
| การศึกษาการเปลี่ยนแปลงระดับโมเลกุล..... | 19 |
| สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล..... | 20 |
| บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล | |
| ผลของสารเคอร์คูมินอนุภาคเงินนาโนต่อความเป็นพิษ การเพิ่มจำนวนเซลล์..... | 21 |
| และการสร้างคอลลาเจนเซลล์ในเนื้อเยื่อผิวหนังมนุษย์เพาะเลี้ยง | |
| ผลของสารเคอร์คูมินอนุภาคเงินนาโนต่อการปิดและการสมานแผล..... | 23 |
| ในเซลล์เนื้อเยื่อผิวหนังมนุษย์เพาะเลี้ยง | |
| ผลของสารเคอร์คูมินอนุภาคเงินนาโนไฮโดรเจลต่อการสมานแผล..... | 24 |
| และการต้านเชื้อแบคทีเรียที่แผลผิวหนังสัตว์ทดลอง | |
| ผลของสารเคอร์คูมินอนุภาคเงินนาโนไฮโดรเจลต่อการเปลี่ยนแปลง..... | 26 |
| พยาธิวิทยาของการสมานแผลที่ผิวหนังสัตว์ทดลอง | |
| ผลของสารเคอร์คูมินอนุภาคเงินนาโนไฮโดรเจลต่ออินซูลินส่งเสริมและ..... | 30 |
| ควบคุมการสมานแผลที่ผิวหนังสัตว์ทดลอง | |
| บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ | |
| สรุปผลการวิจัย..... | 32 |
| อภิปรายผล..... | 33 |
| ข้อเสนอแนะ..... | 36 |
| บรรณานุกรม..... | 37 |
| ภาคผนวก | |
| ก หนังสืออนุมัติการพิจารณาจรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลอง..... | 43 |
| ข การตีพิมพ์เผยแพร่บทความวิจัย..... | 45 |
| ประวัติผู้วิจัย..... | 47 |

สารบัญตาราง

| | หน้า |
|---|------|
| ตารางที่ 3.1 ความเข้มข้นที่แตกต่างกันของ Cur-AgNPs ในการเตรียมไฮโดรเจล..... | 15 |
| ตารางที่ 3.2 Primers used in qPCR..... | 20 |



สารบัญภาพ

| | หน้า |
|------------|--|
| ภาพที่ 1.1 | แผนผังตัวแปรต้นและตัวแปรตามของงานวิจัย 2 |
| ภาพที่ 1.2 | ขอบเขตและคำถามของการวิจัย..... 3 |
| ภาพที่ 2.1 | การซ่อมแซมตัวเองได้ของวัสดุที่ใช้หลักการของ CDC..... 6 |
| ภาพที่ 2.2 | พันธะและอันตรกิริยาต่างที่ใช้เป็นหมู่ฟังก์ชันในกระบวนการซ่อมแซมตัวเอง..... 6 |
| ภาพที่ 2.3 | การเตรียมอนุภาคเงินนาโนในแก้วร็กัม..... 7 |
| ภาพที่ 2.4 | การตอบสนองต่อสิ่งเร้าภายนอกของไฮโดรเจลที่มีอนุภาคเงินนาโนในแก้วร็กัม..... 8 |
| ภาพที่ 2.5 | การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของฟิล์มสังเคราะห์..... 9 |
| ภาพที่ 2.6 | การเกิดกระบวนการซ่อมแซมตัวเอง..... 10 |
| ภาพที่ 2.7 | ภาพถ่ายจากกล้องอิเล็กตรอนแบบส่องผ่านของ multiwalled carbon nanotube..... 10 |
| ภาพที่ 2.8 | การเกิดพอลิเมอร์ด้วย bridge mechanism..... 11 |
| ภาพที่ 2.9 | กระบวนการและระยะเวลาการหายของแผล..... 14 |
| ภาพที่ 4.1 | ผลของสารเคอร์คูมินอนุภาคเงินนาโนต่อความเป็นพิษ การเพิ่มจำนวนเซลล์ และการสร้างคอลลาเจนเซลล์ในเนื้อเยื่อผิวหนังมนุษย์เพาะเลี้ยง..... 23 |
| ภาพที่ 4.2 | ผลของสารเคอร์คูมินอนุภาคเงินนาโนต่อการสมานแผลในเซลล์เนื้อเยื่อ ผิวหนังมนุษย์เพาะเลี้ยง..... 24 |
| ภาพที่ 4.3 | ผลของสารเคอร์คูมินอนุภาคเงินนาโนไฮโดรเจลต่อการสมานแผล..... 25 และการต้านเชื้อแบคทีเรียที่แผลผิวหนังสัตว์ทดลอง |
| ภาพที่ 4.4 | ผลของสารเคอร์คูมินอนุภาคเงินนาโนไฮโดรเจลต่อการเปลี่ยนแปลง..... 27 พยาธิวิทยาของการสมานแผลที่ผิวหนังสัตว์ทดลอง |
| ภาพที่ 4.5 | ผลของสารเคอร์คูมินอนุภาคเงินนาโนไฮโดรเจลต่อการสร้างเยื่อผิวใหม่..... 28 ของการสมานแผลที่ผิวหนังสัตว์ทดลอง |
| ภาพที่ 4.6 | ผลของสารเคอร์คูมินอนุภาคเงินนาโนไฮโดรเจลต่อการสะสมของเส้นใย..... 29 คอลลาเจนของการสมานแผลที่ผิวหนังสัตว์ทดลอง |
| ภาพที่ 4.7 | ผลของสารเคอร์คูมินอนุภาคเงินนาโนไฮโดรเจลต่ออินซูลินและ..... 31 ควบคุมการสมานแผลที่ผิวหนังสัตว์ทดลอง |
| ภาพที่ 5.1 | สรุปขั้นตอนการวิจัย..... 32 |

บทที่ 1

บทนำ

1.1 หลักการและเหตุผล

การติดเชื้อของบาดแผล เป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ผู้ป่วยที่ได้รับบาดเจ็บหรือเข้ารับการรักษา มีภาวะแทรกซ้อนและเสียชีวิต แม้ว่าปัจจุบันมียาปฏิชีวนะที่ออกฤทธิ์อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น แต่ยังคงพบความผิดปกติในการหายของบาดแผล ซึ่งนำไปสู่ความพิการ ทูพลภาพ รวมทั้งการตายของผู้ป่วยได้ ฉะนั้นการพัฒนาแผ่นปิดแผลทำมาจากวัสดุเชิงประกอบและอนุภาคนาโนอาจเป็นทางเลือกในการรักษาและลดภาวะแผลติดเชื้อจึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจ

ในปัจจุบันนี้มีหลายกลุ่มวิจัยที่ได้ศึกษาเกี่ยวกับ “เจล” ซึ่งเป็นโครงสร้างที่เป็นคล้ายของแข็ง และแสดงคุณสมบัติต่าง ๆ เช่น คุณสมบัติเชิงกลคล้ายของแข็ง เช่น ไฮโดรเจลสามารถพองตัวได้เมื่อมีน้ำ (Osada & Gong, 1998) ในขณะที่เจลตัวอื่นที่เป็นไฮโดรโพลีเมอร์เจลสามารถพองตัวได้เมื่อมีตัวทำละลายอินทรีย์ เรียกว่า ออแกโนเจล (Abdallah & Weiss, 2000; Vintiloiu & Leroux, 2008) นอกจากนี้ยังมีพัฒนาไฮโดรเจลที่มีคุณสมบัติพิเศษต่าง ๆ ที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้ในงานหลายงาน เช่น เซนเซอร์ แอคชูเอเตอร์ (actuators) เซลล์หรือระบบขนส่งยา การตัดต่อเนื้อเยื่อ และในงานทางการแพทย์ทั่วไป (Hoffman 2013; Lee & Mooney et al., 2001) ดังนั้นนักวิจัยจึงพัฒนาไฮโดรเจลให้เป็นเจลอัจฉริยะ (smart gel) ที่สามารถซ่อมแซมตัวเองได้ (self-healing) เมื่อไฮโดรเจลถูกทำลาย มันจะสามารถกลับคืนมาสู่รูปร่างปกติเหมือนเดิมได้ เช่น ไฮโดรเจลที่สามารถซ่อมแซมตัวเองได้ภายใต้สภาวะที่เป็นกรดผ่านการเกิดพันธะไฮโดรเจน จากคุณสมบัติของไฮโดรเจลที่สามารถซ่อมแซมตัวเองได้นี้ ทำให้ซ่อมแซมกระเพาะอาหารได้ด้วยหลักการของเคมีคอนสติตูชันไดนามิก (constitutional dynamic chemistry; CDC) ซึ่ง CDC ประกอบรอบคลุมทั้งพันธะโคเวเลนต์และนอนโคเวเลนต์ ซึ่งมีหมู่ฟังก์ชันที่สามารถผันกลับได้ และมีความเป็นไดนามิก (Phadke et al., 2012) ดังนั้น โครงการวิจัยนี้จึงออกแบบและสังเคราะห์ไฮโดรเจลอัจฉริยะ (smart hydrogel) ที่มีคุณสมบัติซ่อมแซมตัวเองได้โดยใช้วัสดุเชิงชีวภาพที่ไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม แล้วนำมาประยุกต์ใช้เป็นแผ่นปิดแผลในการรักษาและซ่อมแซมแผลที่ได้รับบาดเจ็บ ทั้งนี้การศึกษาประสิทธิภาพของแผ่นปิดแผลจากสารเชิงประกอบไฮโดรเจลต่อกระบวนการซ่อมแซมแผลนั้น มีกลไกที่ซับซ้อนและยังมีไม่ข้อสรุปที่แน่ชัด

คณะวิจัยจึงทำให้มีความจำเป็นต้องทำการศึกษาในสัตว์ทดลองและทำการศึกษาในหนูขาวเพศผู้ สายพันธุ์วีสตาร์ ซึ่งได้รับยาลดปวดร่วมกับเจลสมานแผลมาตรฐานหรือเจลสมานแผลสารเชิง

ประกอบไฮโดรเจล หนูทุกตัวถูกประเมินลักษณะและอัตราการซ่อมแซมของแผล เมื่อครบระยะเวลาการศึกษา สัตว์ทดลองถูกทำให้ตายอย่างสงบด้วยยาสลบ แล้วทำการเก็บเนื้อเยื่อรอบแผล และแผลเพื่อนำไปวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลง โครงสร้างระดับจุลภาคด้วยการย้อมเนื้อเยื่อ รวมทั้งปริมาณยีนส่งเสริมและควบคุมการสมานแผล (Jing et al., 2017; Thangavel et al., 2017)

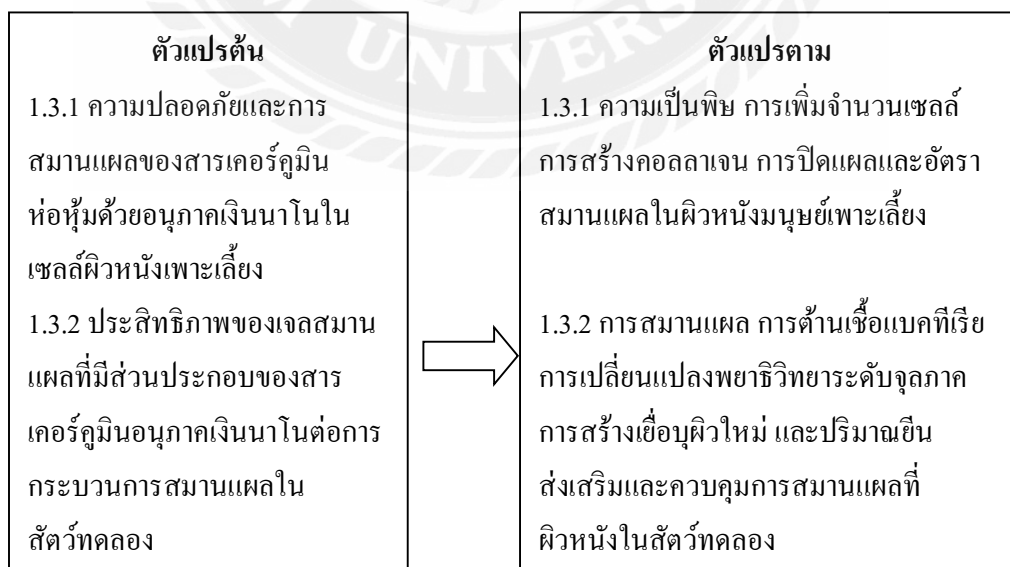
ฉะนั้นการศึกษาประสิทธิภาพของแผ่นปิดแผลจากสารเชิงประกอบไฮโดรเจลต่อกระบวนการซ่อมแซมแผลในสัตว์ทดลองจึงมีคุณค่าและเป็นประโยชน์ในการรักษาและศึกษากลไกการซ่อมแซมของแผล ทั้งนี้แผ่นปิดแผลที่สังเคราะห์ด้วยวัสดุชีวภาพอาจเป็นทางเลือกหนึ่งที่มีประสิทธิภาพและนำมาใช้ในการรักษาทางการแพทย์ เช่น แผลที่เกิดจากการกดทับและโรคเบาหวานในผู้สูงอายุ เป็นต้น

1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย

1.2.1 เพื่อสังเคราะห์ไฮโดรเจลที่มีวัสดุเชิงชีวภาพเป็นสารประกอบพื้นฐานและพิสูจน์เอกลักษณ์ของไฮโดรเจลที่เหมาะสมในการเกิดกระบวนการซ่อมแซมตัวเอง

1.2.2 เพื่อศึกษาความปลอดภัยและเปรียบเทียบประสิทธิภาพเจลสมานแผลจากวัสดุเชิงชีวภาพไฮโดรเจลต่อการซ่อมแซมแผลในเซลล์ผิวหนังเพาะเลี้ยงและสัตว์ทดลอง

1.3 กรอบแนวคิดการวิจัย



ภาพที่ 1.1 แผนผังตัวแปรต้นและตัวแปรตามของงานวิจัย

1.4 สมมติฐานการวิจัย

การสังเคราะห์สารเคอร์คูมินห่อหุ้มด้วยอนุภาคเงินนาโนไฮโดรเจลมีความปลอดภัย และช่วยส่งเสริมการสมานแผลได้ดีกว่าเจลสมานแผลทั่วไป โดยมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย และเร่งกระบวนการสมานแผลที่มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างระดับจุลภาคและระดับโมกุล

1.5 ขอบเขตของการวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการวิจัยเชิงทดลองโดยนำไฮโดรเจลสังเคราะห์ที่ส่วนประกอบของ สารเคอร์คูมิน ห่อหุ้มด้วยอนุภาคเงินนาโนจากห้องปฏิบัติการเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น มาทำการศึกษาในเซลล์ผิวหนังเพาะเลี้ยงและสัตว์ทดลอง ซึ่งดำเนินการเลี้ยง สัตว์ทดลองที่ศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ และศูนย์สัตว์ทดลองมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ โครงการวิจัยนี้ศึกษาผลของการใช้ไฮโดรเจลต่อการรักษาบาดแผลในหนูขาวเพศผู้ ทำการบันทึกภาพการเปลี่ยนแปลงของแผลในวันที่ 0, 4, 8, 12 และ 16 ของการเกิดแผล จากนั้นทำการสลับสัตว์ทดลอง เพื่อเก็บเลือดและเนื้อเยื่อบริเวณบาดแผลเพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงระดับเนื้อเยื่อและโมเลกุล ตามวัตถุประสงค์และคำถามของงานวิจัย (ภาพที่ 1.2) อวัยวะตัวอย่างและสิ่งส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการ ถูกนำมาวิเคราะห์ที่ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล และคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสยาม ตามลำดับ



ภาพที่ 1.2 ขอบเขตและคำถามของการวิจัย

1.6 นิยามศัพท์เฉพาะ

1.6.1 ไฮโดรเจลอัจฉริยะ (smart hydrogel) คือ เจลที่มีคุณสมบัติเป็นวัสดุเชิงชีวภาพที่ไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม และนำมาประยุกต์ใช้เป็นแผ่นปิดแผลในการรักษาและซ่อมแซมแผลที่ได้รับบาดเจ็บ

1.6.2 แผล (wound) คือ การฉีกขาดของเนื้อเยื่อตั้งแต่ชั้นผิวหนังจนถึงชั้น ไขมันแต่ไม่ถึงระดับของกล้ามเนื้อ

1.6.3 การหายของแผล (wound healing) การเชื่อมต่อเนื้อเยื่อภายใต้บาดแผล

1.7 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.7.1 ข้อมูลพื้นฐานการพัฒนาผลิตภัณฑ์แผ่นปิดแผลจากวัสดุเชิงประกอบไฮโดรเจล ซึ่งสามารถนำมารักษาผู้ป่วยในการสมานแผลที่ได้รับบาดเจ็บ

1.7.2 เกิดองค์ความรู้ใหม่เกี่ยวกับการพัฒนาองค์ประกอบและวิธีการสังเคราะห์แผ่นปิดแผลจากวัสดุชีวภาพไฮโดรเจลที่มีความปลอดภัยและมีประสิทธิภาพในการสมานแผล

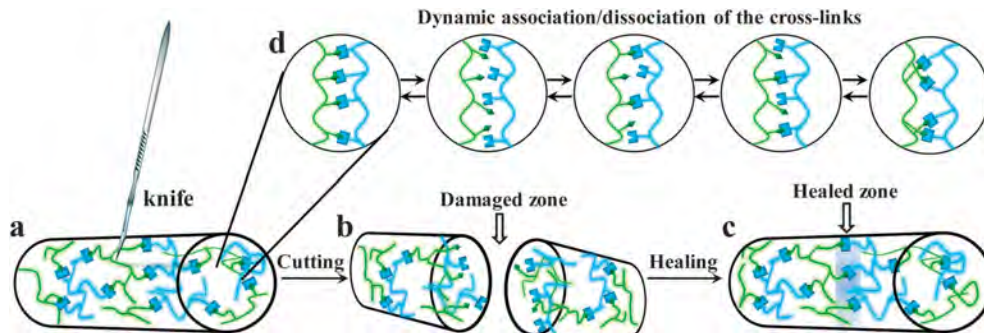
บทที่ 2

วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 คุณสมบัติและการพัฒนาไฮโดรเจล

ในปัจจุบันนี้มีหลายกลุ่มวิจัยที่ได้ศึกษาเกี่ยวกับ “เจล” ซึ่งเป็นโครงสร้างที่เป็นคล้ายของแข็ง และแสดงคุณสมบัติต่าง ๆ เช่น คุณสมบัติเชิงกลคล้ายของแข็ง เช่น ไฮโดรเจลสามารถพองตัวได้เมื่อมีน้ำ (Osada & Gong, 1998) ในขณะที่เจลตัวอื่น ที่เป็นไฮโดรโพลิก พอลิเมอร์เจลสามารถพองตัวได้เมื่อมีตัวทำละลายอินทรีย์ เรียกว่า ออแกโนเจล (Abdallah & Weiss, 2000; Vintiloiu & Leroux, 2008) นอกจากนี้ยังมีคนพัฒนาไฮโดรเจลที่มีคุณสมบัติพิเศษต่าง ๆ ดังนั้นนักวิจัยจึงพัฒนาไฮโดรเจลให้เป็นเจลอัจฉริยะ (smart gel) ภายใต้การตอบสนองของตัวกระตุ้นภายนอก เช่น อุณหภูมิ สนามไฟฟ้า สนามแม่เหล็ก และแสง (Shigekura et al., 2005; Li et al., 2013; Lin et al., 2013; Shin et al., 2013) นอกจากนี้ยังมีคนพัฒนาไฮโดรเจลที่มีคุณสมบัติพิเศษต่าง ๆ ที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้ในงาน เช่น เซนเซอร์ แอคชูเอเตอร์ (actuators) เซลล์หรือระบบขนส่งยา การตัดต่อเนื้อเยื่อ และในงานทางด้านทางการแพทย์ทั่วไป (Lee et al., 2001; Hoffman, 2013) แต่ไฮโดรเจลบางตัวก็ยังมีคุณสมบัติที่ไม่เสถียร ในระดับไมโครหรือแมโคร บางทีอาจจะเป็นเพราะตัวเชื่อมขวางที่อยู่ภายในพอลิเมอร์ของไฮโดรเจล ซึ่งข้อเสียดังนี้ทำให้ไฮโดรเจลใช้งานไม่ได้ไม่คืนัก

ดังนั้นในปัจจุบันก็มีนักวิจัยหลายกลุ่มอีกเช่นกันที่พัฒนาไฮโดรเจลให้เป็นเจลอัจฉริยะที่สามารถซ่อมแซมตัวเองได้ เมื่อไฮโดรเจลถูกทำลาย เจลจะสามารถกลับคืนมาสู่รูปร่างปกติเหมือนเดิมได้ เช่น ไฮโดรเจลที่สามารถซ่อมแซมตัวเองได้ภายใต้สภาวะที่เป็นกรด ผ่านการเกิดพันธะไฮโดรเจน (Phadke et al., 2012) จากคุณสมบัติของไฮโดรเจลที่สามารถซ่อมแซมตัวเองได้นี้ทำให้ซ่อมแซมกระเพาะอาหารได้ และสามารถหลีกเลี่ยงการเกิดกรดแก่สตริก เนื่องมาจากวัสดุตัวนี้มีคุณสมบัติที่ดีในการติดกับเนื้อเยื่อ โดยการที่จะเกิดการซ่อมแซมตัวเองได้ของวัสดุ โดยทั่วไปจะอาศัยหลักการของเคมีคอนสติตูชันไดนามิก (constitutional dynamic chemistry; CDC) ซึ่ง CDC ประกอบครอบคลุมทั้งพันธะโควาเลนต์และนอนโควาเลนต์ คุณสมบัติที่สำคัญของ CDC คือพันธะหรืออันตรกิริยาเหล่านี้สามารถผันกลับได้ โดยสามารถนำมาประยุกต์ใช้ได้กับเครือข่ายของพอลิเมอร์ โดยในการสังเคราะห์พอลิเมอร์เพื่อที่จะทำให้เกิดเป็นวัสดุซ่อมแซมตัวเองได้ จะต้องมีความสัมพันธ์กันที่สามารถผันกลับได้และมีความเป็นไดนามิก (ภาพที่ 2.1) (Wei et al., 2014) กลไกในการเกิดกระบวนการซ่อมแซมตัวเองได้ของวัสดุของเจล ซึ่งใช้หมู่ฟังก์ชันที่แสดงในภาพที่ 2.2 โดยมีทั้งพันธะโควาเลนต์และนอนโควาเลนต์



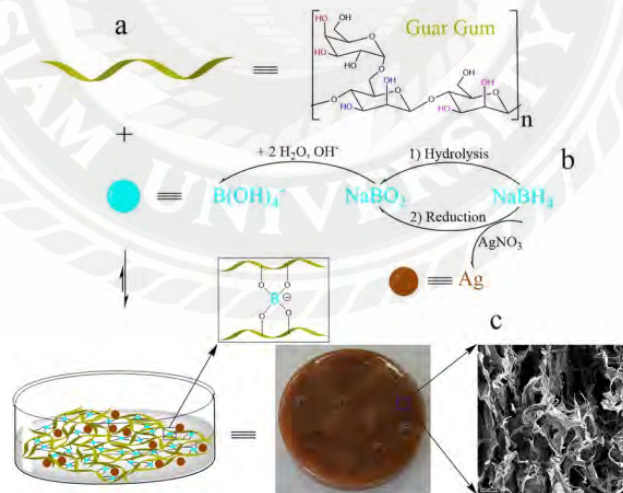
ภาพที่ 2.1 การซ่อมแซมตัวเองได้ของวัสดุที่ใช้หลักการของ CDC (a) วัสดุที่เป็นทรงกระบอกถูกตัดด้วยมีด (b) เจลแยกเป็นสองส่วนที่ยังมีหมู่ฟังก์ชันอยู่ (c) กระบวนการซ่อมแซมตัวเองเกิดขึ้น ณ จุดที่ตัด (d) ภาพขยายของจุดพันธะเชื่อมขวางที่ประกอบไปด้วยพันธะที่สามารถผันกลับได้ (Wei et al., 2014)



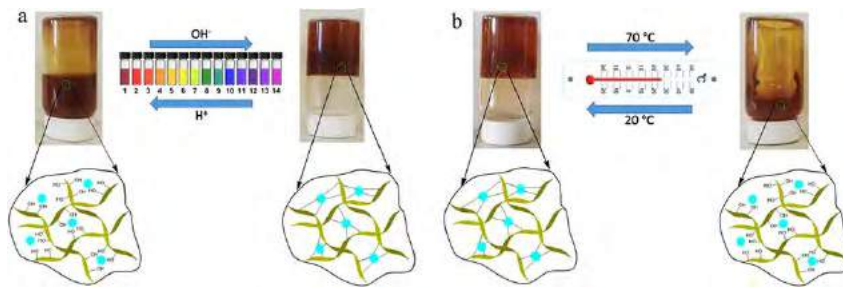
ภาพที่ 2.2 พันธะและอันตรกิริยาต่างที่ใช้เป็นหมู่ฟังก์ชันในกระบวนการซ่อมแซมตัวเอง ที่มีทั้งพันธะโคเวเลนต์ (ด้านล่าง) และนอนโคเวเลนต์ (ด้านบน) โดยอาศัยหลักการ Constitutional dynamic Chemistry (CDC) (Wei et al., 2014)

งานวิจัยนี้ผู้วิจัยได้ทำการออกแบบและได้สังเคราะห์ไฮโดรเจลอัจฉริยะที่มีคุณสมบัติซ่อมแซมตัวเองได้ โดยใช้วัสดุเชิงชีวภาพที่ไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม พร้อมทั้งจะศึกษาคุณสมบัติต่าง ๆ โดยใช้เทคนิคต่าง ๆ ในการศึกษา เช่น IR spectroscopy, Rheology, Scanning Emission Microscopy (SEM) และเทคนิคอื่น ๆ ที่จำเป็น เพื่อที่จะดูคุณสมบัติของวัสดุตัวนี้ว่าเป็นอย่างไร โดยคาดว่างานวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์ต่อการนำไปประยุกต์ใช้ได้ในอนาคต

Dai และคณะ ปี ค.ศ. 2016 ได้รายงานหน้าที่ของไฮโดรเจล โดยสามารถตอบสนองต่อสิ่งเร้าภายนอก คือ กรด/เบส และสามารถแสดงคุณสมบัติการซ่อมแซมตัวเองได้อีกด้วย ในงานวิจัยนี้พวกเขาได้ใช้พอลิเมอร์ที่มาจากธรรมชาติ คือ กัวร์กัม (guar gum, GG) และใช้โซเดียมโบโรไฮไดรด์ (sodium borohydride; NaBH_4) สำหรับสังเคราะห์อนุภาคเงินนาโนที่อยู่ในเจลอัจฉริยะ โดยใช้วิธีที่ง่ายเร็ว และประหยัด ในที่นี้โซเดียมโบโรไฮไดรด์ทำหน้าที่เป็นตัวรีดิวซ์ซิลเวอร์ไนเตรตสำหรับสังเคราะห์อนุภาคเงินนาโน ในขณะที่ โซเดียมเมตาบอเรท (sodium metaborate; NaBO_2) ที่เกิดขึ้นมาจากโซเดียมโบโรไฮไดรด์ จะทำหน้าที่เป็นตัวเชื่อมประสานระหว่างพอลิเมอร์กัวร์กัม ดังแสดงในภาพที่ 2.3 และ 2.4 วัสดุตัวนี้ คือไฮโดรเจลที่มีอนุภาคเงินนาโนและกัวร์กัม (AgNPs/GG hydrogel) มีความเป็นออสติกที่สูงมาก ถ้าถูกตัดจะสามารถกลับคืนมาสู่สภาพเดิม (ซ่อมแซมตัวเองได้) ภายใน 3 นาที ณ อุณหภูมิห้อง (Dai et al., 2016)

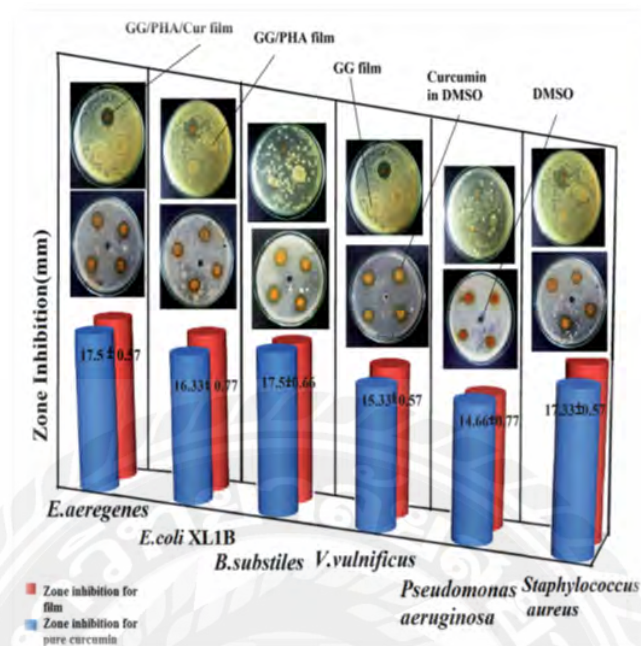


ภาพที่ 2.3 การเตรียมอนุภาคเงินนาโนในกัวร์กัม (a) แผนภาพแสดงการเกิดคริสตัล โดยใช้โซเดียมเมตาบอเรท (b) การเกิดขึ้นของโซเดียมเมตาบอเรท และ อนุภาคเงินนาโน (c) ภาพถ่าย SEM ของอนุภาคเงินนาโนในกัวร์กัม (Dai et al., 2016)



ภาพที่ 2.4 การตอบสนองต่อสิ่งเร้าภายนอกของไฮโดรเจลที่มีอนุภาคเงินนาโนในแก้วร็กัม ในที่นี้คือ pH จะเปลี่ยนสถานะจากโซลเป็นเจล (Dai et al., 2016)

Pramanik และคณะ ปี ค.ศ. 2015 (ภาพที่ 2.5) ได้รายงานการสังเคราะห์แก้วร็กัม/พอลิไฮดรอกซีอัลคานอเอต-เคอร์คิวมิน (guar gum/polyhydroxyalkanoates-curcumin) แบบ “in situ” และได้ทำให้เกิดเป็นฟิล์มโดยการบดรวมกัน (GPCC) ซึ่งสามารถนำไปใช้ได้ในการประยุกต์เป็นที่ปิดแผล เพราะส่วนประกอบเคอร์คิวมินสามารถป้องกันแบคทีเรียได้ นอกจากนี้โมเลกุลเคอร์คิวมินยังสามารถช่วยในกระบวนการซ่อมแซมตัวเองของวัสดุฟิล์มตัวนี้ด้วย ในการพิสูจน์เอกลักษณ์และธรรมชาติของวัสดุตัวนี้ที่ได้จากการบดรวมกัน จะใช้การวิเคราะห์ เช่น FTIR/ATR และ TGA ผลที่ได้พบว่าการบดรวม แก้วร็กัม และ PHBV poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate; PHBV) จะเพิ่มความแข็งแรงถ้าเพิ่มสัดส่วนของโมเลกุล PHBV เนื่องจากมาจากอันตรกิริยานอน-โคเวเลนต์ เช่น พันธะไฮโดรเจนระหว่างโมเลกุลนี้ นอกจากนี้ยังได้ใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนในการวิเคราะห์ความเป็นเนื้อเดียวกันจากการบดผสมและดูพื้นผิวของฟิล์มว่ามีส่วนใดที่สามารถติดกับเซลล์ได้บ้าง ในการศึกษาการต้านเชื้อแบคทีเรียพบว่าฟิล์มนี้มีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียแบบ Gram-positive สูงกว่า Gram-negative (Pramanik et al, 2015)

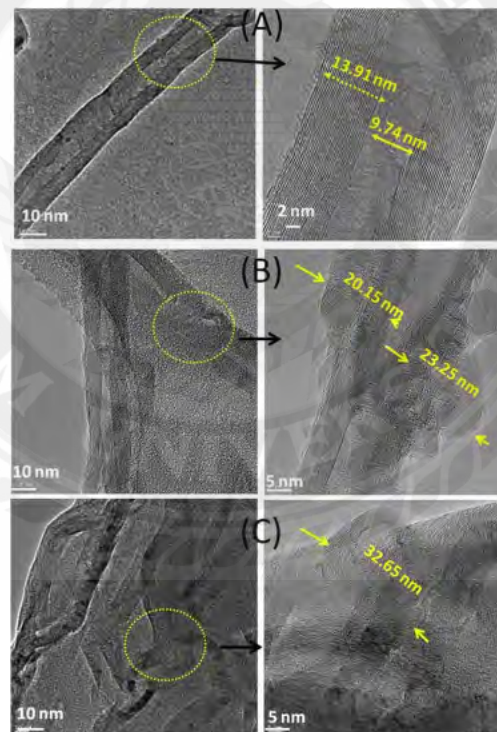


ภาพที่ 2.5 การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของฟิล์มสังเคราะห์ Gram-negative (a) เฉพาะ โมเลกุลเคอร์คิวมิน (b) โมเลกุลเคอร์คิวมินที่อยู่ในฟิล์ม (Pramanik et al, 2015)

Sharma และคณะ ปี ค.ศ. 2013 ได้รายงานการศึกษากัวร์กัมสามารถทำให้เกิดการฟอร์มตัวเป็นอิลาสติกเจลใน 1-butyl-3-methylimidazolium chloride ซึ่งเป็นไอออนิกลิควิด (ionic liquid) ที่ความเข้มข้น 10% w/v พบว่าความแข็งแรงของนาโนคอมโพสิตเจลของกัมจะเพิ่มขึ้นเมื่อเติมวัสดุลูกคาร์บอนนาโนทิว (multiwalled carbon nanotubes; MWCNTs) ในไอออนิกลิควิด เมื่อเจลถูกตัด ดังแสดงภาพที่ 2.6 จะสามารถซ่อมแซมตัวเองได้ทันทีที่อุณหภูมิห้อง โดยไม่มีสิ่งกระตุ้นภายนอก วัสดุตัวนี้กระบวนการซ่อมแซมตัวเองสามารถทำซ้ำได้หลายรอบมาก โดยดูจากธรรมชาติของไซโซโทรปิก (thixotropic) และการคืนตัวของมอดูลัส กับเวลาของแต่ละรอบ โดยสังเกตจากวิธีการวิเคราะห์โดยรีโอโลยี (Rheology) โดยในที่นี้ปฏิกิริยาระหว่างไอออนิกลิควิด กัวร์กัม และวัสดุลูกคาร์บอนนาโนทิว ศึกษาโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM), กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM), FT-IR spectroscopy, powder XRD และ Rheometry ซึ่งจากผลการศึกษาพบว่า ที่อุณหภูมิห้องทำให้อันตรกิริยาแบบอเล็กโตรสแตติก และแรงแวนเดอร์วาลส์ระหว่างไอออนิกลิควิด ช่วยให้เกิดกระบวนการผันกลับได้ของอันตรกิริยาแบบนอนโคเวเลนต์ ทำให้เกิดกระบวนการซ่อมแซมตัวเองเกิดขึ้นได้โดยง่าย (ภาพที่ 2.7) (Sharma et al., 2013)

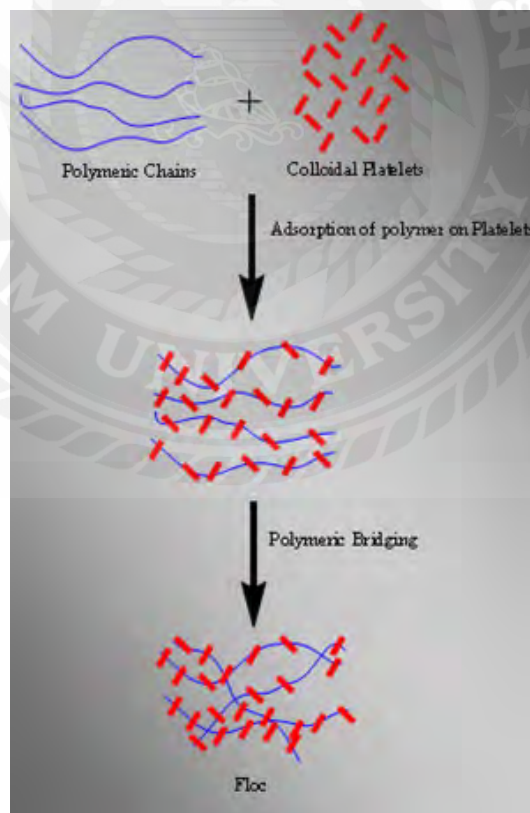


ภาพที่ 2.6 การเกิดกระบวนการซ่อมแซมตัวเอง (a) เจลของกั้วกั้มร์ผสมกับไอออนิกลิควิด (b) เจลของนาโนคอมโพสิตของกั้วกั้ม กับไอออนิกลิควิดและเม็ดตัวอลคาร์บอนนาโนทิวบ์ (Sharma et al., 2013)



ภาพที่ 2.7 ภาพถ่ายจากกล้องอิเล็กตรอนแบบส่องผ่านของ multiwalled carbon nanotube (A) MWCNT บริสุทธิ์ (B) MWCNT ที่ functionalized โดยไอออนิกลิควิด (C) อันตรกิริยาระหว่างกั้วกั้ม และ ไอออนิกลิควิดกับ MWCNT (Sharma et al., 2013)

Nasim และคณะ ปี ค.ศ. 2013 ได้ศึกษาตัวรับกับบริสุทธิ์ และตัวรับที่เป็นโอลิโกเมอร์กับสายโซ่ของพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ สำหรับการกำจัดสารเกาลิน (Kaolin) ที่อยู่ในน้ำเสีย โดยพวกเขาได้ใช้ตัวรับที่หลาย pH และได้ใช้ Dynamic Light Scattering และลดความหนืด โดยใช้ polyelectrolytic (Zeta potential) ของตัวรับที่เปลี่ยนไปตาม pH ที่เปลี่ยนไป เป็นที่น่าสนใจมากคือเมื่อขนาดของโมเลกุลของตัวรับ ไม่สามารถที่จะเพิ่มขึ้นได้เมื่อเพิ่ม zeta potential เนื่องจากแรงระหว่างโมเลกุลที่แข็งแรง และทำให้โมเลกุลเป็นแบบโมเลกุลหดตัวขนาดใหญ่ (Macromolecular recoiling) ระบบ pH ที่เหมาะสมที่สุดในการพองตัวของตัวรับ คือ อยู่ในช่วง 4.0-5.0 ที่เป็นช่วงของ isoelectric point (IEP) ของเกาลินด้วย จากนั้นได้นำตัวรับที่หาสภาวะที่เหมาะสมแล้วไปบดกับสายโซ่ของพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ (polyvinyl alcohol; PVA) ที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 14,000 เพื่อที่จะทำให้เกิดเป็น flocculant พบว่า โอลิโกเมอร์ PVA สามารถเกิดปฏิกิริยาได้ ดังนั้นในงานนี้ตัวรับ-PVA ที่มีมีการบดกับตัวรับบริสุทธิ์จะเกิดการ flocculant เร็วกว่าที่มีเฉพาะ PVA แต่อย่างไรก็ตาม เวลาในการบดของสารประกอบขึ้นอยู่กับตัวรับบริสุทธิ์ด้วย (ภาพที่ 2.8) (Nasim et al., 2013)



ภาพที่ 2.8 การเกิดพอลิเมอร์ด้วยการ bridge mechanism (Nasim et al., 2013)

จากงานวิจัยที่กล่าวมาทั้งหมดซึ่งเกี่ยวข้องกับแก้วกัมที่นำมาใช้เป็นสารที่ใช้สังเคราะห์เป็นพอลิเมอร์และมีตัวอื่นๆ ผสมรวมอยู่ด้วย (composite) อยู่ด้วย เพื่อที่จะใช้ประยุกต์ในงานต่างๆ ไม่ว่าจะเป็นการดูดซับสารที่ไม่พึงประสงค์ การเติมสารอื่นลงไปเพื่อที่จะฆ่าเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งพอลิเมอร์ที่กล่าวมาเบื้องต้นนั้น ล้วนสามารถที่จะมีคุณสมบัติของการซ่อมแซมตัวเองได้อีกด้วย ซึ่งเป็นผลดีมากที่จะนำไปประยุกต์ใช้ได้หลากหลายในอนาคต ดังนั้นในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยจึงได้ใช้แก้วกัมให้เป็นตัวส่วนประกอบอยู่ในงานนี้ด้วยและออกแบบให้โมเลกุลนี้สามารถที่จะซ่อมแซมตัวเองได้ด้วย

2.2 แผลและกระบวนการซ่อมแซมของแผล

การซ่อมแซมหรือหายของแผล (wound Healing) สามารถสังเกตได้จากการมีผิวหนังมาปกคลุมบาดแผลและการเชื่อมต่อน้ำเยื่อภายในบาดแผล โดยทั่วไปแล้วการหายของแผลในสภาพปกติสามารถแบ่งได้เป็น 3 ลักษณะ (Geoffrey, & Victor, 2014) ดังนี้

1. การหายของแผลผ่าตัดที่ไม่มีปัญหาแทรกซ้อน (primary healing) เกิดขึ้น โดยการเย็บขอบแผลเข้าหากัน โดยทันทีหรือ การปิดแผลสดขนาดใหญ่ด้วยการปลูกถ่ายผิวหนังหรือเนื้อจากบริเวณอื่น

2. การหายของแผลที่ถูกปล่อยให้หายเอง (spontaneous closure) โดยแผลจะเคลื่อนเข้าหากัน ด้วยกระบวนการหดตัวของแผล การสร้างเนื้อเยื่อแกรนูเลชัน การสร้างเยื่อผิวหนัง และเกิดเป็นแผลเป็น (scar formation)

3. การหายของแผลเกิดหลังจากเกิดบาดแผลหลายวัน (tertiary healing) การรักษาแผลโดยไม่ปิดเนื้อเยื่อก่อนในช่วงแรกและค่อยปิดเนื้อเยื่อเข้าด้วยกัน ซึ่งแผลเริ่มมีการสร้างชั้นเนื้อเยื่อแกรนูเลชัน (granulations)

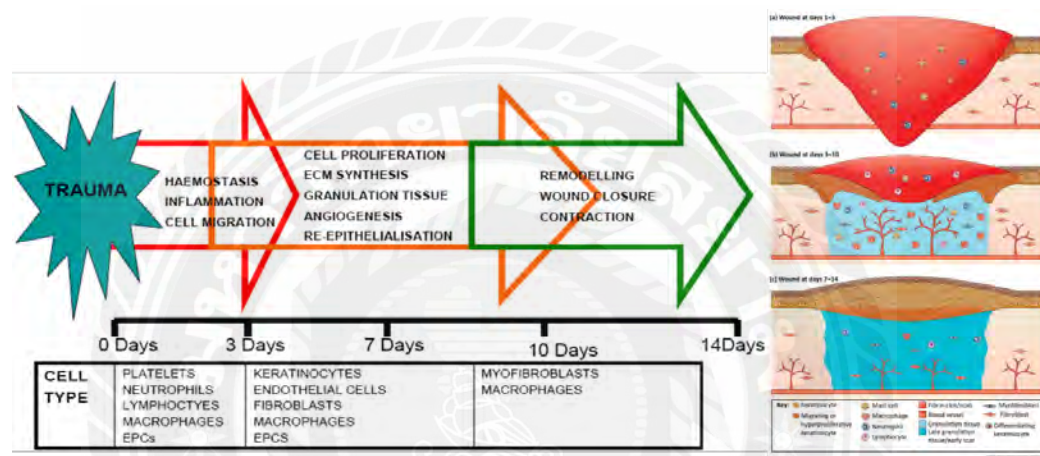
กระบวนการซ่อมแซมของแผล ประกอบด้วย 3 ระยะ (Chandan & Sashwati, 2013; Ursula, et al., 2013) (ภาพที่ 2.9)

1. **ระยะการอักเสบ (inflammatory phase)** คือ ระยะที่ร่างกายกำจัดเนื้อตายและป้องกันการติดเชื้อไม่ให้ลุกลาม กระบวนการอักเสบเกิดขึ้นทันทีเมื่อเกิดแผล โดยเริ่มจากการห้ามเลือด (hemostasis) เมื่อเกิดแผลขึ้น โปรตีน fibrillary collagen และสาร tissue factor ในร่างกายจะกระตุ้นให้เกิดกลไกการแข็งตัวของเลือด หลอดเลือดที่บิดขาดจะกระตุ้นให้เกิดเกล็ดเลือดเกิดการจับตัวกัน (platelet clump and aggregation) เพื่อห้ามเลือด โดยในระยะนี้เกล็ดเลือดจะหลั่ง growth factors ร่วมด้วยเช่น platelet-derived growth factor (PDGF) และ transforming growth factor P(TGF-p) กระบวนการนี้ทำให้ fibrinogen เปลี่ยนเป็น fibrin และกลายเป็นร่างแห ทำให้มีการห้ามเลือดและในเดียวกัน inflammatory cells ต่างๆก็ถูกกระตุ้นให้มาที่บริเวณบาดแผล โดยเซลล์เม็ดเลือดขาว neutrophils ซึ่ง

จะมาภายใน 2 วันแรกหลังเกิดแผล ทำหน้าที่กำจัดเนื้อตายโดยกระบวนการ phagocytosis และป้องกันการติดเชื้อ อีกทั้งยังหลั่ง protease เพื่อช่วยให้ย่อย extracellular matrix (ECM) เหมาะสมแก่การหายของแผล ถัดมาเซลล์เม็ดเลือดขาว monocytes และ macrophages ซึ่งจะเข้ามาหลังเกิดแผล 48-72 ชั่วโมง โดยเซลล์เม็ดเลือดขาว monocyte จะถูกกระตุ้นมายังบริเวณที่เกิดแผลโดย monocyte chemoattractant protein 1 แล้วเปลี่ยนเป็นเซลล์เม็ดเลือดขาว macrophages ซึ่งจะเป็นเซลล์ที่มีปริมาณมากที่สุดภายหลังจากเกิดแผล 3 วัน โดยเซลล์เม็ดเลือดขาว macrophages ทำหน้าที่กำจัดเนื้อตายและแบคทีเรียในแผล แต่บทบาทที่สำคัญต่อการหายของแผลคือการหลั่งสาร growth factors ต่างๆซึ่งจำเป็นต่อการสร้าง ECM ทั้งกระตุ้นการสร้าง fibroblast และการสร้างหลอดเลือดใหม่ปกติแล้วการหายของแผลสามารถสำเร็จ ถัดมาเซลล์เม็ดเลือดขาว lymphocytes และ mast cell ซึ่งจะเข้ามาบริเวณแผล 5-7 วันหลังเกิดแผล บทบาทของเซลล์ทั้ง 2 ชนิดต่อการหายของแผลยังไม่ทราบแน่ชัด โดยสาร CD-4 และ inhibitory CD-8 ที่หลั่งจากเซลล์เม็ดเลือดขาว lymphocytes มีผลต่อการหายของแผลในระยะต่อไป

2. ระยะเพิ่มจำนวน (proliferative phase) คือ ระยะที่เนื้อเยื่อเกิดการเพิ่มจำนวน พร้อมๆกับการเกิดแผลเป็น ระยะนี้มักจะเกิดขึ้นภายหลังเกิดแผลประมาณ 4 วัน ถึง 3 สัปดาห์ แต่แท้จริงแล้วระยะการหายของแผลในแต่ละระยะมีความทับซ้อนกัน กระบวนการ re-epithelialization เกิดขึ้นทันทีตั้งแต่เกิดแผล โดย keratinocytes ที่บริเวณขอบแผลมีการแยกตัวจากชั้น basement membrane และเคลื่อนตัวออกมาเพื่อปิดบาดแผล การเคลื่อนตัวของ keratinocytes เป็นผลมาจากการทำปฏิสัมพันธ์กับ โปรตีนของ ECM (fibronectin, vitronectin, type I collagen) และมาแทนที่ fibrin matrix กลายเป็น granulation tissue ซึ่งประกอบด้วยเซลล์สำคัญ 3 ชนิด คือ fibroblasts, macrophages และ endothelial cells เซลล์เหล่านี้มีบทบาทสำคัญในการสร้าง ECM และหลอดเลือดใหม่ โดยที่ granulation tissue จะเริ่มเห็นได้ที่ขอบแผลประมาณ 4 วันหลังเกิดแผล โดยมี fibroblast ทำหน้าที่เป็นเซลล์หลัก และ macrophages จะช่วยสร้าง growth factors ต่างๆที่จำเป็นเช่น PDGF และ TGF-beta1 กระตุ้นให้ fibroblast เพิ่มจำนวน และฝังตัวใน ECM อีกทั้งยังกระตุ้นให้ endothelial cells สร้างหลอดเลือดใหม่อีกด้วย เมื่อ collagen matrix เพิ่มจำนวนจนเต็มบาดแผลแล้ว กระบวนการทั้งหมดจะหยุดทันที fibroblast จะหายไป และการสร้างหลอดเลือดใหม่จะหยุดลง โดยในระยะเพิ่มจำนวนนี้ fibrin matrix จะถูกแทนที่ด้วย type III collagen ซึ่งยังไม่แข็งแรง สุดท้ายจะถูกแทนที่ด้วย type I collagen ที่แข็งแรงกว่าในระยะปรับเปลี่ยนใหม่ (remodeling phase)

3. **ระยะปรับเปลี่ยนใหม่ (remodeling phase)** เป็นระยะที่แผลเกิดการปรับเปลี่ยนโครงสร้าง เพื่อเพิ่มความแข็งแรงให้แก่เนื้อเยื่อ ระยะนี้เป็นระยะที่นานที่สุดของกระบวนการหายของแผล โดยระยะนี้เริ่มตั้งแต่แผลถูกเติมเต็มด้วย granulation tissue และขอบแผลเกิด re-epithelialization แล้ว กระบวนการหลักของระยะนี้คือการหดของแผล (wound contraction) และการปรับเปลี่ยนใหม่ของคอลลาเจน (collagen remodeling) โดยการหดของแผลเกิดจาก myofibroblast ซึ่งมาจาก fibroblast ที่จับตัวกับ intracellular actin microfilament หดตัว



ภาพที่ 2.9 กระบวนการและระยะเวลาการหายของแผล (Yildirimer et al., 2012)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การสังเคราะห์ไฮโดรเจล

โครงการวิจัยนี้ได้ทำการสังเคราะห์ไฮโดรเจลโดยคณะวิจัย ผศ.ดร.ศิริพันธ์ กุลชาติ และ ดร.ชานนธ์ ตลอดโรสง ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น เตรียมสารละลายบอแรกซ์ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน คือ 2 wt%, 4 wt%, 6 wt% และ 8 wt% ในน้ำปราศจากไอออน เพื่อใช้ในการเตรียมไฮโดรเจลที่มีความเข้มข้นของบอแรกซ์ที่ต่างกัน การสังเคราะห์กั้วร์กัมไฮโดรเจล เริ่มจาก เติมน้ำปราศจากไอออน 20 มิลลิลิตร ลงในบีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร จากนั้น ชั่งกั้วร์กัมมา 0.1 กรัม ค่อยๆ ปล่อยลงในน้ำปราศจากไอออนพร้อมกับกวนด้วยเครื่องกวนสาร เพื่อไม่ให้กั้วร์กัมจับกันเป็นก้อน เมื่อเติมเสร็จ ทำการปิดฝาด้วยกระจกนาฬิกาเพื่อไม่ให้เกิดการระเหย แล้วกวนต่อไปเป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้องจะได้สารละลายที่เป็นเนื้อเดียวกัน เติมน้ำ 0.1 โมลาร์ NaOH ปริมาณ 200 ไมโครลิตร กวนให้เข้ากันเป็นเวลา 2 นาที แล้วเติม 2% wt ของสารละลายบอแรกซ์ ปริมาณ 500 ไมโครลิตร โดยกวนแรงเป็นเวลา 5 นาที สารละลายจะค่อยก่อตัวเป็นไฮโดรเจลอย่างสมบูรณ์ ในการเตรียมไฮโดรเจลที่ความเข้มข้นของสารละลายบอแรกซ์อื่นๆ ใช้วิธีเดียวกันแต่แตกต่างกันตรงที่ความเข้มข้นของบอแรกซ์ จากนั้นเพิ่มอัตราส่วนทุกอย่างเป็นสามเท่า เมื่อได้ไฮโดรเจลแล้ว เทลงบนจานเลี้ยงเชื้อขนาด 100×15 มิลลิเมตร อบที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จนกว่าจะแห้ง เมื่อแห้งแล้ว กรีดขอบไฮโดรเจลเป็นวงกลมตามจานเลี้ยงเชื้อ แล้วนำไปแช่น้ำให้เกิดการบวมตัวเพื่อที่จะสามารถแกะออกมาจากจานเลี้ยงเชื้อได้ จากนั้นนำแผ่นไฮโดรเจลมาตากบนถุงพลาสติกแบบหนา ทิ้งไว้ในตู้ดูดควันจนกว่าจะแห้งกลายเป็นฟิล์ม วิธีการสังเคราะห์ไฮโดรเจลที่มีเคอร์คูมินห่อหุ้มด้วยอนุภาคเงินนาโน (Cur-AgNPs) ผสมอยู่ การเตรียมความเข้มข้นของ Cur-AgNPs ที่แตกต่างกัน แสดงในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 ความเข้มข้นที่แตกต่างกันของ Cur-AgNPs ในการเตรียมไฮโดรเจล

| ตัวอย่าง | Cur-AgNPs (มิลลิลิตร) | น้ำปราศจากไอออน (มิลลิลิตร) | ความเข้มข้น (นาโนโมลาร์) |
|---------------|-----------------------|-----------------------------|--------------------------|
| ตัวอย่างที่ 1 | 1.25 | 18.75 | 1.47 |
| ตัวอย่างที่ 2 | 2.5 | 17.5 | 2.95 |
| ตัวอย่างที่ 3 | 5 | 15 | 5.90 |
| ตัวอย่างที่ 4 | 10 | 10 | 11.79 |
| ตัวอย่างที่ 5 | 20 | 0 | 23.58 |

การสังเคราะห์สารตัวอย่างที่ 1 ปิเปต Cur-AgNPs มา 1.25 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำปราศจากไอออน 18.75 มิลลิลิตร ในบีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร กวนให้เข้ากันด้วยเครื่องกวนสาร จากนั้นชั่งกั้วร์กัมมา 0.1 กรัม ค่อยๆ โปรงลงในสารละลายพร้อมกับกวนด้วยเครื่องกวนสาร เพื่อไม่ให้กั้วร์กัมจับกันเป็นก้อน ปิดฝาด้วยกระจกนาฬิกาหรือจานเลี้ยงเชื้อแล้วกวนต่อไปเป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้องจะได้สารละลายที่เป็นเนื้อเดียวกัน เดิมเบส 0.1 โมลาร์ NaOH ปริมาณ 200 ไมโครลิตร กวนให้เข้ากันเป็นเวลา 2 นาที แล้วเติม 4% wt ของสารละลายบอแรกซ์ ปริมาณ 500 ไมโครลิตร จากนั้นกวนแรงเป็นเวลา 5 นาที สารละลายจะค่อยๆ ก่อตัวเป็นไฮโดรเจลอย่างสมบูรณ์ ในการสังเคราะห์สารตัวอย่างอื่นๆ ใช้วิธีเดียวกันการสังเคราะห์ตัวอย่างที่ 1 แตกต่างกันที่ความเข้มข้นของ Cur-AgNPs ตามที่ระบุในตารางที่ 3.1

3.2 สัตว์ทดลอง

หนูสายพันธุ์ Wistar เพศผู้ อายุ 8 สัปดาห์ น้ำหนักประมาณ 180–200 กรัม จากบริษัท โนมูระสยามอินเตอร์เนชันแนลจำกัด หนูจะถูกเลี้ยงกรงละ 2-3 ตัว เพื่อลดความเครียด ซึ่งอยู่ในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิ $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ และ ความชื้น $55 \pm 5\%$ ด้วยแสงสว่างตามวงจรเวลากลางวันกลางคืน รอบละ 12 ชั่วโมง หนูทุกตัวได้รับอาหารและน้ำที่มาตรฐาน น้ำหนักของหนูและปริมาณอาหารที่กินจะทำการบันทึกทุกวัน

เมื่อครบระยะเวลากักกันสัตว์ทดลองเป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์ หนูจะถูกสุ่มแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มควบคุมที่ถูกทำให้มีแผล (cutaneous surgical open wounds) และได้รับยาลดปวดร่วมกับแผ่นปิดแผลมาตรฐาน และกลุ่มที่ถูกทำให้มีแผลและได้รับยาลดปวดร่วมกับเจลสมานแผลจากสารเชิงประกอบไฮโดรเจล หนูทุกตัวถูกประเมินลักษณะและอัตราการซ่อมแซมของแผลทุกๆ 4 วัน หลังจากมีบาดแผล รวมระยะเวลา 16 วัน เมื่อครบระยะเวลาการศึกษาในวันที่ 4, 8, 12, และ 16 หนูทั้ง 2 กลุ่มถูกสุ่มจำนวนกลุ่มๆ 3 ตัวต่อช่วงเวลา และทำให้ตายอย่างสงบด้วยยาสลบที่เกินขนาด แล้วทำการเก็บเลือด เนื้อเยื่อรอบแผลและแผลเพื่อนำไปวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลง โครงสร้างระดับจุลภาคด้วยการย้อมเนื้อเยื่อ

การดำเนินงานทุกขั้นตอนได้รับอนุญาตจากของคณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและใช้สัตว์ทดลอง มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ และดำเนินการเลี้ยงที่ศูนย์สัตว์ทดลอง มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ โครงการวิจัยนี้จะใช้หนูจำนวน 24 ตัวแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มๆ ละ 12 ตัว ดังนี้

1. กลุ่มควบคุมที่ถูกทำให้มีแผลและได้รับยาลดปวดร่วมกับเจลสมานแผลมาตรฐาน
2. กลุ่มที่ถูกทำให้มีแผลและได้รับยาลดปวดร่วมกับเจลสมานแผลไฮโดรเจล

จำนวนสัตว์ทดลองที่ใช้ในโครงการวิจัยนี้อ้างอิงจากผลงานวิจัยของกลุ่มนักวิจัยพัฒนาและสังเคราะห์แผ่นปิดแผลและศึกษาประสิทธิภาพของแผ่นปิดแผลในสัตว์ทดลอง ทั้งนี้จำนวนสัตว์ทดลองที่ใช้ในการศึกษามีความสอดคล้องกับผลการศึกษาที่ผ่านมาของ Jing และคณะ ปี ค.ศ. 2017 (Jing, et al., 2017)

3.3 การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนังไฟโบรบลาสต์

การเพาะเลี้ยงเซลล์ผิวหนังไฟโบรบลาสต์ (fibroblasts) ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดดัลเบ็คโคส โมดิฟายด์ อีเกิลส์ (Dulbecco's Modified Eagle Medium: DMEM) ในถาดหลุมเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม (96-well plate) ให้ความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ 2×10^4 เซลล์ต่อหลุม บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทั้งนี้ความเข้มข้นของอนุภาคเงินที่ห่อหุ้มสารเคอร์คูมิน 0.34 nM ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่สามารถคงความเสถียรร่วมกับไฮโดรเจลอนุภาคเงิน ถูกนำมาเจือจางที่ความเข้มข้น 0, 0.0002, 0.0004, 0.0008, 0.0016, 0.0032, 0.00625, 0.0125, 0.025, 0.05, 0.1 และ 0.2 nM ตามลำดับ จากนั้นเติมสารละลายของสารที่ต้องการทดสอบที่ความเข้มข้นต่างๆ หลุมละ 100 μ l แล้วเพาะเลี้ยงเซลล์กับสารทดสอบในตู้เพาะเลี้ยงเป็นเวลาประมาณ 24 ชั่วโมง จากนั้นหาค่าร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์เพาะเลี้ยงด้วยเทคนิคการวิเคราะห์ด้วยสารเอ็มทีที (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide; MTT) โดยการเติมสารละลายเอ็มทีที (MTT) ลงไปในจานเพาะเลี้ยง จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 นาโนเมตร นำไปวิเคราะห์หาค่าร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ (% cell viability) ในแต่ละกลุ่มตัวอย่าง และเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้รับสารทดสอบ เพื่อหาค่าความเข้มข้นของสารที่ทำให้เซลล์มีร้อยละการมีชีวิตมากกว่า 80 (ความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์) และทำให้เซลล์มีร้อยละการมีชีวิต 50 (50% inhibitory concentration; IC50) ซึ่งแสดงถึงความเป็นพิษต่อเซลล์ (Nirwana et al., 2021)

3.4 การศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์ผิวหนังเพาะเลี้ยง

เซลล์ผิวหนังถูกเพาะเลี้ยงในถาดหลุมเลี้ยงเซลล์ชนิด 48 หลุม ให้ความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ 2.5×10^4 เซลล์ต่อหลุม บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาจึงใส่สารทดสอบอนุภาคเงินที่ห่อหุ้มสารเคอร์คูมินความเข้มข้น 0.0005, 0.001 และ 0.002 นาโนโมลาร์ และวิตามินซี (สารควบคุมเชิงบวก) ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร หลุมละ 400 ไมโครลิตร แล้วจึงเลี้ยงเซลล์กับสารทดสอบเป็นเวลา 7 และ 14 วัน โดยเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก ๆ 2 วัน เมื่อครบกำหนดจึงนำอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าออกแล้วแล้วเติม 1X lysis buffer หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มในตู้บ่ม 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เมื่อครบเวลาจึงเติม CellTiter-Glo solution 50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มีดเป็นเวลา 10 นาที แล้วจึงนำไปอ่านค่าการเปลี่ยนแปลงของ luminescence

3.5 การศึกษาปริมาณคอลลาเจนด้วยวิธี Sirius red staining

เพาะเลี้ยงเซลล์ผิวหนัง ในถาดหลุมเลี้ยงเซลล์ชนิด 48 หลุม ให้ความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ 2.5×10^4 เซลล์ต่อหลุม บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาจึงใส่สารทดสอบอนุภาคที่ห่อหุ้มสารเคอร์คูมินความเข้มข้น 0.0005, 0.001 และ 0.002 นาโนโมลาร์ และวิตามินซี ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร หลุมละ 400 ไมโครลิตร แล้วจึงเลี้ยงเซลล์กับสารทดสอบเป็นเวลา 7 และ 14 วัน โดยเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก ๆ 2 วัน เมื่อครบกำหนดจึงนำอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าออกและล้างเซลล์ด้วย PBS หลังจากนั้น นำ PBS ออก แล้ว fix เซลล์โดยเติม paraformaldehyde (PFA) ความเข้มข้น 4% หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที จึงนำ PFA ออก ล้างเซลล์ด้วย PBS 2 ครั้ง ย้อมเซลล์ที่ถูกรับ fix ด้วยสารละลาย direct red 80 ความเข้มข้น 0.1% เป็นเวลา 10 นาที จากนั้น ล้างสีย้อมด้วย 0.01 N HCl in 70% ethanol 2 ครั้งๆ ละ 2 นาที แล้วถ่ายรูปรูปเซลล์ที่ย้อมติดคอลลาเจน หลังจากนั้น ละลายสีย้อมด้วย NaOH ความเข้มข้น 0.5 N หลุมละ 100 ไมโครลิตร และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร

3.6 การทดสอบฤทธิ์การสมานแผลของเซลล์ผิวหนังเพาะเลี้ยง

เพาะเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์ใน Culture-insert 4 well เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา จึงเอา insert ออก และล้างเซลล์ที่หลุดออกด้วย PBS หลังจากนั้นบ่มเซลล์กับสารทดสอบความเข้มข้น 0.001 และ 0.002 นาโนโมลาร์ และ FGF (สารควบคุมเชิงบวก) ความเข้มข้น 100 นาโนกรัม/มิลลิลิตร ปริมาณ 2 มิลลิลิตร บันทึกภาพเซลล์เพาะเลี้ยงด้วยกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 4X ที่เวลาต่างๆ ฤทธิ์การกระตุ้นการสมานแผลจะประเมินจากเปอร์เซ็นต์ของรอยแผลที่ปิด (% of gap filled) ซึ่งสามารถคำนวณจากสมการ % การปิดของรอยแผล เท่ากับ
$$\left[\frac{\text{พื้นที่ของแผลเริ่มต้น} - \text{พื้นที่ของแผลในระยะต่างๆ}}{\text{พื้นที่ของแผลเริ่มต้น}} \right] \times 100$$

3.7 การสลบหนูและการเก็บอวัยวะตัวอย่าง

เมื่อสิ้นสุดการศึกษา หนูถูกทำให้สลบด้วยการสูดดมสาร isoflurane และทำการเก็บเลือดจากหัวใจและเนื้อเยื่อบริเวณบาดแผล เพื่อทำการศึกษการเปลี่ยนแปลงของเซลล์และโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบหรือการติดเชื้อ

3.8 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างผิวหนังระดับจุลภาค

ลักษณะและอัตราการซ่อมแซมของแผลจะถูกประเมินทุกๆ 4 วัน หลังจากมีบาดแผล (วันที่ 4, 8, 12, และ 16) รวมระยะเวลา 16 วัน และทำวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างระดับจุลภาคด้วยการย้อมเนื้อเยื่อด้วยสีย้อม hematoxylin & eosin และศึกษาปริมาณคอลลาเจนด้วยสีย้อม Masson's trichrome ตามลำดับ

3.9 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงระดับโมเลกุล

ตัวอย่างแผลและผิวหนังบริเวณแผลของหนูแรทนำมาแยก messenger RNA (mRNA) ด้วยชุดสกัดสำเร็จรูปตามวิธีการที่ผู้ผลิตกำหนด DNA extraction kit (Fermentas, Thermo Scientific) จากนั้นวัดความเข้มข้นของ total RNA ด้วยเครื่อง NanoDrop2000 spectrophotometer ศึกษาการแสดงออกของ mRNA ด้วยวิธี Real-time PCR แล้วศึกษาการแสดงออกของยีนที่สนใจ ได้แก่ Collagen 1 (Col1a1), Collagen 3 (Col3a1), EGF (Egf), FGF-2 (Fgf2), TGF- β 1, (Tf β 1) และ IL-6 (Il6) โดยยีน beta actin เป็นตัวควบคุมภายในถูกนำมาเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของยีนที่ทำการศึกษา (Wongchitrat et al., 2017) ดังที่แสดงในตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 Primers used in qPCR

| Gene | Primer sequence | Product | Melting temperature | Access number |
|------------------------------------|--|---------|---------------------|---------------|
| β -actin (<i>Actb</i>) | F: 5'-CCCTGGCTCCTAGCACCAT-3' R: 5'-GATAGAGCCACCAATCCACACA-3' | 80 bp | 60°C | NM031144 |
| Collagen 1 (<i>Col1a1</i>) | F: 5'-CATGTTCACTTTGTGGACCT-3' R: 5'-GCAGCTGACTTCAGGGATGT-3' | 94 bp | 60°C | NM053304 |
| Collagen 3 (<i>Col3a1</i>) | F: 5'-GGGATCCAATGAGGGAGAAT-3' R: 5'-CCTTGCCTGTTGATATT-3' | 128 bp | 60°C | NM032085 |
| EGF (<i>Egf</i>) | F: 5'-CTCAGGCCTCTGACTCCGAA-3' R: 5'-ATGCCGACGAGTCTGAGTTG-3' | 93 bp | 60°C | NM012842 |
| FGF-2 (<i>Fgf2</i>) | F: 5'-GATCCCAAGCGGCTCTACTG-3' R: 5'-TAGTTTGACGTGTGGGTCGC-3' | 105 bp | 60°C | NM019305 |
| TGF- β 1 (<i>Tgfb1</i>) | F: 5'-GGGCTACCATGCCAACTTCTG-3' R: 5'-GAGGGCAAGGACCTTGCTGTA-3' | 82 bp | 60°C | NM021578 |
| IL-6 (<i>Il6</i>) | F: 5'AACCTGAACCTTCCAAAGATGG-3' R: 5'-TCTGGCTTGTCTCACTACT-3' | 168 bp | 55°C | NM012589 |

EGF: Epidermal growth factor; TGF- β 1: Transforming growth factor beta 1; IL-6: Interleukin-6; F: Forward; R: Reverse.

3.10 การวิเคราะห์ทางสถิติ

การวิเคราะห์ทางสถิติ (Statistical analysis) ผลของการศึกษาแสดงในรูปค่าเฉลี่ยและค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Mean \pm SE.) สำหรับการเปรียบเทียบระหว่าง 2 ข้อมูล ใช้วิธี unpaired student's t-test กำหนดให้ค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติน้อยกว่า 0.05 ($p < 0.05$) การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติทั้งหมดด้วยโปรแกรม GraphPad Prism 6.0

บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

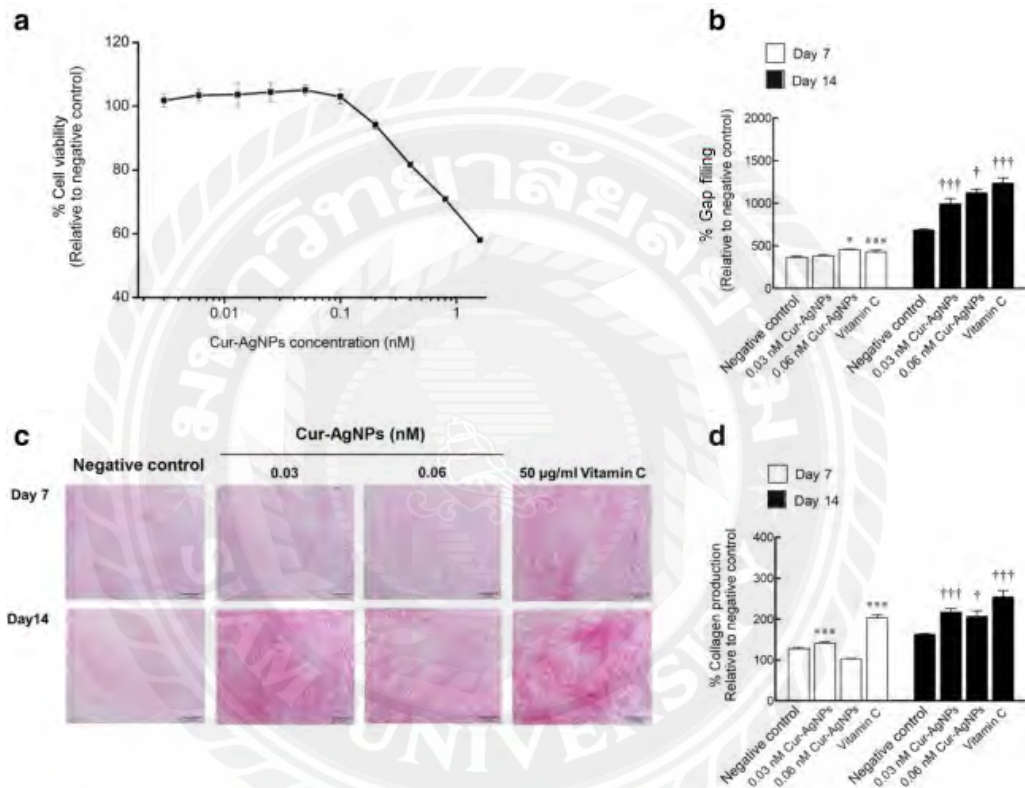
4.1 ผลของสารเคอร์คูมินอนุภาคเงินนาโนต่อความเป็นพิษ การเพิ่มจำนวนเซลล์ และการสร้างคอลลาเจนเซลล์เนื้อเยื่อผิวหนังมนุษย์เพาะเลี้ยง

เซลล์ผิวหนังมนุษย์เพาะเลี้ยงถูกนำมาบ่มกับสารเคอร์คูมินอนุภาคเงินนาโนความเข้มข้น 0.016–1,600 nM เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมงและทดสอบความเป็นพิษ (cytotoxicity) เพื่อพิจารณาความเข้มข้นของสารเคอร์คูมินอนุภาคเงินนาโนที่ปลอดภัยก่อนนำมาสังเคราะห์ร่วมกับไฮโดรเจล โดยการประเมินด้วยค่าเฉลี่ยของร้อยละเซลล์รอดชีวิต (% cell viability) ด้วยวิธี MTT assay ผลการศึกษา พบว่า สารเคอร์คูมินอนุภาคเงินนาโนที่ความเข้มข้น 0.2 nM มีความเป็นพิษต่ำและค่าเฉลี่ยของร้อยละเซลล์รอดชีวิตมากกว่าร้อยละ 80 และสารเคอร์คูมินอนุภาคเงินนาโนที่ความเข้มข้นน้อยกว่า 0.1 nM ยังคงมีความเป็นพิษต่ำและค่าเฉลี่ยของการรอดชีวิตร้อยละ 100 (ภาพที่ 4.1 a–b)

นอกจากนี้ เซลล์ผิวหนังมนุษย์นำมาเพาะเลี้ยงการบ่มสารเคอร์คูมินอนุภาคเงินนาโนความเข้มข้น 0.03 nM และ 0.06 nM เป็นระยะเวลา 7 วัน และ 14 วัน สามารถเพิ่มจำนวนเซลล์ (proliferation) โดยมีกลุ่มที่ได้รับวิตามินซีความเข้มข้น 50 µg/mL เป็นกลุ่มควบคุมมาตรฐาน (positive control) ที่เป็นสารเพิ่มจำนวนเซลล์และการสร้างคอลลาเจน เมื่อครบระยะเวลา 7 วัน สารเคอร์คูมินอนุภาคเงินนาโนสามารถเพิ่มจำนวนเซลล์ตามความเข้มข้นและระยะเวลา โดยความเข้มข้น 0.06 nM เพิ่มจำนวนเซลล์มากกว่ากลุ่มควบคุม ($p=0.0172$) โดยที่กลุ่มที่ได้รับวิตามินซีมีเพิ่มจำนวนเซลล์ ($p=0.0002$) ขณะที่ระยะเวลา 14 วัน สารเคอร์คูมินอนุภาคเงินนาโนความเข้มข้น 0.03 nM และ 0.06 nM สามารถเพิ่มจำนวนเซลล์อย่างมีนัยสำคัญ ($p=0.0031$, $p=0.0372$ ตามลำดับ) และวิตามินซีเพิ่มจำนวนเซลล์สูงสุด ($p=0.0018$)

การศึกษาปริมาณคอลลาเจน (collagen production) โดยทำการย้อมสี Picrosirius red ผลการศึกษา พบว่า การบ่มสารเคอร์คูมินอนุภาคเงินนาโนความเข้มข้น 0.03 nM เป็นระยะเวลา 7 วัน ทำให้เซลล์ผิวหนังเพาะเลี้ยงเพิ่มการสร้างคอลลาเจนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.0001$) คิดเป็นร้อยละ 20 ขณะที่การบ่มสารเคอร์คูมินอนุภาคเงินนาโนเป็นระยะเวลา 14 วัน พบว่า ความเข้มข้น 0.03 nM สามารถเพิ่มปริมาณการสร้างคอลลาเจนร้อยละ 50 และความเข้มข้น 0.06 nM ร้อยละ 40 ($p=0.00021$, $p=0.0372$ ตามลำดับ) ทั้งนี้กลุ่มที่ได้รับวิตามินซีมีปริมาณการสร้างคอลลาเจนสูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p<0.0001$, $p=0.0003$ ตามลำดับ) (ภาพที่ 4.1 c–d)

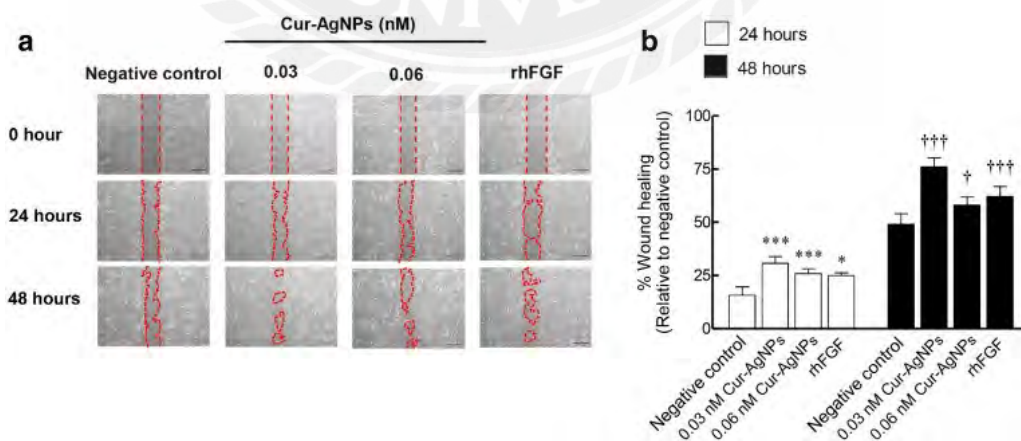
ฉะนั้นการศึกษานี้ทำให้ทราบว่า สารเคอร์คูมินอนุภาคเงินนาโนความเข้มข้น 0.03-0.2 nM มีความเป็นพิษต่ำและสามารถเพิ่มจำนวนเซลล์และปริมาณคอลลาเจน ซึ่งสารเคอร์คูมินอนุภาคเงินนาโนความเข้มข้น 0.03-0.2 nM มีความปลอดภัยจึงได้ทำการสังเคราะห์สารเคอร์คูมินห่อหุ้มด้วยอนุภาคเงินนาโนสูงสุดที่ความเข้มข้น 3.4 nM (ความเข้มข้นประมาณ 10 เท่า) และนำมาผสมกับไฮโดรเจลเพื่อนำมาศึกษาประสิทธิภาพการสมานแผลในสัตว์ทดลอง



ภาพที่ 4.1 ผลของสารเคอร์คูมินอนุภาคเงินนาโนต่อความเป็นพิษ การเพิ่มจำนวนเซลล์ และการสร้างคอลลาเจนเซลล์ในเนื้อเยื่อผิวหนังมนุษย์เพาะเลี้ยง

4.2 ผลของสารเคอร์คูมินอนุภาคเงินนาโนต่อการปิดแผลและการสมานแผลในเซลล์เนื้อเยื่อผิวหนังมนุษย์เพาะเลี้ยง

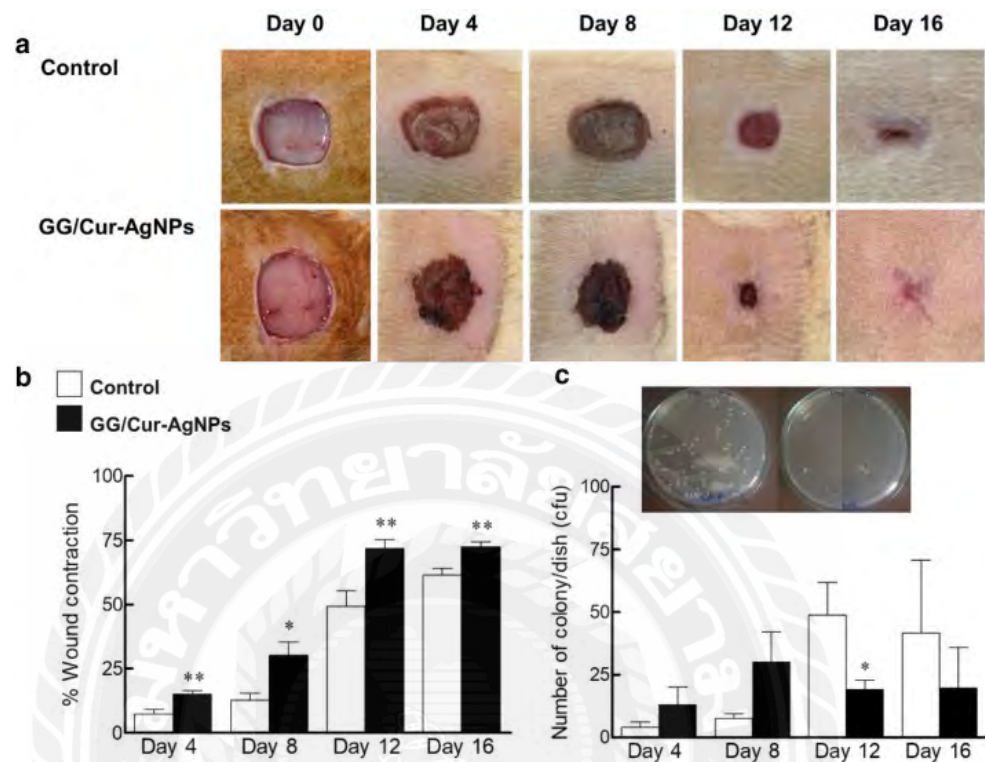
เซลล์เนื้อเยื่อผิวหนังมนุษย์เพาะเลี้ยงถูกทำให้เกิดแผลและบ่มด้วยสารเคอร์คูมินอนุภาคเงินนาโนความเข้มข้น 0.03 nM และ 0.06 nM โดยมีสาร recombinant human basic fibroblast growth factor (rhFGF-b) ปริมาณความเข้มข้น 100 ng/mL เป็นกลุ่มควบคุมมาตรฐาน (positive control) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับสารหลอก (negative control) พบว่า สารเคอร์คูมินอนุภาคเงินนาโนความเข้มข้น 0.03 nM มีประสิทธิภาพสูงสุดในการสมานแผลเซลล์เนื้อเยื่อผิวหนังมนุษย์เพาะเลี้ยง ในระยะเวลา 24 ชั่วโมง (ร้อยละ 30, $p=0.0012$) และ 48 ชั่วโมง (ร้อยละ 76, $p<0.0001$) และเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม พบว่า สารเคอร์คูมินอนุภาคเงินนาโนความเข้มข้น 0.03 nM มีการสมานแผลร้อยละ 25 ($p=0.0003$) ใน 24 ชั่วโมง และร้อยละ 58 ($p=0.042$) ใน 48 ชั่วโมง ในขณะที่กลุ่มที่ได้รับสาร rhFGF-b มีการสมานแผลร้อยละ 25 ($p=0.038$) ใน 24 ชั่วโมง และร้อยละ 62 ($p<0.0001$) ใน 48 ชั่วโมง ตามลำดับ สารเคอร์คูมินอนุภาคเงินนาโนสามารถสมานแผลเซลล์เนื้อเยื่อผิวหนังมนุษย์เพาะเลี้ยงร้อยละ 15-20 สารเคอร์คูมินอนุภาคเงินนาโนความเข้มข้นน้อย (0.03 nM) สามารถช่วยเติมสารส่งเสริมการปิดแผลและสื่อสารภายในเซลล์ในการสมานแผลได้ดีกว่าความเข้มข้นสูง (0.06 nM) (ภาพที่ 4.2 a-b) ดังนั้นสารเคอร์คูมินอนุภาคเงินนาโนสามารถช่วยสมานแผลเซลล์เนื้อเยื่อผิวหนังมนุษย์เพาะเลี้ยงด้วยการกระตุ้นการเพิ่มขึ้นของเซลล์และเริ่มต้นการสมานแผลเคลื่อนตัวไปบนผิวของ granulation tissue จนขอบของเยื่อผิวหนังจะมีปิดแผลของเซลล์เนื้อเยื่อผิวหนังมนุษย์เพาะเลี้ยงได้อย่างสมบูรณ์



ภาพที่ 4.2 ผลของสารเคอร์คูมินอนุภาคเงินนาโนต่อการสมานแผลในเซลล์เนื้อเยื่อผิวหนังมนุษย์เพาะเลี้ยง

4.3 ผลของสารเคอร์คูมินอนุภาคเงินนาโนไฮโดรเจลต่อการสมานแผลและการต้านเชื้อแบคทีเรียที่แผลผิวหนังสัตว์ทดลอง

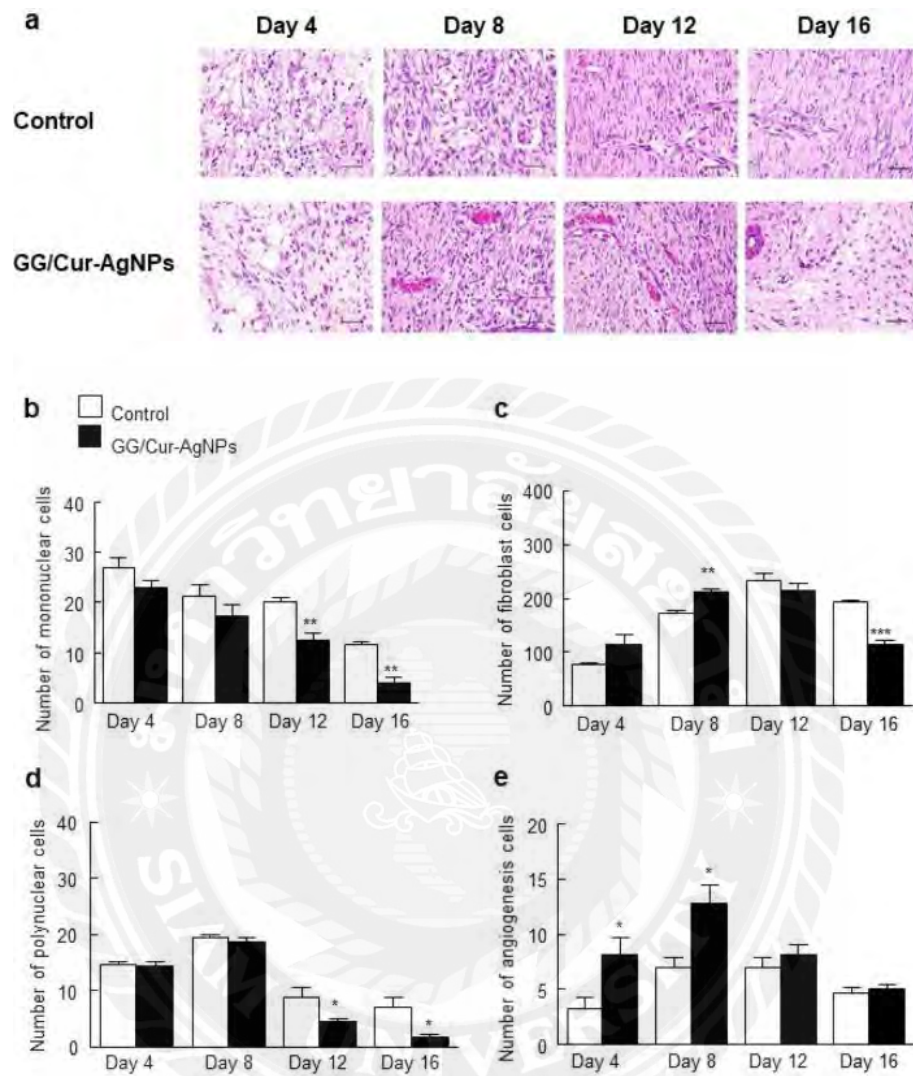
ความเข้มข้นที่ปลอดภัยของสารเคอร์คูมินอนุภาคเงินนาโนถูกนำมาสังเคราะห์ร่วมกับไฮโดรเจล จากนั้นนำไฮโดรเจลสมานแผลมาทำการทดสอบประสิทธิภาพการสมานแผลและการต้านเชื้อแบคทีเรียที่ผิวหนังของหนูขาวเพศผู้ที่ได้รับการผ่าตัดทำให้เกิดแผลเปิด เมื่อเปรียบเทียบกับแผลที่ทาเจลฆ่าเชื้อแบคทีเรียมาตรฐาน (positive control) พบว่า สารเคอร์คูมินอนุภาคเงินนาโนไฮโดรเจลสามารถเพิ่มการสมานแผลเปิดของผิวหนังสัตว์ทดลองตลอดระยะเวลาการศึกษา ซึ่งสารเคอร์คูมินอนุภาคเงินนาโนไฮโดรเจลมีร้อยละอัตราการสมานแผลมากกว่าแผลทาเจลฆ่าเชื้อแบคทีเรียมาตรฐาน [วันที่ 4 ($p=0.0092$) วันที่ 8 ($p=0.0111$) วันที่ 12 ($p=0.0093$) และวันที่ 16 ($p=0.0081$) ตามลำดับ] ดังที่แสดงในภาพที่ 4.3 a-b นอกจากนี้สารเคอร์คูมินอนุภาคเงินนาโนไฮโดรเจลสามารถเร่งการสมานแผลแล้ว ยังสามารถต้านเชื้อแบคทีเรียที่แผลผิวหนังได้อีกด้วย กล่าวคือ สารเคอร์คูมินอนุภาคเงินนาโนไฮโดรเจลลดปริมาณจำนวนเชื้อแบคทีเรียที่นำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยวันที่ 12 ของการได้รับการทาสารเคอร์คูมินอนุภาคเงินนาโนไฮโดรเจล ทำให้มีเชื้อแบคทีเรียจำนวนน้อยที่สุด 20 โคโลนี (colony-forming units: cfu) ขณะที่กลุ่มควบคุมมีเชื้อแบคทีเรียจำนวน 51 cfu ($p=0.0491$) (ภาพที่ 4.3 c) สารเคอร์คูมินห่อหุ้มอนุภาคเงินนาโนไฮโดรเจลจึงมีประสิทธิภาพต้านเชื้อแบคทีเรียมากกว่าร้อยละ 60 ฉะนั้นสารเคอร์คูมินอนุภาคเงินนาโนไฮโดรเจลสามารถเร่งการสมานแผลและมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียที่แผลสัตว์ทดลอง



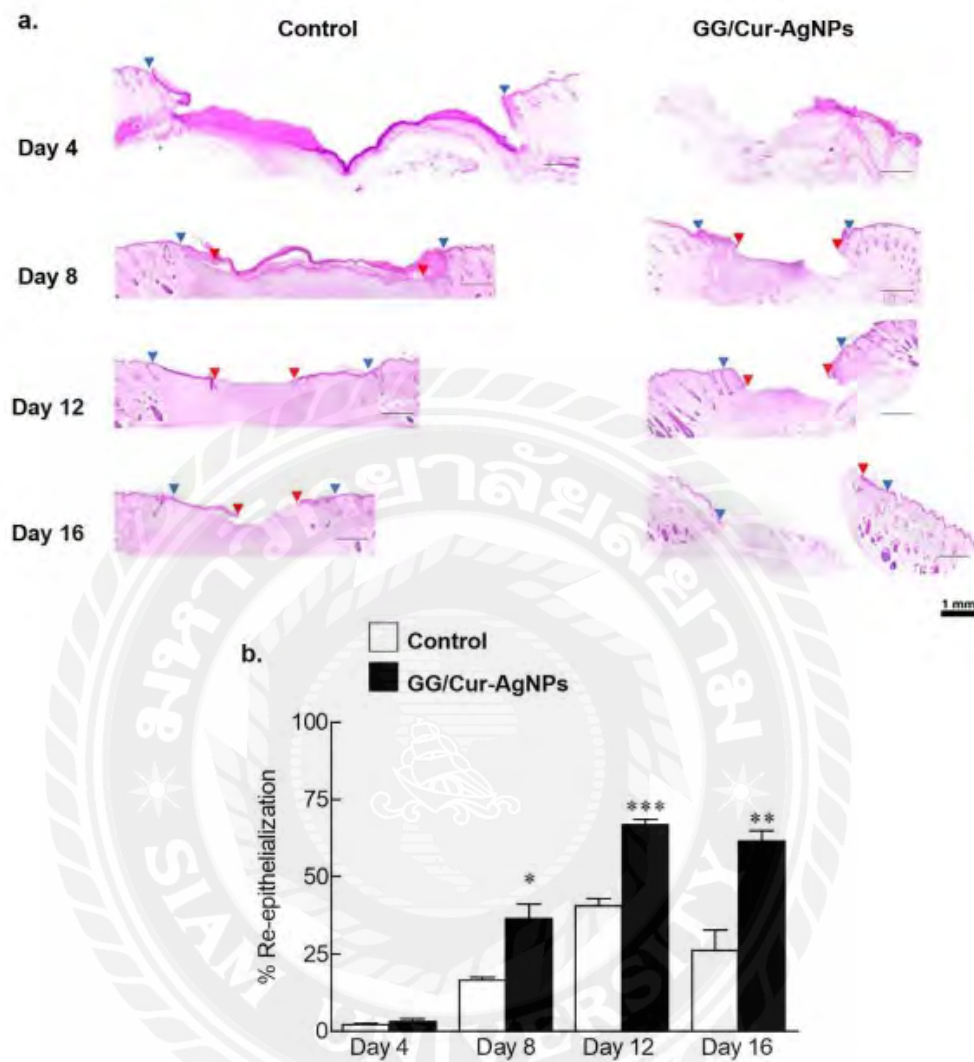
ภาพที่ 4.3 ผลของสารเคอร์คูมินอนุภาคเงินนาโนไฮโดรเจลต่อการสมานแผลและการต้านเชื้อแบคทีเรียที่แผลผิวหนังสัตว์ทดลอง

4.4 ผลของสารเคอร์คูมินอนุภาคเงินนาโนไฮโดรเจลต่อการเปลี่ยนแปลงพยาธิวิทยาของการสมานแผลที่ผิวหนังสัตว์ทดลอง

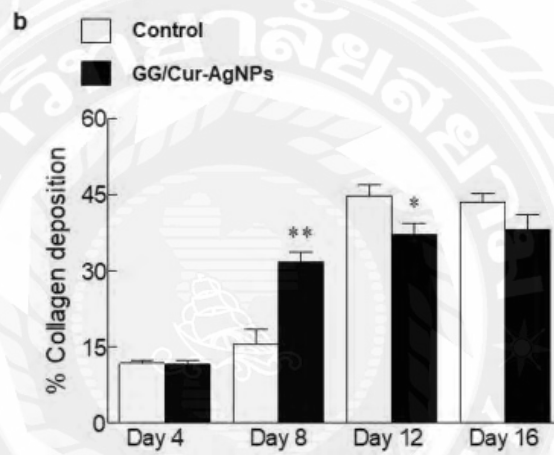
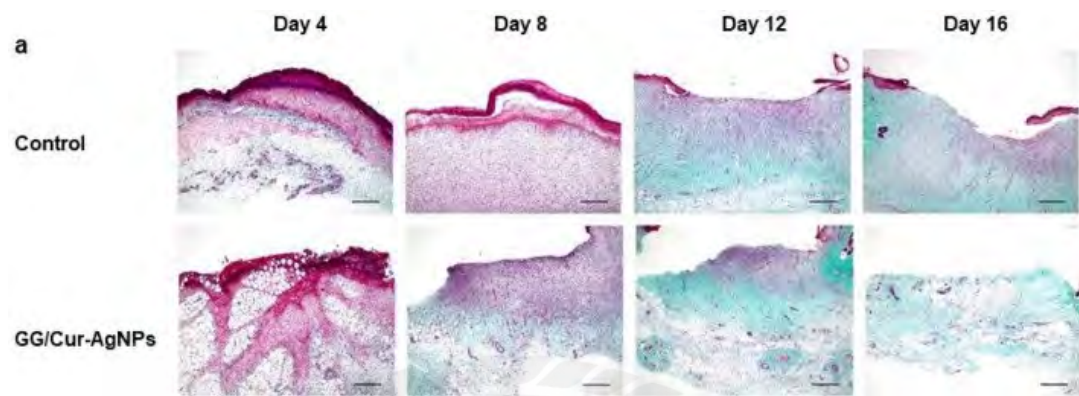
เนื้อเยื่อแผลที่ผิวหนังถูกนำไปตรึงสภาพเนื้อเยื่อด้วยพาราฟินและย้อมสีเพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของผิวหนังในระดับจุลภาค ผลการศึกษา พบว่า จำนวนเซลล์นิวโทรฟิลล์ (neutrophils) เพิ่มขึ้นและลดลงอย่างมีนัยสำคัญที่บริเวณแผลหลังจากการผ่าตัดในช่วงระยะอักเสบ (inflammatory phase) ในวันที่ 12 ($p=0.0068$) และวันที่ 16 ($p=0.0028$) ตามลำดับ จากนั้นเปลี่ยนเป็นพอลิมอร์โฟนิวเคลียร์ ลูโคไซด์ (polymorphonuclear leukocytes) หรือเซลล์แมโครฟาจ (macrophages) ในวันที่ 12 ($p=0.0394$) และวันที่ 16 ($p=0.0038$) ซึ่งเป็นระยะที่มีการสร้างเนื้อเยื่อทดแทน (proliferative phase) โดยมีการสร้างสารโครงสร้างพื้นฐาน (ground substance and matrix synthesis) การสร้างเส้นเลือดใหม่ (angiogenesis) การสร้างเนื้อเยื่อพังผืด (fibroplasia) การสร้างขอบเนื้อเยื่อ (granulation) การสร้างเยื่อบุผิว (epithelialization) และการสะสมของเส้นใยคอลลาเจน (collagen deposition) ตามลำดับ จากภาพที่ 4.4 แสดงพยาธิสภาพของการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเนื้อเยื่อผิวหนังที่ได้รับสารเคอร์คูมินอนุภาคเงินนาโนไฮโดรเจลในช่วงระยะเวลาที่แตกต่างกัน จำนวนเซลล์นิวโทรฟิลล์หรือโมโนนิวเคลียร์อะแกรนูโลไซด์ และพอลิมอร์โฟนิวเคลียร์ ลูโคไซด์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญในวันที่ 12 และ 16 ซึ่งบ่งชี้การผ่านพ้นระยะอักเสบได้เร็วกว่าปกติ (ภาพที่ 4.4 b, d) ขณะที่จำนวนการสร้างเนื้อเยื่อพังผืดเพิ่มขึ้นในวันที่ 8 ($p=0.0040$) และลดลงในวันที่ 16 ($p=0.0005$) อีกทั้งมีการสร้างหลอดเลือดใหม่เพิ่มขึ้นในวันที่ 4 ($p=0.0029$) และวันที่ 8 ($p=0.0197$) ซึ่งบ่งชี้ระยะที่มีการสร้างเนื้อเยื่อทดแทนได้เร็วกว่าการทาเจลฆ่าเชื้อแบคทีเรียมาตรฐาน (ภาพที่ 4.4 c, e) ทั้งนี้ร้อยละของการสร้างเยื่อบุผิวใหม่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในกลุ่มที่ได้รับสารเคอร์คูมินอนุภาคเงินนาโนไฮโดรเจลตลอดระยะเวลา 16 วัน [วันที่ 8 ($p=0.0146$), วันที่ 12 ($p=0.0009$) และวันที่ 16 ($p=0.0169$) ตามลำดับ] ดังที่แสดงในภาพที่ 4.5 a, b นอกจากนี้สารเคอร์คูมินอนุภาคเงินนาโนไฮโดรเจลสามารถเพิ่มการสะสมของเส้นใยคอลลาเจนในวันที่ 8 ($p=0.0053$) และวันที่ 12 ($p=0.0398$) (ภาพที่ 4.6 a, b) ผลการศึกษานี้ทำให้ทราบถึงประสิทธิภาพของสารเคอร์คูมินอนุภาคเงินนาโนไฮโดรเจลสามารถช่วยเร่งขบวนการสมานแผลด้วยการเข้าสู่ในระยะเวลาที่มีการสร้างเนื้อเยื่อทดแทนได้เร็วกว่าเจลฆ่าเชื้อแบคทีเรียมาตรฐาน



ภาพที่ 4.4 ผลของสารเคอร์คูมินอนุภาคเงินนาโนไฮโดรเจลต่อการเปลี่ยนแปลงพยาธิวิทยาของกล้ามเนื้อแผลที่ผิวหนังสัตว์ทดลอง



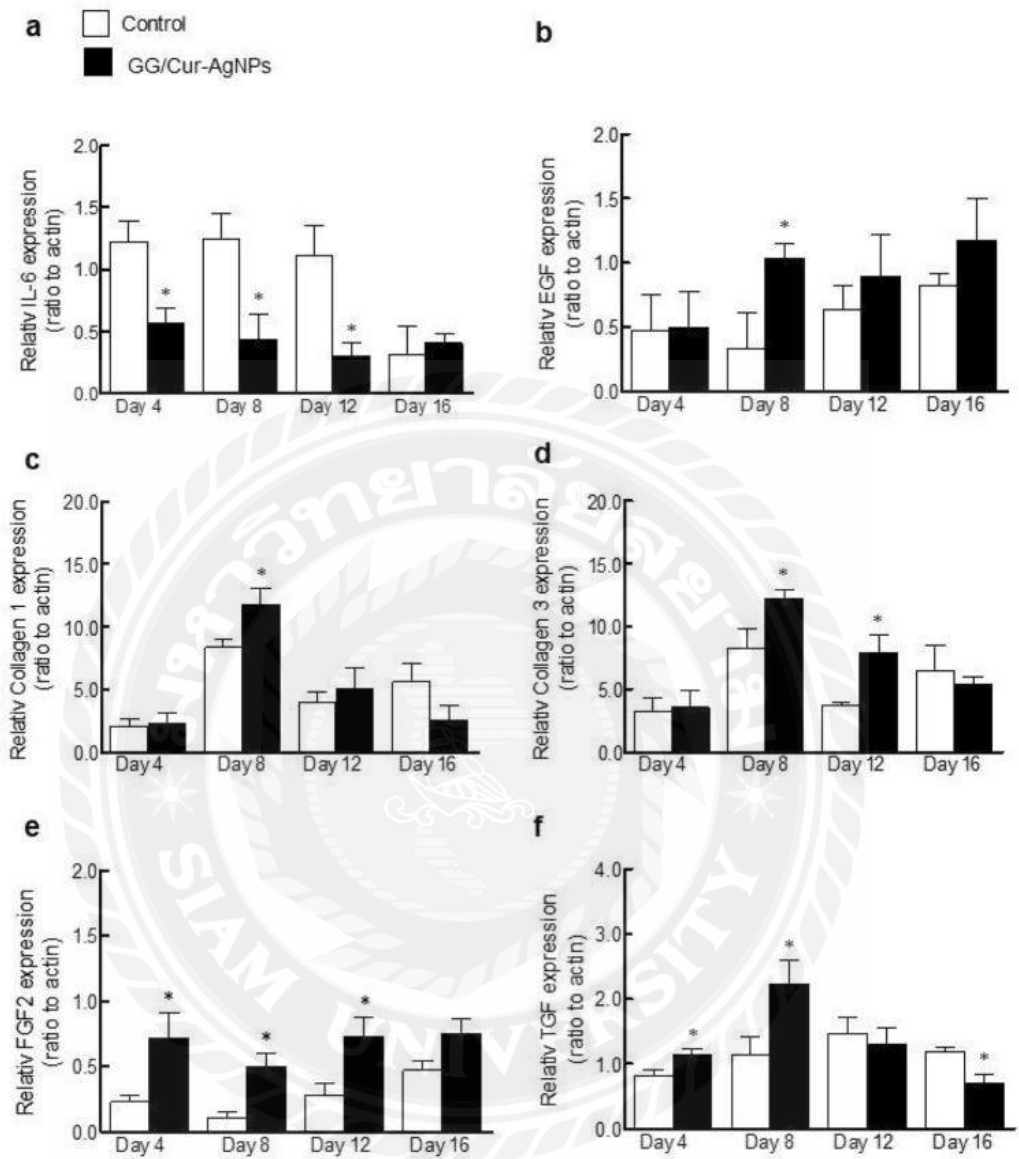
ภาพที่ 4.5 ผลของสารเคอร์คูมินอนุภาคนาโนไฮโดรเจลต่อการสร้างเยื่อผิวหนังใหม่ของการสมานแผลที่ผิวหนังสัตว์ทดลอง



ภาพที่ 4.6 ผลของสารเคอร์คูมินอนุภาคนาโนไฮโดรเจลต่อการสะสมของเส้นใยคอลลาเจนของการสมานแผลที่ผิวหนังสัตว์ทดลอง

4.5 ผลของสารเคอร์คูมินอนุภาคเงินนาโนไฮโดรเจลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณยีนส่งเสริมและควบคุมการสมานแผลที่ผิวหนังสัตว์ทดลอง

การเปลี่ยนแปลงระดับโมเลกุลของการสมานแผลสามารถนำมาอธิบายขบวนการลดภาวะอักเสบและอัตราการปิดของแผล การศึกษาครั้งนี้จึงวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงปริมาณยีนส่งเสริมและควบคุมการสมานแผลระดับ mRNA ได้แก่ interleukin 6 (IL-6), epidermal growth factor (EGF), collagen-1, collagen-3, fibroblast growth factor (FGF2) และ transforming growth factor β 1 (TGF- β 1) ด้วยเทคนิค RT-qPCR ดังแสดงในภาพที่ 4.7 ผลการศึกษา พบว่า สารเคอร์คูมินอนุภาคเงินนาโนไฮโดรเจลลดปริมาณยีนสารชักนำการอักเสบ IL-6 ในวันที่ 4 ($p=0.0018$), วันที่ 8 ($p=0.0253$) และวันที่ 12 ($p=0.0175$) (ภาพ 4.7 a) และเพิ่มปริมาณยีนส่งเสริมการสร้างและควบคุมการสมานแผลในวันที่ 8 ภายหลังได้รับการรักษา ได้แก่ EGF ($p=0.0427$), collagen-1 ($p=0.0445$) และ collagen-3 ($p=0.0454$) (ภาพที่ 7 b-d) ซึ่งปริมาณยีน collagen-3 เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องในวันที่ 12 ($p=0.0225$) (ภาพที่ 4.7 d) รวมถึงปริมาณของยีน FGF2 เพิ่มขึ้นหลังยาได้รับสารเคอร์คูมินอนุภาคเงินนาโนไฮโดรเจลในวันที่ 4 ($p=0.0354$), วันที่ 8 ($p=0.0119$) และวันที่ 12 ($p=0.0263$) (ภาพที่ 4.7 e) เช่นเดียวกับยีน TGF- β 1 ที่เพิ่มปริมาณในวันที่ 4 ($p=0.0005$) และวันที่ 8 ($p=0.0411$) และลดลงในวันที่ 16 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.0180$) ผลการศึกษานี้ทำให้ทราบถึงผลกลไกระดับโมเลกุลของสารเคอร์คูมินอนุภาคเงินนาโนไฮโดรเจลต่อการเข้าสู่ขบวนการสมานแผลที่ประกอบด้วย การอักเสบ การเติบโตของเซลล์ และการสร้างคอลลาเจน



ภาพที่ 4.7 ผลของสารเคอร์คูมินอนุภาคเงินนาโนไฮโดรเจลต่อขึ้นสังเสริมและควบคุมการสมานแผลที่ผิวหนังสัตว์ทดลอง

บทที่ 5

สรุปผล อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

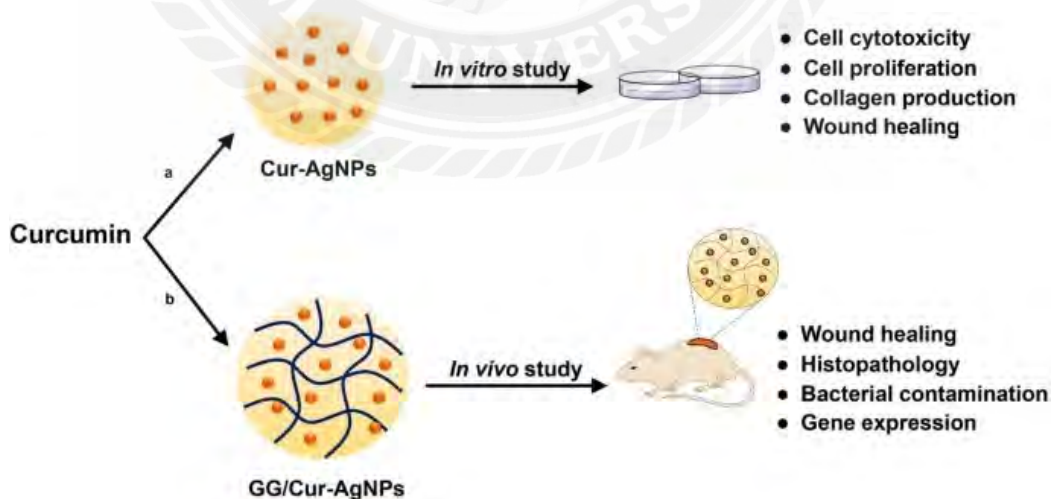
5.1 สรุปผลการวิจัย

งานวิจัยนี้ทำการศึกษาประสิทธิภาพของไฮโดรเจลที่มีส่วนผสมของสารเคอร์คูมินอนุภาคเงินนาโนในเซลล์ผิวหนังเพาะเลี้ยง ได้แก่ ความเป็นพิษของเซลล์ การเพิ่มจำนวนเซลล์ การสร้างคอลลาเจน และการสมานแผล จากนั้นทำการศึกษาพยาธิสรีรวิทยาของการสมานแผลที่ผิวหนังหนูแรทสายพันธุ์วิสตาร์ ได้แก่ การสมานแผล จำนวนเชื้อแบคทีเรีย โครงสร้างผิวหนังระดับจุลภาค และปริมาณยีนส่งเสริมและควบคุมการสมานแผล ดังภาพที่ 5.1

5.1.1 สารเคอร์คูมินอนุภาคเงินนาโนมีความเป็นพิษต่ำและสามารถเพิ่มจำนวนเซลล์ ปริมาณคอลลาเจน การปิดรอยแผล และการสมานแผลในเซลล์เนื้อเยื่อผิวหนังมนุษย์เพาะเลี้ยง

5.1.2 สารเคอร์คูมินอนุภาคเงินนาโนไฮโดรเจลสามารถลดจำนวนเชื้อแบคทีเรีย ยับยั้งการอักเสบ และเร่งอัตราการสมานแผลของผิวหนังสัตว์ทดลอง

5.1.3 สารเคอร์คูมินอนุภาคเงินนาโนไฮโดรเจลสามารถเร่งกระบวนการสมานแผล ด้วยการลดปริมาณยีนชักนำการอักเสบและเพิ่มปริมาณยีนส่งเสริมและควบคุมการสมานแผลที่ผิวหนังสัตว์ทดลอง



ภาพที่ 5.1 สรุปขั้นตอนการวิจัย

5.2. อภิปรายผล

เป็นที่ทราบกันดีว่า ขมิ้นชัน (*Curcuma longa L.*) อยู่ในวงศ์ขิง (Zingiberaceae) เป็นพืชล้มลุกที่มีเหง้าอยู่ใต้ดิน เนื้อในของเหง้าจะเป็นสีเหลือง มีกลิ่นหอมเฉพาะตัว โดยถิ่นกำเนิดอยู่ในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ องค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญของขมิ้น คือ สารกลุ่มเคอร์คิวมินอยด์ (curcuminoids) ประกอบด้วย เคอร์คิวมิน (curcumin), monodesmethoxycurcumin, และ bisdesmethoxycurcumin ซึ่งมีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคและลดการอักเสบ (Gupta et al., 2015; Boskabady et al., 2021; Fuloria, et al., 2022) ด้วยสรรพคุณทางเภสัชวิทยาของสารเคอร์คิวมินในการลดการติดเชื้อและการอักเสบที่กล่าวมาในข้างต้น คณะวิจัยจึงได้นำสารเคอร์คิวมินที่สกัดจากขมิ้นชันมาเป็นส่วนประกอบหนึ่งของการพัฒนาไฮโดรเจลสมานแผล ซึ่ง ผศ.ดร.ศิริรัตน์ กุลชาติ และคณะวิจัย ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ได้สังเคราะห์และศึกษาคุณสมบัติของไฮโดรเจลที่ซ่อมแซมตัวเองได้โดยวัสดุเชิงที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียและสมานแผล นอกจากนี้ได้ทำการพัฒนาการสังเคราะห์ไฮโดรเจลสำหรับนำส่งยาหรือสารสารเคอร์คิวมินที่สกัดจากขมิ้นชันเพื่อประยุกต์ใช้เป็นวัสดุปิดแผล โดยใช้อนุภาคนาโนเป็นองค์ประกอบที่สำคัญ (Talodthaisong et al., 2021) ฉะนั้นการศึกษานี้จึงมุ่งเน้นการทดสอบความปลอดภัยและประสิทธิภาพของสารเคอร์คิวมินอนุภาคนาโนในไฮโดรเจลต่อการสมานแผลในเซลล์ผิวหนังเพาะเลี้ยงและสัตว์ทดลอง ซึ่งจากผลการวิเคราะห์ข้อมูลมีประเด็นที่สามารถนำมาอภิปรายผลได้ดังนี้

5.2.1 สารเคอร์คิวมินอนุภาคนาโนในไฮโดรเจลมีความเป็นพิษต่ำและสามารถเพิ่มจำนวนเซลล์ ปริมาณคอลลาเจน การปิดแผลและการสมานแผลของเซลล์ผิวหนังมนุษย์เพาะเลี้ยง

ผลการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนังมนุษย์เพาะเลี้ยงได้พิจารณาจากร้อยละการรอดของเซลล์ เซลล์ผิวหนังที่อยู่ในชั้นหนังแท้หรือไฟโบรบลาสต์ โดยมุ่งหวังการประเมินความปลอดภัยของสารเคอร์คิวมินอนุภาคนาโนเพื่อใช้เป็นข้อมูลสำคัญในการเลือกความเข้มข้นเหมาะสมต่อการพัฒนาสูตรสารประกอบไฮโดรเจลสมานแผล ผลการศึกษา พบว่า สารเคอร์คิวมินอนุภาคนาโนความเข้มข้น 0.03-0.20 nM มีความเป็นพิษต่ำและค่าเฉลี่ยของร้อยละเซลล์รอดชีวิตมากกว่าร้อยละ 80 อีกทั้งสามารถเพิ่มจำนวนเซลล์ ปริมาณคอลลาเจนมากกว่าร้อยละ 50 อีกทั้งเร่งการปิดแผลและการสมานแผลมากกว่าเจลฆ่าเชื้อแบคทีเรียมาตรฐานร้อยละ 25 ฉะนั้นการศึกษาก่อนหน้าของสารเคอร์คิวมินอนุภาคนาโนในเซลล์เนื้อเยื่อผิวหนังมนุษย์เพาะเลี้ยงทำให้ทราบช่วงความเข้มข้นที่ห่อหุ้มด้วยอนุภาคนาโนมาสังเคราะห์ร่วมกับไฮโดรเจลก่อนนำมาทดสอบในสัตว์ทดลองอย่างปลอดภัย ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับรายงานวิจัยของ Dai และคณะ ปี ค.ศ. 2017 และ Sukumaran และคณะ ปี ค.ศ. 2020 พบว่า สารเคอร์คิวมินที่ความเข้มข้น 0.003% มีความเป็นพิษ

ต่ำ (fibroblast cytotoxicity) และช่วยเร่งการสมานแผลในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ ได้แก่ การสร้างจำนวนเซลล์ และการเคลื่อนย้ายเซลล์ (scratch wound assay) (Dai et al., 2017; Sukumaran et al., 2020)

5.2.2 สารเคอร์คูมินอนุภาคเงินนาโนไฮโดรเจลมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียและเร่งการสมานแผลสัตว์ทดลอง

ผลการทดสอบฤทธิ์ด้านการติดเชื้อแบคทีเรียและเร่งการสมานแผลของไฮโดรเจลที่มีส่วนผสมสารเคอร์คูมินอนุภาคเงินในสัตว์ทดลอง พบว่า สารเคอร์คูมินอนุภาคเงินนาโนไฮโดรเจลสามารถการติดเชื้อแบคทีเรียและการอักเสบได้ดีกว่าเจลฆ่าเชื้อแบคทีเรียมาตรฐาน โดยอัตราการสมานแผลของผิวหนังสัตว์ทดลอง (wound contraction rate) เกิดขึ้นได้เร็วกว่ากลุ่มควบคุมที่ได้รับเจลสมานแผลมาตรฐาน ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของผิวหนังระดับจุลภาค กล่าวคือ สารเคอร์คูมินอนุภาคเงินนาโนไฮโดรเจลสามารถลดเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ชักนำให้เกิดการอักเสบ ได้แก่ mononuclear leukocytes และ polymorphonuclear leukocytes รวมถึงมีการเพิ่มจำนวนการสร้างหลอดเลือดใหม่และการสร้างคอลลาเจนในบริเวณแผลของกลุ่มที่ได้รับสารเคอร์คูมินอนุภาคเงินนาโนไฮโดรเจลอีกด้วย ทั้งนี้สารเคอร์คูมินจากขมิ้นชันเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านการอักเสบ เชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา และ ไวรัส (Akbi et al., 2014; Marchiani, 2014; Praditya, 2019) งานวิจัยนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Rai และคณะ ปี ค.ศ. 2020 ซึ่งได้พัฒนาและทดสอบเคอร์คูมินอนุภาคนาโนที่มีความปลอดภัยต่อการต้านจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค ได้แก่ เชื้อรา ไวรัส โปริโตซัว และปรสิต นอกจากนี้ยังยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มจากแบคทีเรีย เช่น *Pseudomonas aeruginosa* และสารอนุมูลอิสระ (Rai, 2020) ยิ่งไปกว่านั้น อนุภาคเงินที่ห่อหุ้มสารสำคัญสามารถลดจำนวนเชื้อแบคทีเรียด้วยการทำลายโครงสร้างผนังเซลล์และยับยั้งการหายใจระดับเซลล์ของแบคทีเรีย (Agnihotri et al., 2014; Deshmukh et al., 2019; Yin et al., 2020) ผลการศึกษาของ Talodthaisong และคณะ ปี ค.ศ. 2021 ได้สังเคราะห์สารเคอร์คูมินอนุภาคเงินร่วมกับซิงค์ออกไซด์สามารถลดแบคทีเรียแกรมบวก *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) และแบคทีเรียแกรมลบ *Escherichia coli* (*E. coli*) (Talodthaisong et al., 2021) อีกทั้งพอลิเมอร์กัวร์กัม (guar gum polymers) ที่เป็นส่วนประกอบไฮโดรเจลมีความปลอดภัย พอลิเมอร์กัวร์กัมสามารถดูดซับน้ำได้ดีและดูดซับน้ำเหลืองและสารชักนำการอักเสบบริเวณบาดแผล (Yoon et al., 2008; Ghosh et al., 2013; Qi et al., 2021) ฉะนั้นสารเคอร์คูมินที่ถูกห่อหุ้มด้วยอนุภาคเงินและไฮโดรเจลซึ่งสามารถลดการติดเชื้อแบคทีเรียและการอักเสบของแผล ทำให้เร่งอัตราการสมานแผลจากการปิดของบาดแผลด้วยการสร้างคอลลาเจนและเร่งกระบวนการปรับเปลี่ยนสภาพของเนื้อเยื่อผิวหนัง

5.2.3 กลไกระดับโมเลกุลที่เป็นไปได้ของสารเคอร์คูมินอนุภาคเงินนาโนไฮโดร

เจลในการสมานแผล

กลไกทางชีววิทยาระดับโมเลกุลของขบวนการสมานแผลมีความซับซ้อนและเกี่ยวข้องกับการย้ายเซลล์ (cell migration), การเพิ่มจำนวนของเซลล์ (cell proliferation) และการสะสมเมทริกซ์นอกเซลล์ (extracellular matrix) โดยการสร้างคอลลาเจน, โพรทีโอไกลแคน (proteoglycan) และ ไฟโบรเนคติน (fibronectin) ซึ่งบาดแผลเฉียบพลันอาจได้รับการซ่อมแซมอย่างรวดเร็ว ในขณะที่แผลที่เกิดขึ้นเรื้อรังซึ่งมีความผิดปกติทางพยาธิสรีรวิทยาที่มีอยู่ก่อนแล้วนั้นมีการหายของแผลล่าช้า (Harding, 2002)

การศึกษาครั้งนี้ได้ทำการผ่าตัดผิวหนังของสัตว์ทดลองให้เป็นแผลเปิดและทาเจลที่มีส่วนผสมเจลมาเชื้อแบคทีเรียมาตรฐานและสารเคอร์คูมินอนุภาคเงินนาโนไฮโดรเจล พบว่า สารเคอร์คูมินอนุภาคเงินนาโนไฮโดรเจลมีอัตราการสมานแผลได้ดีกว่าแผลทาเจลมาเชื้อแบคทีเรียมาตรฐาน กลไกระดับโมเลกุลที่เป็นไปได้ของสารเคอร์คูมินอนุภาคเงินนาโนไฮโดรเจลต่อการสมานแผลเกี่ยวข้องกับการแสดงออกของ NF- κ B และ TGF- β 1 ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการเริ่มต้นการตอบสนองการอักเสบในระยะแรกของการสมานแผล โดยป้องกันผลกระทบจากการติดเชื้อแบคทีเรีย รวมถึงการหลั่งสารส่งเสริมการเจริญเติบโตของเซลล์ ได้แก่ EGF และ FGF2 มาช่วยกระตุ้นระยะการแพร่กระจายโดยกระตุ้นการย้ายเซลล์เชื่อมผิวและการเพิ่มจำนวนเซลล์ภายในบริเวณบาดแผล และต่อมาคอลลาเจนมีสังเคราะห์ขึ้นใหม่ ซึ่งอาศัยการแสดงออกของยีนคอลลาเจนส่งเสริมการสมานแผล ได้แก่ collagen-1 และ collagen-3 ซึ่งส่งเสริมการสร้างเนื้อเยื่อใหม่และการเกิดแผลเป็นภายหลังที่มีการปิดบาดแผล (Harding, 2002; Nagpal & Sood, 2013)

ผลการศึกษานี้ พบว่า สารเคอร์คูมินสามารถลดปริมาณยีนชักนำการอักเสบ interleukin-6 (IL-6) ซึ่งอาจรวมถึงการแสดงออกของไซโตไคน์ที่ก่อให้เกิดการอักเสบในระยะการอักเสบ เช่น tumor necrosis factor alpha (TNF- α), IL-1, และ IL-8 (Jain et al., 2009; Wu, 2014) นอกจากนี้ สารเคอร์คูมินสามารถยับยั้งยีน NF- κ B ที่ลดการทำงานของวิถีไคเนส เช่น AKT และ PI3K ภายในนิวเคลียส โดยทั่วไปแล้วนั้น NF- κ B ถูกกีดกันการทำงานทางสรีรวิทยาด้วยตัวยับยั้ง (IKB) ในช่วงการอักเสบ นอกจากนี้ การเพิ่มขึ้นของสารชักนำการอักเสบ เช่น ไซโตไคน์และลิโปไคน์ จะกระตุ้น NF- κ B ซึ่งมีผลต่อต้านอนุมูลอิสระที่กระตุ้นการผลิตและการทำงานของเซลล์ภูมิคุ้มกัน ได้แก่ เซลล์เม็ดเลือดขาวทีลิมโฟไซต์ (T-lymphocyte), เซลล์เม็ดเลือดขาวแมคโครฟาจ (macrophages), เซลล์เม็ดเลือดขาวบีลิมโฟไซต์ (B lymphocyte) และ เนทเชอรัล คิลเลอร์ เซลล์ (natural killer cells) เป็นต้น ทำให้การหายของแผลช้าลง (Frey & Malik, 2004; Mantovani et al., 2013; Hunter & Plaen, 2014; Panchatcharam, 2014)

มากไปกว่านั้น สารเคอร์คูมินยังมีบทบาทสำคัญในระยะเร่งการปรับเปลี่ยนสภาพของเนื้อเยื่อในระหว่างการสร้างเนื้อเยื่อและการปรับสมดุลโครงสร้างของแผล Gopinath และคณะ ปี ค.ศ. 2004 ได้รายงานผลการศึกษาศาสตร์เคอร์คูมินช่วยให้กระบวนการปรับสมดุลโครงสร้างของแผลดีขึ้นจากการสังเคราะห์ไฮดรอกซีโพรทีนและคอลลาเจน (Gopinath et al., 2004) อีกทั้งสารเคอร์คูมินช่วยลดปริมาณเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีนเอส (membrane matrix metallo-proteinases) เพิ่มจำนวนยึดรั้งของเซลล์ (adhesion) การบุกรุกของเซลล์ (cellular invasion) การสร้างเส้นเลือดใหม่ (angiogenesis) และการสร้างเนื้อเยื่อบุผิว (epithelialization) (Wu et al., 2014; Barchitta, 2019) จึงทำให้ระยะการสร้างเนื้อเยื่อและการปรับสมดุลโครงสร้างของแผลเกิดการหดตัวของบาดแผลทำให้แผลมีขนาดเล็กลง ตามลำดับ

5.3 ข้อเสนอแนะ

5.3.1 การศึกษาการคงสภาพไฮโดรเจลและการขึ้นรูปแผ่นปิดแผลด้วยโพลีไวนิลแอลกอฮอล์ต่อลักษณะทางกายภาพ ความยืดหยุ่นของแผ่นปิดแผล การดูดซับของเหลว การปลดปล่อยสาร และความระคายเคืองของผิวหนัง เป็นสิ่งที่น่าสนใจในการวิจัยถัดไป

5.3.2 เนื่องด้วยงานวิจัยนี้ได้ใช้นุภาคเงินนาโนร่วมกับการสังเคราะห์ไฮโดรเจลสมานแผล จึงมีความจำเป็นต้องศึกษาการตกค้างของโลหะเงินในสัตว์ทดลองเพิ่มเติม ก่อนนำไปประยุกต์ใช้จริงกับแผลที่ผิวหนังของมนุษย์

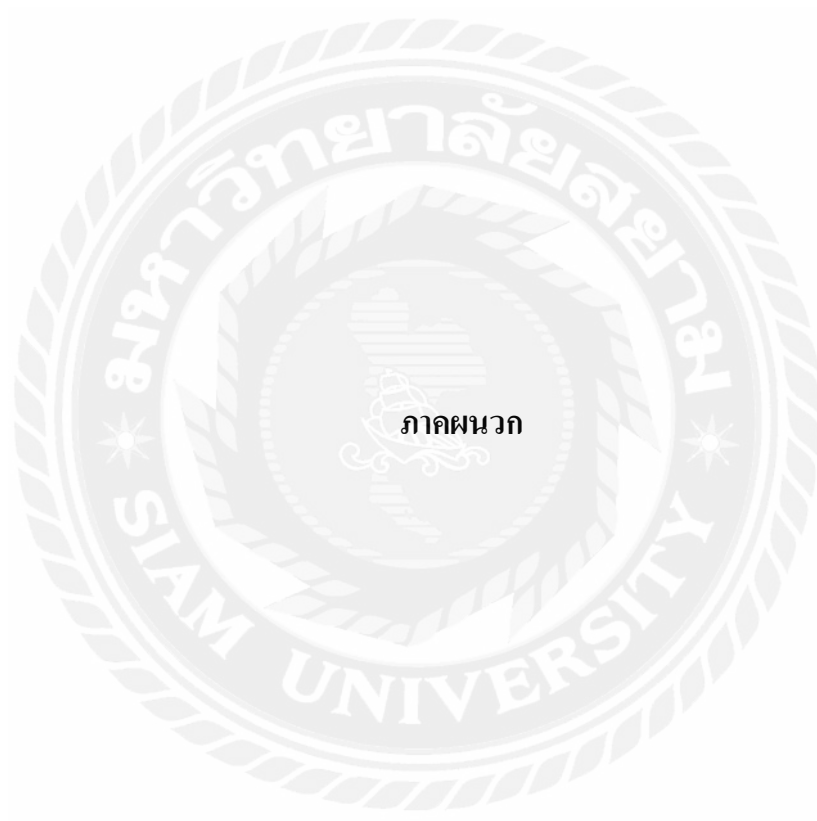
บรรณานุกรม


- Abdallah, D.J. and Weiss, R.G. (2000). Organogels and low molecular mass organic gelators. *Adv Mater*, 12, 237–1247.
- Agnihotri, S., Mukherji, S., and Mukherji. (2014). Size-controlled silver nanoparticles synthesized over the range 5–100 nm using the same protocol and their antibacterial efficacy. *RSC Advances*, 4(8), 3974–3983.
- Akbik, D., et al. (2014). Curcumin as a wound healing agent. *Life Sci*, 116(1), 1–7.
- Barchitta, M., et al. (2019). Nutrition and wound healing: An overview focusing on the beneficial effects of curcumin. *Int J Mol Sci*, 20(5), 1119.
- Boskabady, M.H., Amin, F., and Shakeri, F. (2021). The effect of *Curcuma longa* on inflammatory mediators and immunological, oxidant, and antioxidant biomarkers in asthmatic rats. *Evid Based Complement Alternat Med: eCAM*, 4234326.
- Chandan, K.S., and Sashwati, R. (2013). Wound healing. In : Neligan P, Geoffrey C. *Plastic surgery*. 3rd ed. China; Elsevier Inc. p. 240–266.
- Dai, L. et al. (2016). Silver nanoparticles-containing dual-function hydrogels based on a guar gum-sodium borohydride system. *Sci Rep*, srep36497.
- Dai, X., et al. (2017). Nano-formulated curcumin accelerates acute wound healing through Dkk-1-mediated fibroblast mobilization and MCP-1-mediated anti-inflammation. *NPG Asia Mater*, 9(3), e368–e368.
- Deshmukh, S.P., et al. (2019). Silver nanoparticles as an effective disinfectant: A review. *Mater. Sci Eng.:* C. 97(2019):954–965.
- Frey, R.S., and Malik, A.B. (2004). Oxidant signaling in lung cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 286, L1–L3.
- Fuloria, S., et al. (2022). A comprehensive review on the therapeutic potential of *Curcuma longa* Linn. in relation to its major active constituent curcumin. *Front Pharmacol*, 13, 820806.

- Geoffrey, C., and Victor, W. (2014). Wound healing: Normal and abnormal. In : Charles, H., Kevin C., Arun, K., Geoffrey, C., Babak, J., Peter, J., Scott, L., editors. *Grabb and Smith's plastic surgery*. 7th ed. Philadelphia; Lippincott Williams & Wilkins. p.13–19.
- Ghosh Auddy, R., et al. (2013). New guar biopolymer silver nanocomposites for wound healing applications. *BioMed research international*, 912458.
- Gopinath, D., et al. (2004). Dermal wound healing processes with curcumin incorporated collagen films. *Biomaterials*, 25(10), 1911–1917.
- Gupta, A., Mahajan, S., and Sharma, R. (2015). Evaluation of antimicrobial activity of *Curcuma longa* rhizome extract against *Staphylococcus aureus*. *Biotechnol Rep*, 6, 51–55.
- Harding, K.G., Morris, H.L., and Patel, G.K. (2002). Science, medicine and the future: healing chronic wounds. *BMJ* (Clinical research ed.), 324(7330), 160–163.
- Hoffman, A.S. (2013). Stimuli-responsive polymers: Biomedical applications and challenges for clinical translation. *Adv Drug Deliv Rev*, 65, 10–16.
- Hunter, C.J., and De Plaen, I.G. (2014). Inflammatory signaling in NEC: Role of NF- κ B, cytokines and other inflammatory mediators. *Pathophysiology*, 21(1), 55–65.
- Jain, S. K., et al. (2009). Curcumin supplementation lowers TNF-alpha, IL-6, IL-8, and MCP-1 secretion in high glucose-treated cultured monocytes and blood levels of TNF-alpha, IL-6, MCP-1, glucose, and glycosylated hemoglobin in diabetic rats. *Antioxid Redox Signal*, 11(2), 241–249.
- Jing, L. Peng, et al. (2017). Collagen hydrogel dressing for wound healing and angiogenesis in diabetic rat models. *Int J Clin Exp Med*, 10(12), 16319–16327.
- Lee, K.Y., and Mooney, D.J. (2001). Hydrogels for tissue engineering. *Chem Rev*, 101, 1869–1880.
- Li, Y. et al. (2013). Magnetic hydrogels and their potential biomedical applications. *Adv Funct Mater*, 23, 660–672.
- Lin, Z., et al. (2013). Thermoresponsive hydrogels from phosphorylated ABA triblock copolymers: A potential scaffold for bone tissue engineering. *Biomacromolecules*, 14, 2206–2214.
- Mantovani, A., Bussolino, F., and Introna, M. (1997). Cytokine regulation of endothelial cell function: from molecular level to the bedside. *Immunology today*, 18(5), 231–240.

- Marchiani, A., et al. (2014). Curcumin and curcumin-like molecules: from spice to drugs. *Curr Med Chem*, 21(2), 204–222.
- Nagpal, M., and Sood, S. (2013). Role of curcumin in systemic and oral health: An overview. *J Nat Sci Biol*, 4(1), 3–7.
- Nasim, T., Panda, A. B., and Bandyopadhyay, A. (2013). Guar gum and guar gum-oligomeric poly (vinyl alcohol) blends as novel flocculants for kaolinated waste water. *Int J Biol Macromol*, 58, 140–147.
- Nirwana, I., et al. (2021). Cytotoxicity and proliferation evaluation on fibroblast after combining calcium hydroxide and ellagic acid. *J Adv Pharm Technol Res*, 12(1), 27–31.
- Osada, Y. and Gong, J.P. (1998). Soft and wet materials: Polymer gels. *Adv Mater*, 10, 827–837.
- Panchatcharam, M., et al. (2006). Curcumin improves wound healing by modulating collagen and decreasing reactive oxygen species. *Mol Cell Biochem*, 290(1-2), 87–96.
- Phadke, A. et al. (2012). Rapid self-healing hydrogels. *Proc Natl Acad Sci*, 109, 4383–4388.
- Praditya, D., et al. (2019). Anti-infective properties of the golden spice curcumin. *Front Microbiol*, 10, 912.
- Pramanik, N. et al. (2015). Characterization and evaluation of curcumin loaded guar gum/polyhydroxyalkanoates blend films for wound healing applications. *RSC Adv*, 5, 63489–63501.
- Qi, et al. (2021). Local anesthetic lidocaine-encapsulated polymyxin-chitosan nanoparticles delivery for wound healing: in vitro and in vivo tissue regeneration. *Drug Deliv*, 28(1), 285–292.
- Rai, M., et al. (2020). Curcumin and curcumin-loaded nanoparticles: antipathogenic and antiparasitic activities. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 18(4), 367–379.
- Sharma, M., et al. (2013). Self-healing guar gum and guar gum-multiwalled carbon nanotubes nanocomposite gels prepared in an ionic liquid. *Carbohydr Polym*, 98, 1025–1030.
- Shi, Z., Phillips, G.O., and Yang, G. (2013). Nanocellulose electroconductive composites. *Nanoscale* 5, 3194–3201.
- Shigekura, Y. et al. (2005). Anisotropic polyion-complex gels from template polymerization. *Adv Mater*, 17, 2695–2699.

- Sukumaran, S.K., Vadakkekuttical, R.J., and Kanakath, H. (2020). Comparative evaluation of the effect of curcumin and chlorhexidine on human fibroblast viability and migration: An in vitro study. *J Indian Soc Periodontol*, 24(2), 109–116.
- Talodthaisong, C., et al. (2021). The decoration of ZnO nanoparticles by gamma aminobutyric acid, curcumin derivative and silver nanoparticles: Synthesis, characterization and antibacterial Evaluation. *Nanomaterials*, 11(2), 442.
- Thangavel, P., et al. (2017). Accelerated healing of diabetic wounds treated with L-glutamic acid loaded hydrogels through enhanced collagen deposition and angiogenesis: An in vivo study. *Sci Rep*, 7(1), 10701.
- Ursula, M. Andreas, and J. Peter, MV. (2013). Skin wound healing: Repair biology, wound, and scar treatment. In: Neligan P, Geoffrey C. *Plastic surgery*. 3rd ed. China; Elsevier Inc. p.267-296.
- Vintiloiu, A., and Leroux, J.C. (2008). Organogels and their use in drug delivery — A review. *J Controlled Release*, 125, 179–192.
- Wei, Z. et al. (2014). Self-healing gels based on constitutional dynamic chemistry and their potential applications. *Chem Soc Rev*, 43, 8114–8131.
- Wongchitrat, P., et al. (2017). High-fat diet-induced plasma protein and liver changes in obese rats can be attenuated by melatonin supplementation. *Nutr Res*, 42, 51–63.
- Wu, N.C., and Wang, J.J. (2014). Curcumin attenuates liver warm ischemia and reperfusion-induced combined restrictive and obstructive lung disease by reducing matrix metalloproteinase 9 activity. *Transplant Proc*, 46(4), 1135–1138.
- Yildirim L., Thanh N.T, and Seifalian A.M. (2012). Skin regeneration scaffolds: a multimodal bottom-up approach. *Trends Biotechnol*, 30(12), 638–648.
- Yin, I. X., et al. (2020). The antibacterial mechanism of silver nanoparticles and its application in dentistry. *Int J Nanomedicine*, 15, 2555–2562.
- Yoon, S.J., Chu, D.C., and Raj Juneja, L. (2008). Chemical and physical properties, safety and application of partially hydrolyzed guar gum as dietary fiber. *J Clin Biochem Nutr*, 42(1), 1–7.



The logo of Siam University is a circular emblem. It features a central shield with a crown on top, surrounded by a wreath. The shield is set against a background of horizontal lines. The emblem is encircled by a rope-like border. The text "SIAM UNIVERSITY" is written in a serif font around the bottom half of the circle, and Thai text "มหาวิทยาลัยสยาม" is written around the top half.

ภาคผนวก ก

หนังสืออนุมัติการพิจารณาจรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลอง
คณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและใช้สัตว์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์



(Renew)

ANIMAL USE PROTOCOL APPROVAL

Protocol Number 021/2562

Animal Protocol Title

(Thai) การศึกษาประสิทธิภาพของเจลปิดแผลจากวัสดุเชิงประกอบไฮโดรเจลต่อการสมานแผลหูชาว และการระคายเคืองของผิวหนังกระต่าย

(English) Efficiency of hydrogel-based wound dressings on rat wound healing and skin irritation in rabbits

Main Project/Proposal Title (if available)

(Thai) การสังเคราะห์และศึกษาคุณสมบัติของไฮโดรเจลที่ซ่อมแซมตัวเองได้โดยวัสดุเชิงชีวภาพ

(English) Synthesis and properties of biomaterial based on self-healing hydrogels

Principal Investigator


Name-Surname (Thai) อาจารย์ ดร.ศรวุฑ ลากมณี

Name-Surname (English) Dr. Serawut Lapmanee

Location of Animal Housing Laboratory Animal Center, Thammasat University

Location of Animal Experiments Laboratory Animal Center, Thammasat University

This Animal Protocol Established under Ethical Principles and Guidelines for the Use of Animals, National Research Council of Thailand and Approved by Animal Care and Use Committee of Thammasat University.


 (Thunyatorn Yimsao, DVM)

Chair of Animal Ethical and Post Approval
Monitoring Subcommittee
Thammasat University


 (Prof. Dr. Sirivan Suebnukarn, D.D.S., Ph.D.)

Vice Rector for Research and Innovation
Chair of Animal Care and Use Committee
Thammasat University

Expiration Date

28 December, 2021

The logo of Srinakharinwirot University is a circular seal. It features a central emblem with a crown and a sword, surrounded by Thai script. The outer ring of the seal contains the text 'SRINAKHARINWIROT UNIVERSITY' in English and Thai script.

ภาคผนวก ข

การตีพิมพ์เผยแพร่บทความวิจัย

Bhubhanil, S., Talodthaisong, C., Khongkow, M., Namdee, K., Wongchitrat, P., Yingmema, W., Hutchison, J. A., Lapmanee, S., & Kulchat, S. (2021). Enhanced wound healing properties of guar gum/curcumin-stabilized silver nanoparticle hydrogels. *Scientific reports*, 11(1), 21836. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-01262-x>

Scientific Journal Rankings – Scimago: Quartile 1

5-year impact factor (2021): 5.516



OPEN

Enhanced wound healing properties of guar gum/curcumin-stabilized silver nanoparticle hydrogels

Sakkarin Bhubhanil¹, Chanon Talodthaisong², Mattaka Khongkow³, Katawut Namdee³, Prapimpun Wongchitrat⁴, Werayut Yingmema⁵, James A. Hutchison⁶, Sarawut Lapmanee^{1✉} & Sirinan Kulchat^{2✉}

Biocompatible materials that act as scaffolds for regenerative medicine are of enormous interest. Hydrogel-nanoparticle composites have great potential in this regard, however evaluations of their wound healing and safety *in vivo* in animal studies are scarce. Here we demonstrate that a guar gum/curcumin-stabilized silver nanoparticle hydrogel composite is an injectable material with exceptional wound healing and antibacterial properties. We show that the curcumin-bound silver nanoparticles themselves exhibit low cytotoxicity and enhance proliferation, migration, and collagen production in *in vitro* studies of human dermal fibroblasts. We then show that the hydrogel-nanoparticle composite promotes wound healing in *in vivo* studies on rats, accelerating wound closure by > 40% and reducing bacterial counts by 60% compared to commercial antibacterial gels. Histopathology indicates that the hydrogel composite enhances transition from the inflammation to proliferation stage of healing, promoting the formation of fibroblasts and new blood vessels, while target gene expression studies confirm that the accelerated tissue remodeling occurs along the normal pathways. As such these hydrogel composites show great promise as wound dressing materials with high antibacterial capacity.

Functional bio(nano)materials research, including towards new drug delivery systems and enhanced scaffolds for regenerative medicine, is a fast-developing field of the life sciences^{1,2}. Hydrogel biomaterials have been of much interest in this context as these three dimensional (3D), water absorbing and retaining, natural polymer networks have been shown to facilitate healing^{3,4}. Moreover, they can be biocompatible, have shape memory⁵, be self-healing⁶, injectable⁷, soft¹, and have a rubbery texture which is similar to human tissues. Hydrogels are key elements in numerous biotechnology/biomedical applications in the field of tissue engineering², wound dressing⁸, and drug delivery^{9,10}. Hydrogels based on polysaccharides¹¹ have received considerable attention due to their low cost, natural abundance, biodegradability, and low toxicity. While many hydrogels cannot be injected via syringe, shear-thinning hydrogels have recently overcome this limitation, as they display viscous flow under shear stress but fast recovery of stiffness after stress removal¹². In this work, we selected Guar Gum (GG) as the gelator to form injectable hydrogels. It is extracted from the seeds of *Cyamopsis tetragonoloba* and is composed of β -1,4-linked mannose residues with a branch of α -D-galactopyranose units at the 6-position⁷. GG has various applications in the biological and food industry due to its being non-toxic, more soluble than other biopolymers, inexpensive, biodegradable, and a facile gelator at room temperature^{13,14}. In addition, GG is biocompatible and employed in medical contexts such as in wound dressings¹⁵, drug delivery¹⁶, and artificial tissue engineering¹⁷ because it has very similar properties to native body tissues and retains function *in vivo*¹⁸.

¹Pre-Clinical Department, Faculty of Medicine, Siam University, Bangkok 10160, Thailand. ²Department of Chemistry, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand. ³National Nanotechnology Centre (NANOTEC), National Science and Technology Development Agency, Pathumthani 12120, Thailand. ⁴Center for Research and Innovation, Faculty of Medical Technology, Mahidol University, Nakhon Pathom 73170, Thailand. ⁵Laboratory Animal Center, Thammasat University, Pathumthani 12120, Thailand. ⁶School of Chemistry, The University of Melbourne, Parkville, VIC 3010, Australia. ✉email: sarawut.lap@siam.edu; sirikul@kku.ac.th

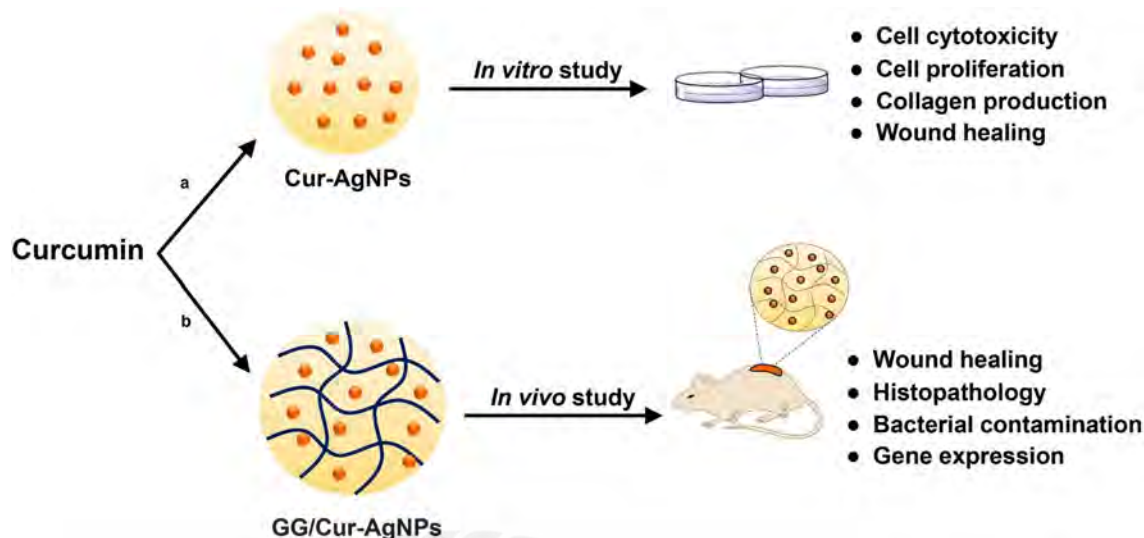


Figure 1. Overview of the study of enhanced wound healing using curcumin-silver nanoparticles (in vitro) and their hydrogel composites (in vivo). Curcumin is used as a surface-binding agent to stabilize silver nanoparticles (Cur-AgNPs) which are then composited into guar gum hydrogels (GG/Cur-AgNPs). (a) Cur-AgNPs were investigated for cell cytotoxicity, cell proliferation, collagen production, and wound healing in in vitro studies. (b) GG/Cur-AgNPs were studied for wound healing, histopathology, bacterial contamination, and gene expression in vivo on rats.

Wounds are physical injuries, including acute traumas or surgery, resulting in an opening or breaking of the skin. Subsequent infections present non-trivial health problems to patients, driving significant developments in wound treatment^{8,13,14}. Proper healing of wounds is essential for the restoration of disrupted anatomical stability, to shorten healing time, to decrease the risk of infection, and to restore functional status to the skin¹⁵. Repair of injured tissues, including regeneration and replacement stages, occurs in a sequence of events consisting of inflammation, proliferation, and migration of different cell types^{16,17}. The inflammation stage begins immediately after injury, first with vasoconstriction that favors homeostasis and releases inflammation mediators¹⁸. The most important function of this stage is not to repair damaged tissue but to stop blood flow to the wound. The proliferative phase is characterized by granulation tissue proliferation, driven mainly by fibroblasts and the angiogenesis process. At this stage, new blood vessels and fibroblasts in the extracellular matrix generate myofibroblasts to decrease the size of the wound¹⁹. Finally, the remodeling or maturation stage is characterized by reformulation and improvement of collagen fibers along tension lines to restore normal toughness to the skin^{17,20}.

Wound healing is thus a complicated process that can be affected by several factors including infection, stress, contamination, medication, and sex hormones. Recently, many medications have become available on the world market to treat/heal wounds²¹. However, these treatments exhibit limitations based on cost, treatment time, and toxicity (side effects). Current synthetic wound healing medications protect the wound from infection but do not speed up the healing process and can have several side effects. Natural product-based treatments may exhibit several advantages including biocompatibility, effectiveness, and ease of extraction from natural sources. In this work we focus on using natural, biodegradable, and injectable hydrogels composited with wound healing agents for in vivo wound healing investigations.

Various wound healing agents, including anti-inflammatories and antioxidant free radical scavengers, have been reported^{21,22}. Curcumin or *curcuma longa* is a plant commonly used as a culinary ingredient but which also exhibits potent antioxidant, antiseptic, anti-inflammatory, blood purifying, and wound-healing agent properties²³. It also inhibits lipid peroxidation and scavenges superoxide anion, singlet oxygen, nitric oxide, and hydroxyl radicals^{24–26}. However, its poor water solubility and fast degradation profile compromise its bioavailability upon administration²⁷. Improved biodistribution of native curcumin has been a target for a battery of nanotherapeutics, for example by coating curcumin at the surface of nanoparticles as a delivery vector. Many nanoparticles are intrinsic therapeutic agents themselves, for example silver nanoparticles (AgNPs) show broad-spectrum antimicrobial properties against fungi and bacteria, including antibiotic-resistant strains²⁸. They are now commonly used in biomedical applications for wound dressing and management^{29,30}. The use of natural products such as curcumin as stabilizers during the synthesis of AgNPs is cheap and eco-friendly^{31,32}, but may also enhance their therapeutic activity. However scarce reports exist of the in vivo efficacy of plant extract-stabilized AgNPs.

The current work addresses these issues. We report a biodegradable, injectable hydrogel nanoparticle composite prepared using guar gum (GG) and composited with silver nanoparticles stabilized by curcumin (GG/Cur-AgNPs)⁷. We find that the Cur-AgNPs have low cytotoxicity and enhance the proliferation and migration of, and collagen production within, human dermal fibroblasts. We then apply the composite hydrogel to full thickness incisional wounds in rats (Fig. 1), assessing histological changes, and expression of wound healing-related genes. The GG/Cur-AgNPs hydrogels enhance wound healing and antibacterial efficiency by > 40% and 60% respectively compared to commercial antibacterial gels for wound treatment.

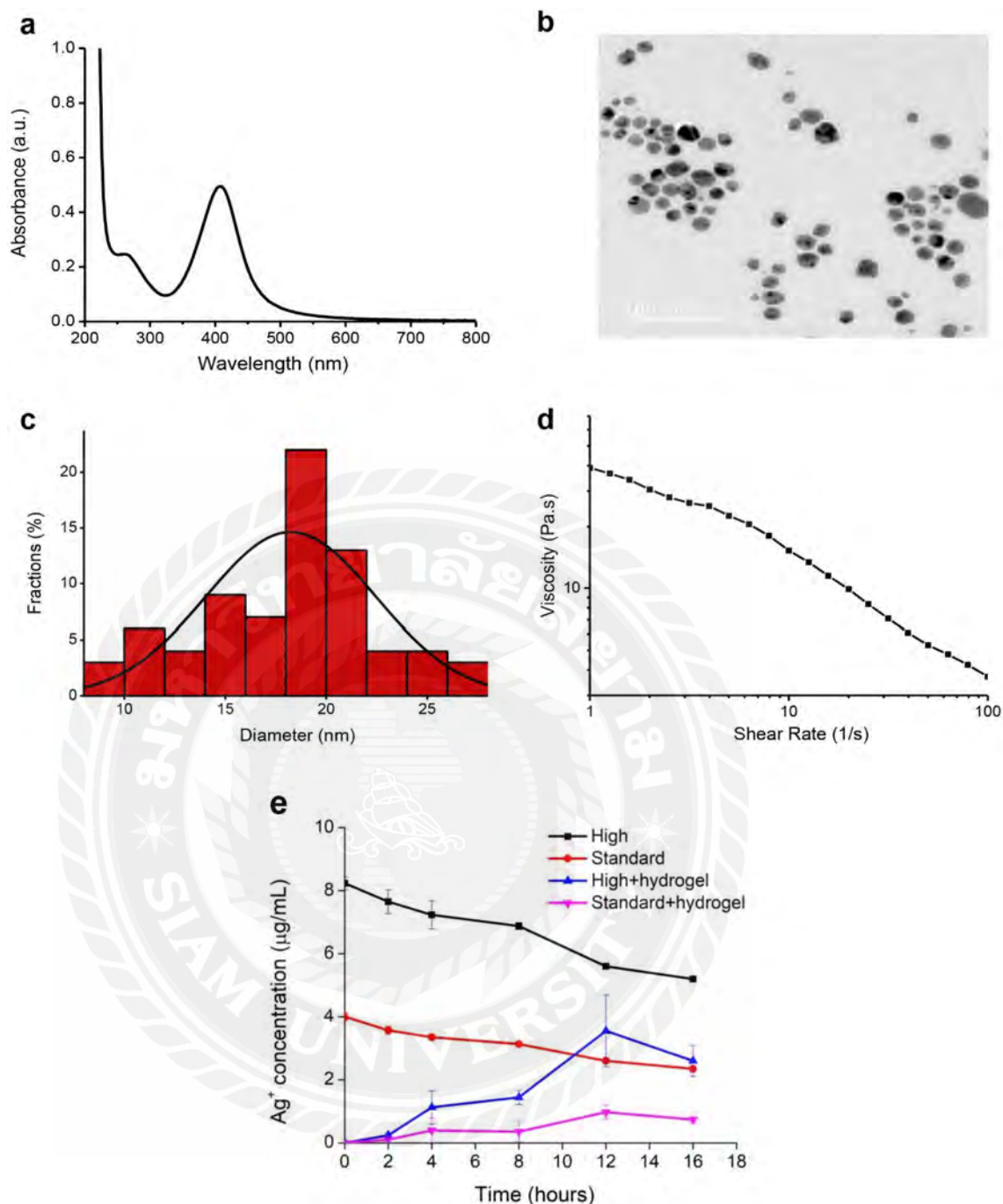


Figure 2. Characterization of Cur-AgNPs and shear-thinning properties of the composite GG/Cur-AgNPs self-healing hydrogel. **(a)** UV-Vis spectrum of Cur-AgNPs. **(b)** TEM image of Cur-AgNPs. **(c)** the average diameter of Cur-AgNPs is 18.24 ± 4.20 nm ($n=75$) from TEM. **(d)** Viscosity of the hydrogel composite as a function of shear rate. The hydrogel shows shear thinning which is a favorable property for injectability. **e**, The concentration of silver ions (Ag^+) released by ‘high’ (1000 $\mu\text{g/mL}$) and ‘standard’ (500 $\mu\text{g/mL}$) concentrations of Cur-AgNPs, and for the same concentrations of Cur-AgNPs encapsulated in the GG hydrogel.

Results and discussion

Synthesis and characterization of Cur-AgNPs and shear-thinning, injectable hydrogels. Silver nanoparticles stabilized by curcumin (Cur-AgNPs) were synthesized following a previously reported method⁷ and characterized using UV-vis spectroscopy and transmission electron microscopy (TEM) as shown in Fig. 2. The extinction spectrum of aqueous solutions of Cur-AgNPs display a well-defined surface plasmon resonance band at 407 nm (Fig. 2a), which together with the electron microscopy studies suggests a homogenous dispersion (a nanoparticle diameter distribution of 18.24 ± 4.20 nm ($n=75$) was determined from TEM). AgNPs in this size range have been associated with high antimicrobial activity and low cytotoxicity previously³³. The

hydrodynamic size and the zeta potential values of aqueous Cur-AgNPs were also determined, giving values of 51.9 ± 0.8 nm (PDI = 0.428) and -25.2 ± 1.4 mV respectively. NP diameters are normally found to be larger by DLS than by TEM as the former measures the ligand/water layer around the particle, though particle aggregation in solution may account for the difference herein. The high negative surface charge however indicates that the Cur-AgNPs are well-stabilized and we observed no settling of Cur-AgNP dispersions over months^{34,35}.

The hydrogel was prepared using guar gum as a gelator and borax as a cross-linker with a weight ratio of 5:1 (guar gum : borax) and then composited with the Cur-AgNPs to obtain GG/Cur-AgNPs following a previous report⁷. The GG hydrogel was characterized by ATR-FTIR spectroscopy as shown in Fig. S1 showing characteristic peaks at 3328 cm^{-1} , 2897 cm^{-1} , 1642 cm^{-1} , and 1017 cm^{-1} indicating the presence of OH stretching, C-H stretching, C-H bending, and C-O-C stretching vibrations, respectively. The morphology of the GG hydrogel (Fig. S2) indicates spaces/pores between scaly and fractured materials. The thermogravimetric analysis results as shown in Fig. S3 reveal initial moisture loss in the region of 25 – 250 °C followed in the zone 250 – 300 °C by guar gum backbone degradation. All these results fully match a previous report⁷. As observed previously, the GG/Cur-AgNPs composite exhibits fast self-healing and excellent elastomeric behavior⁷.

Here we performed additional rheological characterization showing that the hydrogel composite (GG/Cur-AgNPs) is suitable for injection through a syringe, a favourable property for biomedical applications. We performed shear rate sweep measurements at different shear rates in the range of 1 – 100 s^{-1} , confirming shear-thinning behavior in the composite GG/Cur-AgNPs hydrogel. As shown in Fig. 2d, the hydrogel viscosity decreases as a function of the shear rate, indicating that the hydrogel exhibits fluid-like flow under shear force, a critical property for easy injection through a syringe³⁶. The hydrogel recovers a gel state when the shear force disappears.

As the release of silver ions from AgNPs has been associated with toxicity, the release of silver ions (Ag^+) from Cur-AgNPs and from GG-Cur-AgNPs was determined using inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES) (Fig. 2e). The results show that silver ions are released very gradually from Cur-AgNPs, taking many hours and in proportion to the concentration of Cur-AgNPs present. Silver ion release is however much slower from the GG/Cur-AgNPs hydrogel composites, suggesting the latter are safer to use on wounds.

The effect of Cur-AgNPs on cell cytotoxicity, cell proliferation and collagen production in human dermal fibroblast cells.

Cell viability investigations were undertaken to ensure that the Cur-AgNPs composited in our hydrogels are not themselves cytotoxic. An MTT assay was undertaken using human dermal fibroblast cells in the presence of Cur-AgNPs at different concentrations in the range of 0.016 – 1.600 nM and after incubation for 24 h. As demonstrated in Fig. 3a, Cur-AgNPs have low cytotoxicity with more than 80% of the cells remaining viable after the addition of 0.200 nM Cur-AgNPs. Below 0.100 nM Cur-AgNPs, 100% relative viability was maintained. Thus, Cur-AgNPs can be considered non-cytotoxic and biocompatible at or below a concentration of 0.200 nM.

In addition, we observed enhanced proliferation and collagen production inside the fibroblasts in the presence of Cur-AgNPs. The cells were treated for 7 and 14 days with 0.03 nM and 0.06 nM of Cur-AgNPs, respectively. Ascorbic acid (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) was used as a positive control as it is a known stimulatory agent of both dermal fibroblast proliferation and collagen production. Cell viabilities were measured using a CellTiter-Glo Luminescent cell viability assay kit. As shown in Fig. 3b, the number of cells present increased in Cur-AgNPs-treated samples in a dose- and time-dependent manner. After 7 days, cell proliferation in the sample treated with 0.06 nM Cur-AgNPs even exceeded that of the ascorbic acid positive control. After 14 days, cell proliferation increased by 31% and 45% for 0.03 nM and 0.06 nM Cur-AgNPs relative to negative controls (absence of Cur-AgNPs), respectively.

Total collagen in the samples was visualized using Picrosirius red staining as shown in Fig. 3c–d. The cells incubated with 0.03 nM of Cur-AgNPs showed an increase in collagen of 20% after 7 days compared to the negative control (no Cur-AgNPs), though for 0.06 nM Cur-AgNPs a reduction of 20% was observed. Nevertheless, after 14 days, collagen production increased by 50% and 40% in the presence of 0.03 nM and 0.06 nM of Cur-AgNPs respectively relative to the negative controls.

In vitro experiments have shown that both the size and surface coating of AgNPs effects their activity in cultures of animal and human cells^{37–39}. Here, human dermal fibroblast cells exposed to Cur-AgNPs increased proliferation and collagen production compared to untreated controls. The Cur-AgNPs also showed low cytotoxicity. These results stand alongside previous work suggesting that AgNPs mediate stimulation of transcriptional changes towards improved skin appearance^{40,41}. This reflects the function of fibroblasts in mediating the secretion of extracellular matrix facilitating collagen production which corresponds to the re-epithelialization phase of wound healing⁴². Wong et al. however observed that citrate-coated silver nanoparticles of 10 nm mean diameter reduced collagen production levels in fibroblast cells in mice⁴³. Further work is required to determine to what extent the curcumin surface coating and the size of the AgNPs employed herein contribute to the favourable in vitro properties of Cur-AgNPs.

The effect of Cur-AgNPs on in vitro wound healing.

To examine whether Cur-AgNPs have a stimulatory effect on cell migration, a scratch wound-healing assay was performed. Human dermal fibroblast cells were treated with 0.03 and 0.06 nM of Cur-AgNPs, and recombinant human basic fibroblast growth factor (rhFGF-b) at a concentration of 100 ng/mL was used as a positive control. As shown in Fig. 4a,b, Cur-AgNPs significantly decreased the wound gap in a time-dependent manner. Treatment with 0.03 nM of Cur-AgNPs gave the best performance, showing 100% and 50% increased cell migration at 7 and 14 days relative to the negative control, and even 15–20% enhancement compared to the rhFGF-b positive control. The better performance for the lower concentration of Cur-AgNPs may be because wound healing experiments are necessarily performed with injured cells exposed to a free gap, resulting in a lack of intercellular junctions and communication. Without these key factors, most adhesive cells would be considerably weakened and unhealthy⁴⁴. Therefore, treatment

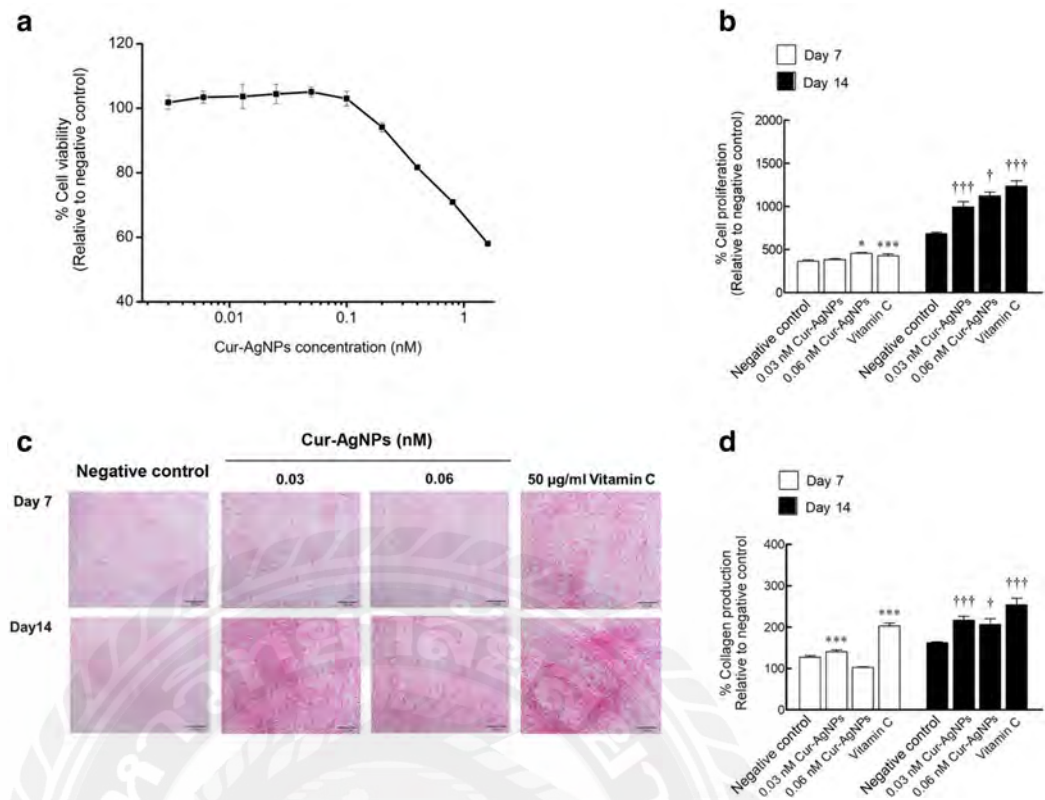


Figure 3. Effects of Cur-AgNPs on cell viability, cell proliferation, and collagen production. **(a)** Human dermal fibroblast cells were treated with 0.0016–1.60 nM of Cur-AgNPs for 24 h in cytotoxicity testing and in the absence of Cur-AgNPs as a control. **(b)** Cell proliferation; cells were treated with 0.03 and 0.06 nM of Cur-AgNP and 50 µg/mL of ascorbic acid (Vitamin C) for 7 and 14 days in the measurement of cell production. **(c, d)** White light transmission microscopy images of human dermal fibroblast cells treated with 0.03 and 0.06 nM of Cur-AgNPs and 50 µg/mL of ascorbic acid (Vitamin C) for 7 and 14 days. Collagens are stained red by Picrosirius dye and photographed at 200× magnification. **(e)** Analyzed percentage of collagen production relative to controls. Data were expressed as mean ± SD ($n=3$). * $P<0.05$ and *** $P<0.001$ compared to control within 7 days post-treatment. † $P<0.005$ and ††† $P<0.001$ compared to control within 14 days post-treatment.

with higher concentrations of Cur-AgNPs (0.06 nM) might exacerbate toxicity to these injured cells compared to lower doses (0.03 nM). Thus Cur-AgNPs could promote wound healing by facilitating the proliferation and migration of fibroblasts to initiate granulation tissue formation/remodeling within the wound⁴⁵.

Enhanced wound healing and anti-bacterial effects of composite GG/Cur-AgNPs hydrogel on rat incisional wounds.

To determine the effects of GG/Cur-AgNPs hydrogel composites on in vivo incisional wounds, GG/Cur-AgNPs hydrogels were applied to surgical wound incisions on rats and compared with commercial antibacterial gels, guar gum (GG), and Cur-AgNPs as controls. The surgical wounds treated with the GG/Cur-AgNPs hydrogel showed increased wound contraction compared to commercial antibacterial gel controls (Fig. 5a,b). The percentage wound area contraction in rats treated with guar gum and Cur-AgNPs alone are shown in Fig. S4. At 12 days post-incision, the percentage wound contraction was highest for the GG/Cur-AgNPs hydrogel (73% versus 51% for the commercial antibacterial gel, 27% for the Cur-AgNPs alone, and 19% for the guar gum hydrogel alone). The GG/Cur-AgNPs thus induced >40% faster wound contraction than the commercial antibacterial gel.

The antibacterial effect of the hydrogel composite at the wound site was also compared to that of commercial antibacterial gel (Fig. 5c), and guar gum hydrogel and Cur-AgNPs alone (Fig. S4), via a colony count (CFU) at the wound. The GG/Cur-AgNPs hydrogel showed the lowest bacterial count on day 12 post-incision (20 cfu versus 51 cfu for the commercial antibacterial gel, 51 cfu for the guar gum hydrogel alone, and 25 cfu for the Cur-AgNPs alone). This represents a 60% higher antibacterial activity compared to commercial antibacterial gels.

Histopathology of rat skin wound healing with GG/Cur-AgNPs hydrogel treatment. In the initial inflammatory stage of healing, typically for 3–5 days post-injury, active neutrophil infiltration is followed by monocyte recruitment into the wound, the latter differentiating into macrophages which drive transition to the proliferative phase^{46,47}. The latter is characterized by granulation tissue proliferation, driven mainly by fibroblasts and angiogenesis. The populations of various cells and structures at the wound thus reveals information on healing progression, with monocytes (mononuclear leukocytes) appearing round with kidney-shaped nuclei,

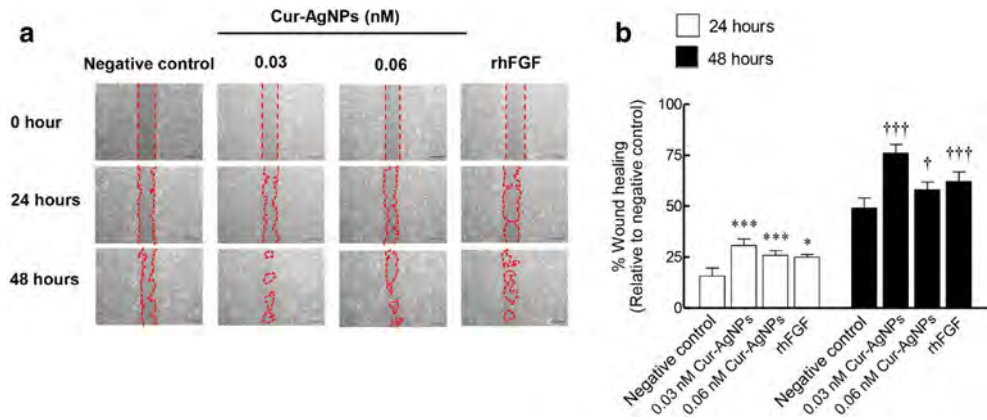


Figure 4. Effects of Cur-AgNPs on wound healing induction. (a) Human dermal fibroblast cells were treated with 0.03 and 0.06 nM of Cur-AgNP, or 100 ng/mL of rhFGF-b as a positive control, and a scratch wound assay performed at 0, 24 and 48 h after scratch wounding (compared to no treatment as a negative control). (b) Analyzed percentage wound gap width after 48 h relative to the original scratch width. Data were expressed as mean \pm SEM ($n = 3$). * $P < 0.05$ and *** $P < 0.001$ compared to control within 24 h post-treatment. † $P < 0.005$ and ††† $P < 0.001$ compared to negative control within 48 h post-treatment.

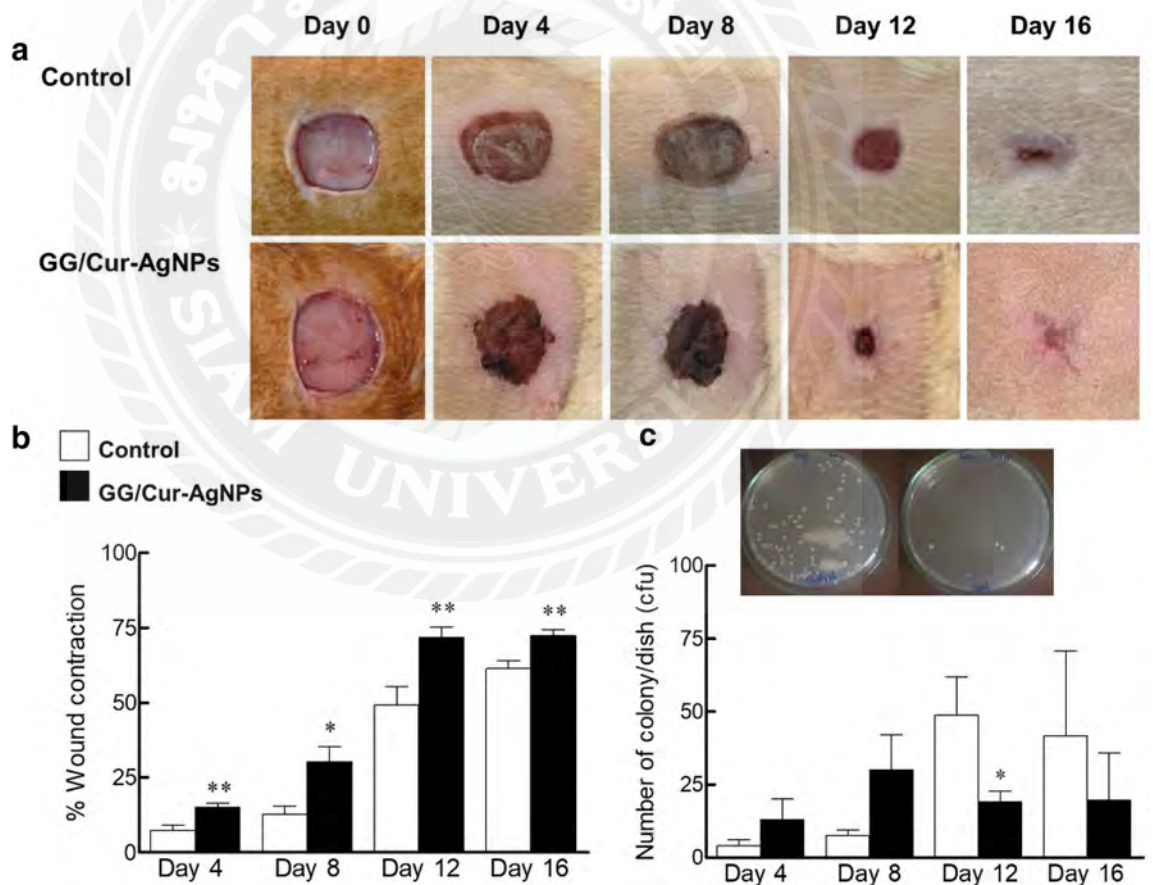


Figure 5. Effects of GG/Cur-AgNPs on wound healing and bacterial contamination in rats. (a) Time-dependent evolution of rat skin wound closure observed for treatment with commercial antibacterial gels (control) and with the GG/Cur-AgNPs hydrogel composite. (b) Percentage wound area contraction calculated on days 4, 8, 12, and 16 post-wound incision for treatment with commercial antibacterial gel and GG/Cur-AgNPs hydrogel composite. c, Comparison of bacterial colony count (CFU) at the wound site for treatment with commercial antibacterial gel and the GG/Cur-AgNPs hydrogel composite. Data were expressed as mean \pm SEM ($n = 3-4$ /time point). * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ compared to control on day of experiments.

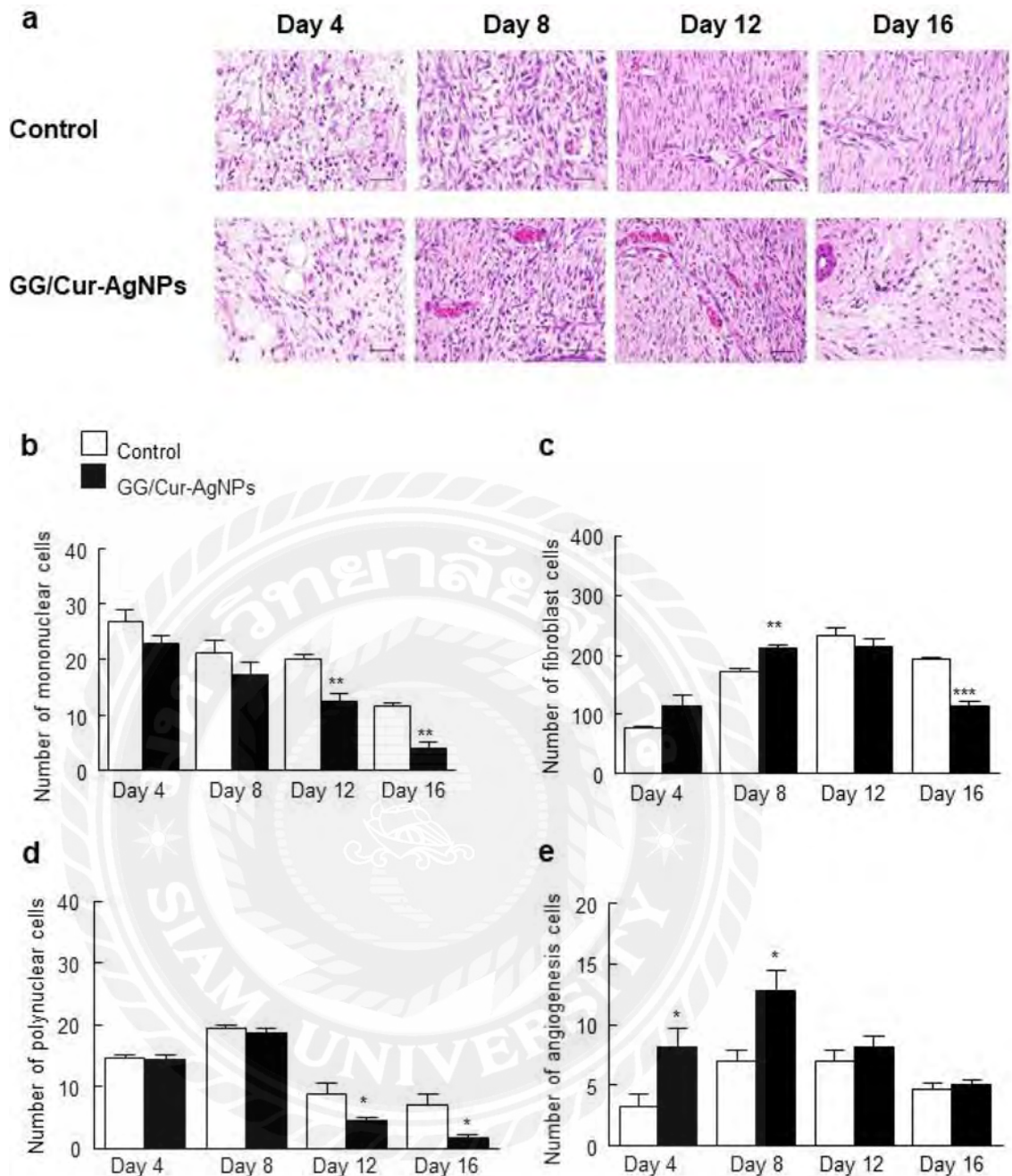


Figure 6. Histopathology of rat skin on day 4, 8, 12 and 16 of the wound incisions stained with hematoxylin & eosin staining. **(a)** Micrographs of sections of wound incision rat skin under treatment with commercial antibacterial gels (control) and GG/Cur-AgNPs. Hematoxylin (deep blue-purple) stains nucleic acids/nuclei, eosin (pink) stains proteins non-specifically indicating the cytoplasm and extracellular matrix. **(b)** Number of mononuclear leukocytes. **(c)** polymorphonuclear leukocytes. **(d)** fibroblasts. **(e)** capillaries were counted in 10 high-power field (HPF) (400 \times magnification). Data were expressed as mean \pm SEM ($n = 3/\text{time point}$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ compared to the control on day of experiments. Scale bar = 40 μm .

neutrophils (polymorphonuclear leukocytes) having lobed nuclei and cytoplasmic granules, fibroblasts having spindle shapes, and blood vessel formation indicated by capillary structures.

Micrographs from rat skin wounds show clear differences in cell populations for treatment with GG/Cur-AgNPs hydrogel and a commercial antibacterial gel control (Fig. 6a). Monocytes and polynuclear leukocytes are strongly reduced in the wound area at 12 and 16 days post-treatment with GG/Cur-AgNPs compared to a commercial antibacterial gel, indicating the inflammatory phase finished faster (Fig. 6b,d). Meanwhile fibroblasts and capillaries are greatly enhanced on day 4 and day 8 relative to the commercial gel, indicating the proliferative phase also commenced faster (Fig. 6c,e). Re-epithelialization is necessary for complete wound healing, creating epithelial cell migration⁴⁸. It was calculated using the following formula⁴⁹: length of newly formed epidermis

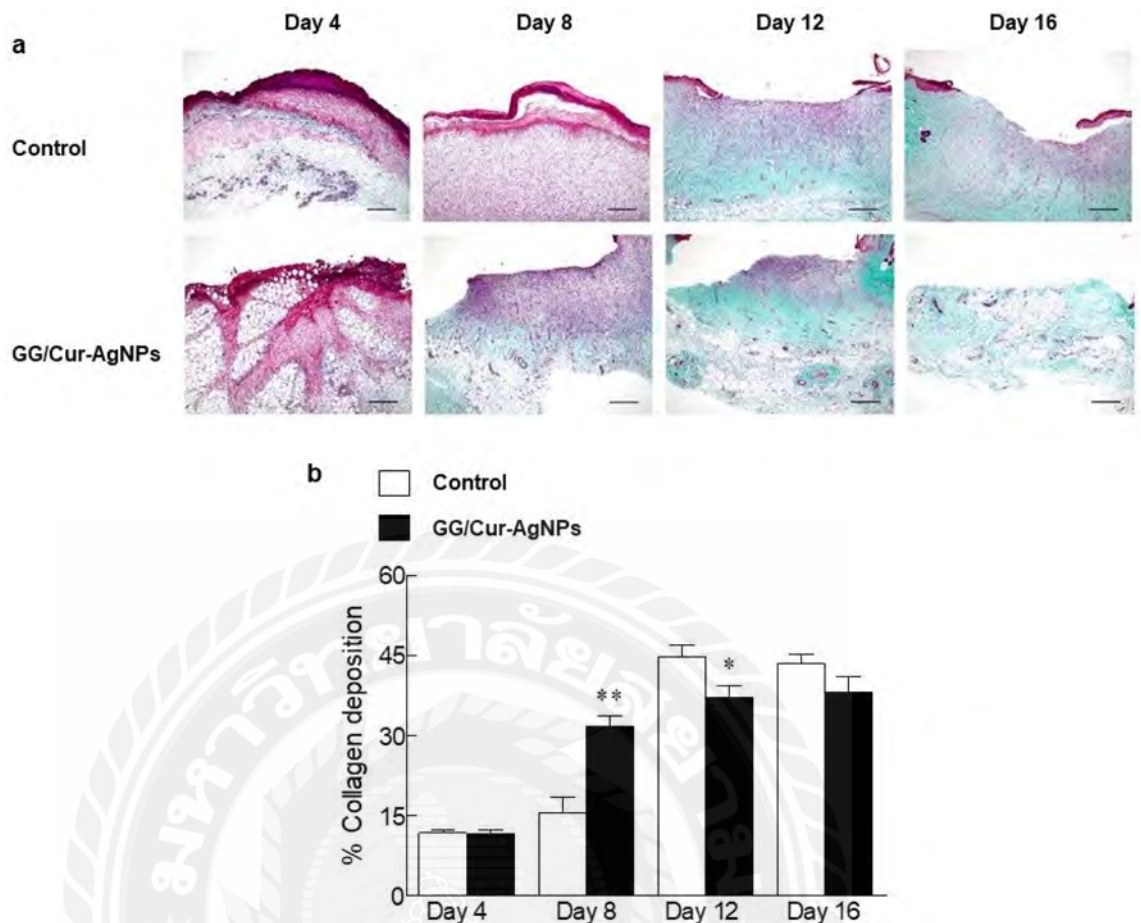


Figure 7. Histopathology of rat skin wounds on day 4, 8, 12 and 16 of the wound incisions stained with Masson's trichrome. **(a)** Micrographs of sections of wound incision rat skin treated with commercial antibacterial gel (top) and with GG/Cur-AgNPs (bottom). Collagen is indicated by the blue-green colour. **(b)** The percentage of collagen deposition (area of blue-green colour) was measured in 10 high-power field (HPF) (400 \times magnification). Data were expressed as mean \pm SEM ($n = 3$ /time point). * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ compared to the control on the day of experiments. Scale bar = 40 μ m.

layer/length of wound between wound edges $\times 100$. Although complete wound covering did not occur until day 16, the percentage re-epithelialization significantly increased in the GG/Cur-AgNPs group on day 8, 12, and 16 (Figs. S5a and S5b). Furthermore, GG/Cur-AgNPs increased collagen deposition, important in all stages of wound healing, at day 4 and 8 (Fig. 7a,b) compared to the commercial antibacterial gel control. These results suggest that the enhanced wound-healing effects of GG/Cur-AgNPs hydrogels involves fast transition to, and promotion of, the proliferative phase via formation of new blood vessels and neovascularisation⁵⁰.

Changes in target genes promoting wound healing in rat incisional skin wounds treated by GG/Cur-AgNPs hydrogels.

Healing response involves several pathways at the molecular level that combine to modulate inflammation and promote wound closure. To determine the effects of GG/Cur-AgNPs hydrogels on the expression of target genes promoting wound healing in rat incisional skin wounds, the mRNA expressions of interleukin 6 (IL-6), epidermal growth factor (EGF), collagen-1, collagen-3, fibroblast growth factor (FGF2) and transforming growth factor β 1 (TGF- β 1) were investigated by RT-qPCR, relative to a commercial antibacterial gels (Fig. 8)⁴⁴.

The results showed a decrease in the expression of IL-6 in GG/Cur-AgNPs hydrogel treatment after 4, 8 and 12 days relative to the control, but no difference in expression was observed after 16 days (Fig. 8a). The decrease of IL-6 expression may be associated with the modulation of keratinocyte differentiation and reduction of the inflammation rate⁵¹.

The expressions of EGF, collagen-1, and collagen-3 were increased for GG/Cur-AgNPs hydrogel treatment after day 8 (Fig. 8b–d) relative to the control. In addition, GG/Cur-AgNPs hydrogels upregulated the expression of collagen-3 gene 12 days after treatments (Fig. 8d). Furthermore, the relative expression of FGF2 was increased for GG/Cur-AgNPs hydrogel treatment after 4, 8 and 12 days (Fig. 8e) relative to the control. The expression of TGF- β 1 was increased after 8 days in GG/Cur-AgNPs hydrogel-treated rats compared with controls, but after 14 days, GG/Cur-AgNPs hydrogel treatment showed a decrease in TGF- β 1 expression (Fig. 8f). The observed upregulation at earlier times post-incision of these important genes involved in the inflammatory reaction,

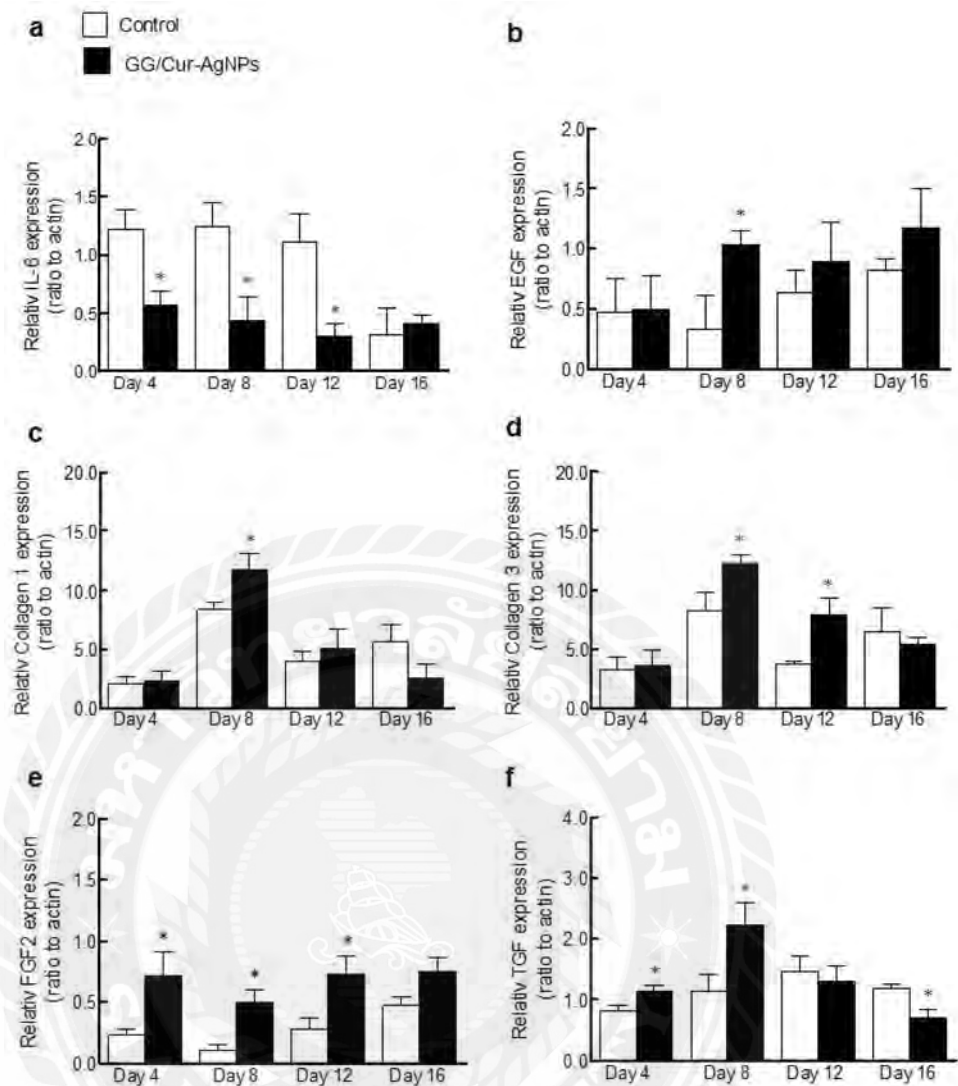


Figure 8. Changes of wound related genes in the healed wound skin incision with GG/Cur-AgNPs hydrogel treatment. (a) Relative gene expression levels of IL-6. (b) EGF. (c) collagen 1. (d) collagen 3. (e) FGF2. (f) TGF- β 1 were measured by RT-qPCR analysis. Data were expressed as mean \pm SEM ($n = 3$ /time point). * $P < 0.05$ compared to a commercial antibacterial gel control on the day of experiments.

cell growth, and collagen formation, further confirms the positive effect of GG/Cur-AgNPs on wound healing. Specifically, the expression of TGF- β 1 has a crucial role in initiating the inflammatory response in early stages of wound healing, protecting the affected area from bacterial infection. Later, secretion of EGF and FGF2 growth factors help to stimulate the proliferative phase by inducing epithelial cell migration and proliferation within the wound area. Finally, the newly synthesized collagen, mediated by collagen-1 and collagen-3 expression, promotes tissue remodeling and subsequent scar formation following wound closure⁵². These results confirm that GG/Cur-AgNPs promotes wound healing by accelerating the normal healing pathways.

Outlook. We have shown that the GG/Cur-AgNPs composite is a shear-thinning, thus injectable, hydrogel that when applied to in vivo rat skin wounds exhibits superior wound healing and antibacterial action compared to commercial gels (by > 40% and 60%, respectively). The enhanced performance is due to accelerated transition from the inflammatory to proliferative phase of healing, with stimulation of the latter. This compares favorably with related studies. For example, Tavakoli *et al.*⁵³ describes a nanocomposite hydrogel based on polydopamine-modified zinc oxide nanoparticles (ZnO/PD) in Kappa carrageenan KaMA matrix with the addition of L-glutamic acid for treating diabetic wounds. This nanocomposite hydrogel showed a 10% enhancement of wound closure compared to controls. Meanwhile, Jiang *et al.*⁵⁴ showed that a self-healing hydrogel based on chitosan and konjac glucomannan (KGM) and incorporating AgNPs to improve skin tissue healing by 20% compared to controls.

We note firstly that all these advantages are offered by a hydrogel composite prepared by a facile method and with cheap, and majority natural, starting products. The shortened inflammation stage observed may be

significant as prolonged inflammation can cause incomplete healing and induce scar formation. Furthermore, wound dressing investigations focused on traditional antibiotics are reaching a critical juncture, with the USA Centers for Disease Control predicting increasing deaths from antibiotic-resistant bacteria⁵⁵. Wound dressing materials that do not depend on traditional antibiotics will thus assume increasing importance. Hydrogels composited with metallic nanoparticles may be a suitable alternative material for biomedical research and for incorporation into wound care treatment products in the marketplace.

Materials and methods

Materials. Silver nitrate (AgNO_3 , 99.9%) was purchased from POCH™, Poland. Curcumin synthetic grade ($\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_6$, pure > 97%) was purchased from TCI, Japan. Dimethylsulfoxide (DMSO, $\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}$) was purchased from Fisher Scientific, UK. Potassium carbonate (K_2CO_3 , $\geq 99.0\%$) was purchased from Merck, Germany. Guar gum was purchased from Chemipan Corporation Co., Ltd, Thailand. Sodium Hydroxide (NaOH, 99%) was purchased from RCL Labscan. Di-sodium tetraborate decahydrate (Borax, $\text{Na}_2[\text{B}_4\text{O}_5(\text{OH})_4]8\text{H}_2\text{O}$, 99.5%) was purchased from QRĒC, New Zealand. Deionized water (DI) with specific resistivity of 18.2 M Ω cm was obtained from a RiOs™ Type I Simplicity 185 (Millipore water purification system). Direct red 80 ($\text{C}_{45}\text{H}_{26}\text{N}_{10}\text{Na}_6\text{O}_{21}\text{S}_6$), L-ascorbic acid ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$, 99%), picric acid ($\text{C}_6\text{H}_3\text{N}_3\text{O}_7$, $\geq 98\%$), paraformaldehyde ($\text{HO}(\text{CH}_2\text{O})_n\text{H}$), and agar powder were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Ethanol absolute ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$, 99.5%), hydrochloric acid (HCl, 37%), sodium hydroxide (NaOH, 99.0%) were purchased from Carlo Erba Reagents, Val de Reuil, France. 3-4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide ($\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{BrN}_5\text{S}$, 98%) was purchased from Merck Millipore Calbiochem (Massachusetts, USA). Recombinant human FGF-b (rhFGF-b) was purchased from American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, Virginia, USA). Dulbecco's modified Eagle's media (DMEM), fetal bovine serum (FBS), penicillin and streptomycin (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) were purchased from Gibco, USA. CellTiter-Glo Luminescent cell viability assay kit and lysis buffer reagent were purchased from Promega Corporation, Wisconsin, USA. Micro-dishes were obtained from ibidi GmbH, Gräfelfing, Germany. Regarding animal studies, antibacterial gels as a control were purchased from Union Drug Laboratories Ltd, Bangkok, Thailand. Hematoxylin and eosin Trichrome reagents were purchased from Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA. For the gene expression studies, DNase I and SuperScript II kit were purchased Thermo Fisher Scientific Inc, USA. The primers were designed from Geneplus Co Ltd, Huai Khwang, Bangkok.

Preparation of guar gum-curcumin stabilized silver nanoparticle hydrogel (GG/Cur-AgNPs).

Silver nanoparticles stabilized by curcumin (Cur-AgNPs) were synthesized following our previous publication⁷. Briefly, a solution of 20 mM curcumin in DMSO (750 μL) was added to 68 mL of DI water in a 100 mL round bottom flask. The solution pH was then adjusted to 10 by 0.07 M K_2CO_3 and the solution heated up to 95 °C. Next, 7.5 mL of 10 mM AgNO_3 was quickly added to the solution mixture. The mixture was stirred vigorously at 100 °C for 1 h and filtered by micro filter to obtain the Cur-AgNPs. The concentration of Cur-AgNPs was estimated to be 3.14 nM based on an extinction coefficient of $41.8 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ at 400.8 nm for 20 nm diameter citrate-silver nanoparticles⁵⁶. The GG/Cur-AgNPs hydrogel was prepared by a modification of our previous publication⁷. Briefly, 0.1 g of guar gum was dissolved in 20 mL of the Cur-AgNPs solution. Then, 0.1 M NaOH (200 μL) and 4 wt% borax (500 μL) were added to the solution. The mixture was then stirred until gelation occurred to obtain yellow hydrogels designated GG/Cur-AgNPs.

Transmission electron microscopy (TEM) analysis. TEM observations were made using an Atomic Resolution Analytical Electron Microscope (JEM-ARM200F; JEOL) at an acceleration voltage of 200 kV. Cur-AgNPs were freshly prepared on a TEM grid (Ultra-Thin PELCO Grids for TEM; Ted Pella).

Dynamic light scattering and zeta potential measurement. Hydrodynamic diameters and zeta potential of Cur-AgNPs were investigated by dynamic light scattering (DLS) and electrophoretic light scattering, using a Malvern Zetasizer Nano series (Nano ZS, UK). The samples measurements were performed in triplicate and the data represented as mean \pm standard deviation (SD).

Rheological study of shear thinning hydrogel. The shear thinning behavior of GG/Cur-AgNPs hydrogel was examined using a parallel-plate (smooth stainless steel, 25 mm diameter) rheometer (Physica MCR500, Germany). The viscosity and shear rate were investigated under rotation mode at 25 °C with shear rate from 1 to 100 s^{-1} and frequency was kept constant at 1 $\text{rad} \cdot \text{s}^{-1}$.

Silver ion (Ag^+) release investigation. The concentration of silver ions (Ag^+) released from Cur-AgNPs and the hydrogel composite was monitored using inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES). Solution concentrations of Cur-AgNPs of 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ were prepared. The hydrogels were prepared as discussed above with concentrations of Cur-AgNPs of 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively. Then, the two hydrogels were immersed in two test tubes in the presence of 10 mL of weakly acidic solution (HNO_3 , pH = 5) at room temperature. Two different concentrations of Cur-AgNPs solutions (1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) were also tested. After 2 h, 4 h, 8 h, 12 h, 16 h, 1 mL solution from test tube was placed into a small vial. Then, 1 mL of weakly acidic solution was added. Finally, all samples were monitored by ICP-OES for their silver ion concentration.

Cell culture preparation. Human dermal fibroblast cells were purchased from ATCC (Manassas, VA, USA). Cells were cultivated in Dulbecco's modified Eagle's media (DMEM) (Gibco, UK) supplemented with

10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), penicillin (100 U/mL) and streptomycin (100 µg/mL) (Gibco, USA). Cells were incubated at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂.

Cell viability assay. The cytotoxicity was measured by MTT assay, which determined the mitochondrial-dependent reduction of MTT [3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide Merck Millipore Calbiochem (Massachusetts, USA) to formazan. Cells were seeded at a density of 2×10^5 cells/mL in 96 well-plates and incubated for 24 h. After incubation, cells were treated with various concentrations of sample for 24 h. The medium was replaced with 1 mg/mL of MTT and further incubated for 4 h at 37 °C. Then the MTT was removed and the formazan produced was dissolved with DMSO. The absorbance was measured at 570 nm using a microplate reader (Synergy H1, BioTeK).

Cell proliferation and collagen content assay. Cell proliferation was measured by CellTiter-Glo Luminescent cell viability assay kit (Promega, USA), which evaluated the cellular ATP levels. Cells were seeded at a density of 1×10^5 cells/mL in 48 well-plates and incubated for 24 h. After incubation, cells were treated with samples for 7 and 14 days. Then, the medium was removed and cells were lysed with 1X lysis buffer reagent (Promega, USA). After 10 min incubation, cell lysates were further incubated with CellTiter-Glo reagent for 10 min. The luminescence was measured using a microplate luminometer (SpectraMax L, Molecular Devices, California, USA). Collagen content was determined by Picrosirius red staining, which stained collagen type I and type III. Cells were seeded at density of 1×10^5 cells/mL in 48 well-plates and cultivated for 24 h. After incubation, cells were treated with samples for 7 and 14 days. After treatment, cells were washed with PBS and fixed with 4% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) for 10 min. Cells were then washed twice with PBS and stained with 0.1% direct red 80 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) in saturated picric acid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) for 10 min. After staining, 0.01 N HCl in 70% ethanol was added into each well for washing excess dye. Stained collagen was visualized under an inverted microscope (CKX41, Olympus, Japan) and dissolved with 0.5 N NaOH. The amount of collagen was quantified by measuring the absorbance at 540 nm using a microplate reader.

In vitro wound healing assay. Wound healing assays were performed to observe directional cell migration. Cell suspensions of 3×10^5 cells/mL were added to each chamber of a culture-insert 4 well in µ-dish 35 mm (ibidi GmbH, Gräfelfing, Germany) and cultivated for 24 h. After incubation, the culture-insert was removed, and cells were washed with PBS. For each treatment type the scratch was applied and the wound area photographed at 0, 24 and 48 h to monitor cell migration. The filling of the gap in the scratch area, i.e. wound closure, was examined by measuring changes in wound area using imageJ. The percentage gap-filling can be calculated by the following Eq. (1).

$$\% \text{ gap filled} = \frac{A_{t=0h} - A_{t=nh}}{A_{t=0h}} \times 100 \quad (1)$$

$A_{t=0h}$ is the wound area measured immediately after wounding; $A_{t=nh}$ is the wound area measured after wounding at each time point.

Animals and surgery of skin incision. Sixteen male Wistar rats (8-week-old and 180–200 g weight) were purchased from Nomura Siam International Co., Ltd., Bangkok, Thailand. Rats were housed in groups (2 rats/cage) under controlled condition (12 h light/dark cycle, 21 °C and 50% relative humidity). Laboratory standard chow food and distilled water were provided ad libitum for the animal. This study was approved in according to ethics committee guidelines and all protocols of animal experiments by the Institution's Animal Care Committee, Thammasat University, Thailand (Protocol number 021/2562). Rats were inhaled isoflurane anesthesia and two parallel 1 cm full thickness skin incisions were made at the midline of vertebral spine⁵⁷. All rats were regularly observed for infection. If there were signs of infection, rats were separated and excluded from the study. Wounds were cleaned daily and then GG/Cur-AgNPs hydrogels or standard antibacterial gels were applied. The skin wounds were then photographed on days 4, 8, 12, and 16 post-wounding surgery. According to Murthy et al. work⁵⁸, percentage of wound contraction was calculated using Eq. (2):

$$\% \text{ wound contraction} = \frac{\text{Healed wound area}}{\text{Total wound area}} \times 100 \quad (2)$$

$$\text{Healed wound area} = \text{original wound area} - \text{present wound area}$$

Histopathology. The cross-sectional full-thickness skins and deep granulation tissues were collected on days 4, 8, 12, 16 post-wounding incision for histopathological studies. Specimens were fixed in 4% buffered paraformaldehyde, dehydrated through a graded series of ethanol, cleared with xylene solutions and blocked with paraffin, respectively. Thereafter, the paraffin blocks were sectioned into 5 µm sections by a Leica microtome (Microsystems, Wetzlar, Germany) and stained with hematoxylin and eosin or Masson's Trichrome (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Interpretation of histological slides was performed as a blind analysis by two pathobiologists. Three parallel sections were taken from each specimen and the parameters of cellular infiltration including the number of mononuclear leukocytes, polymorphonuclear leukocytes and fibroblasts were measured. Vascularization and collagen deposition were also qualitatively evaluated. Morphological evaluations

| Gene | Primer sequence | Product (bp) | Melting temperature (°C) | Access number |
|------------------------------------|--|--------------|--------------------------|---------------|
| β -actin (<i>Actb</i>) | F: 5'-CCCTGGCTCCTAGCACCAT-3' R: 5'-GATAGAGCCACCAATCCACACA-3' | 80 | 60 | NM031144 |
| Collagen 1 (<i>Col1a1</i>) | F: 5'-CATGTTTCAGCTTTGTGGACCT-3' R: 5'-GCAGCTGACTTCAGGGATGT-3' | 94 | 60 | NM053304 |
| Collagen 3 (<i>Col3a1</i>) | F: 5'-GGGATCCAATGAGGGAGAAT-3' R: 5'-CCTTGCGTGTGATATT-3' | 128 | 60 | NM032085 |
| EGF (<i>Egf</i>) | F: 5'-CTCAGGCCTCTGACTCCGAA-3' R: 5'-ATGCCGACGAGTCTGAGTTG-3' | 93 | 60 | NM012842 |
| FGF-2 (<i>Fgf2</i>) | F: 5'-GATCCCAAGCGGCTCTACTG-3' R: 5'-TAGTTTACGCTGTGGGTCGC-3' | 105 | 60 | NM019305 |
| TGF- β 1 (<i>Tgfb1</i>) | F: 5'-GGGCTACCATGCCAACTTCTG-3' R: 5'-GAGGGCAAGGACCTTGCTGTA-3' | 82 | 60 | NM021578 |
| IL-6 (<i>Il6</i>) | F: 5'AACCTGAACCTTCCAAAGATGG-3' R: 5'-TCTGGCTTGTTCCTCACTACT-3' | 168 | 55 | NM012589 |

Table 1. Primers used in qPCR. *EGF* epidermal growth factor; *TGF- β 1* transforming growth factor beta 1; *IL-6* Interleukin-6; *F* forward; *R* reverse.

were photographed by a Nikon DXM 1200 digital camera (Tokyo, Japan) followed by scoring of the percentage of green colored area of the granulation tissue using ImageJ analysis software.

Microbiological examinations. Swabs were taken from the incisional wound during each dressing change on days 4, 8, 12 and 16 post-wounding surgery. The collected swabs were diluted by tenfold serial dilutions of normal saline for quantitative analysis. Six hundred microliters of each sample dilution were spread onto agar plates (1.5% agar powder, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and incubated at 37 °C for 24 h. Thereafter, the bacterial colony cell numbers were counted.

Quantitative real-time PCR (qPCR). The RNA from skin from the healing wound area was collected and extracted using TRIzol reagent (Invitrogen Life Technologies, USA) according to the manufacturer's protocol. The RNA was treated with DNase I (Thermo Fisher Scientific Inc, USA) to eliminate contamination with genomic DNA. The cDNA synthesis was made by reverse transcription using the High Capacity cDNA Reverse Transcriptase Kit (Applied Biosystems, USA) following manufacturer's instructions and analyzed the expression of wound healing related genes (i.e., *Col1a1*, *Col3a1*, *Fgf2*, *Tgfb1*, *Egf*, and *Il6*) using SYBR Green-based qPCR. The primers have been validated for specificity and efficiency by conventional qPCR, as previously described⁴⁴. The details of the primers used in this study are presented in Table 1. The detail of procedures used for qPCR amplification and analysis were described in our previous reports⁵⁹⁻⁶¹. Briefly, the diluted cDNA and primers were added in the SsoAdvanced™ Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) for PCR amplification in total 20 μ l reaction volume. PCR reactions were performed in duplicate including sample and nontemplate control reactions and were run in the CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories). The thermocycling process consisted of 40 cycles followed by an additional step for dissociation curve generation. Beta-actin (*Actb*) was included as the reference gene for normalization of the target genes and for compensation of inter-PCR variation between each qPCR experiment. In each independent experiment, target and reference gene cDNA were derived from similar extracted RNA and run simultaneously in the qPCR analysis. The relative mRNA expression was achieved with the CFX Manager™ software (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) by performing the comparative C_t method. The expression level of each studied gene is presented as fold change by relative compared to the level in untreated control group.

Statistical analysis. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA). The results were expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM). The comparisons between groups were conducted using student's-t test and/or between and within groups using one-analysis of variance (ANOVA) with post-hoc Tukey's Honest test. All statistical tests were set at a significance level α of 0.05 ($P < 0.05$).

Ethics statement. For the animal studies, all experimental protocols were approved by the Institution's Animal Care Committee, Thammasat University, Thailand (Protocol number 021/2562). All methods were carried out in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the National Research Council. This study was carried out in accordance with ARRIVE guidelines (<https://arriveguidelines.org>).

Received: 13 August 2021; Accepted: 26 October 2021
Published online: 08 November 2021

References

- Aeridou, E., Diaz, D., Alemán, C. & Pérez-Madrigal, M. M. Advanced functional hydrogel biomaterials based on dynamic B-O bonds and polysaccharide building blocks. *Biomacromol* **21**, 3984–3996 (2020).
- Mantha, S. *et al.* Smart hydrogels in tissue engineering and regenerative medicine. *Materials*. **12**, 3323 (2019).
- Gupta, A. *et al.* Synthesis of silver nanoparticles using curcumin-cyclodextrins loaded into bacterial cellulose-based hydrogels for wound dressing applications. *Biomacromol* **21**, 1802–1811 (2020).
- Banerjee, H., Suhail, M. & Ren, H. Hydrogel actuators and sensors for biomedical soft robots: brief overview with impending challenges. *Biomimetics*. **3**, 15 (2018).
- Shiblee, M. N. I., Ahmed, K., Kawakami, M. & Furukawa, H. 4D printing of shape-memory hydrogels for soft-robotic functions. *Adv. Mater. Technol.* **4**, 1900071 (2019).
- Chen, H. *et al.* An injectable self-healing coordinative hydrogel with antibacterial and angiogenic properties for diabetic skin wound repair. *NPG Asia Mater.* **11**, 1–12 (2019).
- Talodthaisong, C. *et al.* Composite guar gum-silver nanoparticle hydrogels as self-healing, injectable, and antibacterial biomaterials. *Mater. Today Commun.* **24**, 100992 (2020).
- Tavakoli, S. & Klar, A. S. Advanced hydrogels as wound dressings. *Biomolecules* **10**, 1169 (2020).
- Lynch, C. R. *et al.* Hydrogel biomaterials for application in ocular drug delivery. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **8**, 228 (2020).
- Friess, W. Collagen – biomaterial for drug delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **45**, 113–136 (1998).
- Diekjürgen, D. & Grainger, D. W. Polysaccharide matrices used in 3D in vitro cell culture systems. *Biomaterials* **141**, 96–115 (2017).
- Zhu, Y. *et al.* A shear-thinning electrostatic hydrogel with antibacterial activity by nanoengineering of polyelectrolytes. *Biomater. Sci.* **8**, 1394–1404 (2020).
- Ambekar, R. S. & Kandasubramanian, B. Advancements in nanofibers for wound dressing: a review. *Eur. Polym. J.* **117**, 304–336 (2019).
- Krishnan, P. D. *et al.* Silver nanomaterials for wound dressing applications. *Pharmaceutics*. **12**, 821 (2020).
- Li, Z. *et al.* Superhydrophobic hemostatic nanofiber composites for fast clotting and minimal adhesion. *Nat. Commun.* **10**, 5562 (2019).
- Krafts, K. P. Tissue repair. *Organogenesis* **6**, 225–233 (2010).
- Broughton, G., Janis, J. E. & Attinger, C. E. The basic science of wound healing. *Plast. Reconstr. Surg.* **117**, 12S–34S (2006).
- Shakespeare, P. Burn wound healing and skin substitutes. *Burns* **27**, 517–522 (2001).
- Versteeg, H. H., Heemskerk, J. W. M., Levi, M. & Reitsma, P. H. New fundamentals in hemostasis. *Physiol. Rev.* **93**, 327–358 (2013).
- Diegelmann, R. F. & Evans, M. C. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Front. Biosci.* **9**, 283–289 (2004).
- Ahmad, S. U., Binti Aladdin, N.-A., Jamal, J. A., Shuid, A. N. & Mohamed, I. N. Evaluation of wound-healing and antioxidant effects of *Marantodes pumilum* (Blume) Kuntze in an excision wound model. *Molecules* **26**, 228 (2021).
- Xu, Y.-B., Chen, G.-L. & Guo, M.-Q. Antioxidant and anti-inflammatory activities of the crude extracts of *Moringa oleifera* from Kenya and their correlations with flavonoids. *Antioxidants*. **8**, 296 (2019).
- Nair, A., Chattopadhyay, D. & Saha, B. Chapter 17—Plant-derived immunomodulators. *New Look to Phytomedicine* (Academic Press, 2019).
- Sreejayan & Rao, M. N. A. Nitric oxide scavenging by curcuminoids. *J. Pharm. Pharmacol.* **49**, 105–107 (1997).
- Karmakar, I. *et al.* Scavenging activity of curcuma caesia rhizome against reactive oxygen and nitrogen species. *Orient. Pharm. Exp. Med.* **11**, 221–228 (2011).
- Borra, S. K. *et al.* Antioxidant and free radical scavenging activity of curcumin determined by using different in vitro and ex vivo models. *J. Med. Plant Res.* **7**, 2680–2690 (2013).
- Suresh, K. & Nangia, A. Curcumin: pharmaceutical solids as a platform to improve solubility and bioavailability. *CrystEngComm* **20**, 3277–3296 (2018).
- Brandt, O. *et al.* Nanoscale silver possesses broad-spectrum antimicrobial activities and exhibits fewer toxicological side effects than silver sulfadiazine. *Nanomed: Nanotechnol. Biol. Med.* **8**, 478–488 (2012).
- Ravindran, J., Arumugasamy, V. & Baskaran, A. Wound healing effect of silver nanoparticles from *Tridax procumbens* leaf extracts on *Pangasius hypophthalmus*. *Wound Med.* **27**, 100170 (2019).
- Ahsan, A. & Farooq, M. A. Therapeutic potential of green synthesized silver nanoparticles loaded PVA hydrogel patches for wound healing. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **54**, 101308 (2019).
- Hemmati, S. *et al.* Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using *Fritillaria* flower extract and their antibacterial activity against some human pathogens. *Polyhedron* **158**, 8–14 (2019).
- Alsammarraie, F. K., Wang, W., Zhou, P., Mustapha, A. & Lin, M. Green synthesis of silver nanoparticles using turmeric extracts and investigation of their antibacterial activities. *Colloids Surf. B Biointerfaces*. **171**, 398–405 (2018).
- Roy, A., Bulut, O., Some, S., Mandal, A. K. & Yilmaz, M. D. Green synthesis of silver nanoparticles: biomolecule-nanoparticle organizations targeting antimicrobial activity. *RSC Adv.* **9**, 2673–2702 (2019).
- Mukherjee, S. *et al.* Potential theranostics application of bio-synthesized silver nanoparticles (4-in-1 system). *Theranostics*. **4**, 316–335 (2014).
- Saenchoopa, A. *et al.* Colorimetric detection of Hg(II) by γ -aminobutyric acid-silver nanoparticles in water and the assessment of antibacterial activities. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* **251**, 119433 (2021).
- Bian, S. *et al.* A shear-thinning adhesive hydrogel reinforced by photo-initiated crosslinking as a fit-to-shape tissue sealant. *J. Mater. Chem. B*. **7**, 6488–6499 (2019).
- Jiang, X. *et al.* Multi-platform genotoxicity analysis of silver nanoparticles in the model cell line CHO-K1. *Toxicol. Lett.* **222**, 55–63 (2013).
- Guo, X. *et al.* Size- and coating-dependent cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles evaluated using in vitro standard assays. *Nanotoxicology* **10**, 1373–1384 (2016).
- Gliga, A. R., Di Bucchianico, S., Lindvall, J., Fadeel, B. & Karlsson, H. L. RNA-sequencing reveals long-term effects of silver nanoparticles on human lung cells. *Sci. Rep.* **8**, 6668 (2018).
- Li, C. *et al.* Silver nanoparticle/chitosan oligosaccharide/poly(vinyl alcohol) nanofibers as wound dressings: a preclinical study. *Int. J. Nanomedicine*. **8**, 4131–4145 (2013).
- Oleshko, O. *et al.* In vitro biological characterization of silver-doped anodic oxide coating on titanium. *Materials*. **13**, 4359 (2020).
- Akbik, D., Ghadiri, M., Chrzanowski, W. & Rohanizadeh, R. Curcumin as a wound healing agent. *Life Sci.* **116**, 1–7 (2014).
- Liu, X. *et al.* Silver nanoparticles mediate differential responses in keratinocytes and fibroblasts during skin wound healing. *ChemMedChem* **5**, 468–475 (2010).
- Gushiken, L. F. S. *et al.* Skin wound healing potential and mechanisms of the hydroalcoholic extract of leaves and oleoresin of *Copaifera langsdorffii* Desf. Kuntze in rats. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.*, 1–16 (2017).
- Blakytyn, R. & Jude, E. The molecular biology of chronic wounds and delayed healing in diabetes. *Diabet Med.* **23**, 594–608 (2006).
- Kim, S. Y. & Nair, M. G. Macrophages in wound healing: activation and plasticity. *Immunol. Cell Biol.* **97**, 258–267 (2019).
- Rodrigues, M., Kosaric, N., Bonham, C. A. & Gurtner, G. C. Wound healing: a cellular perspective. *Physiol. Rev.* **99**, 665–706 (2019).

48. Cheng, K.-Y. *et al.* Wound Healing in streptozotocin-induced diabetic rats using atmospheric-pressure argon plasma jet. *Sci. Rep.* **8**, 12214 (2018).
49. Rousselle, P., Braye, F. & Dayan, G. Re-epithelialization of adult skin wounds: cellular mechanisms and therapeutic strategies. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **146**, 344–365 (2019).
50. Topman, G., Lin, F.-H. & Gefen, A. The natural medications for wound healing—Curcumin, Aloe-vera and Ginger—do not induce a significant effect on the migration kinematics of cultured fibroblasts. *J. Biomech.* **46**, 170–174 (2013).
51. Johnson, B. Z., Stevenson, A. W., Prêle, C. M., Fear, M. W. & Wood, F. M. The role of IL-6 in skin fibrosis and cutaneous wound healing. *Biomedicines*. **8**, 101 (2020).
52. Barrientos, S., Stojadinovic, O., Golinko, M. S., Brem, H. & Tomic-Canic, M. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen.* **16**, 585–601 (2008).
53. Tavakoli, S. *et al.* A multifunctional nanocomposite spray dressing of Kappa-carrageenan-polydopamine modified ZnO/L-glutamic acid for diabetic wounds. *Mater. Sci. Eng. C*. **111**, 110837 (2020).
54. Jiang, Y. *et al.* Controlled release of silver ions from AgNPs using a hydrogel based on konjac glucomannan and chitosan for infected wounds. *Int. J. Biol. Macromol.* **149**, 148–157 (2020).
55. Kalantari, K. *et al.* Wound dressings functionalized with silver nanoparticles: promises and pitfalls. *Nanoscale* **12**, 2268–2291 (2020).
56. Paramelle, D. *et al.* A rapid method to estimate the concentration of citrate capped silver nanoparticles from UV-visible light spectra. *Analyst*. **139**, 4855–4861 (2014).
57. Agarwal, P. K. *et al.* Evaluation of wound healing activity of extracts of plantain banana (*Musa sapientum* var. *paradisiaca*) in rats. *Indian J. Exp. Biol.* **47**, 32–40 (2009).
58. Murthy, S. *et al.* Evaluation of in vivo wound healing activity of *Bacopa monniera* on different wound model in rats. *Biomed Res. Int.* 972028 (2013).
59. Jenwitheesuk, A. *et al.* Comparing the effects of melatonin with caloric restriction in the hippocampus of aging mice: involvement of sirtuin1 and the FOXOs pathway. *Neurochem. Res.* **43**, 153–161 (2018).
60. Wongchitrat, P. *et al.* Alterations in the expression of amyloid precursor protein cleaving enzymes mRNA in Alzheimer peripheral blood. *Curr. Alzheimer Res.* **16**, 29–38 (2019).
61. Pakpian, N., Phopin, K., Kitidee, K., Govitrapong, P. & Wongchitrat, P. Alterations in mitochondrial dynamic-related genes in the peripheral blood of Alzheimer's disease patients. *Curr. Alzheimer Res.* **17**, 616–625 (2020).

Acknowledgements

The authors thank you Miss Siriwan Sriwong, Laboratory Animal Center, Thammasat University, for excellent technical assistance. We also would like to thank you the valuable comments from the Pathology Information and learning Center, Department of Pathobiology, Faculty of Science, Mahidol University for histological analysis. This work was supported by grants from the Faculty of Medicine (001/2562 to S. Lapmanee and 002/2563 to S. Bhuhhanil), Research Promotion and Development, Siam University (003/02/2563 to S. Bhuhhanil), Research and Graduate Studies, Khon Kaen University (S. Kulchat). MK and KN were supported by the target development group grant (Cosmeceuticals) P1952244, from the National Science and Technology Development Agency (NSTDA, Thailand) and would like to thank the National Nanotechnology center (NANOTEC), NSTDA, Thailand for facilities and publication support. JAH acknowledges support from Australian Research Council (ARC) Future Fellowship (FT180100295).

Author contributions

S.L., S.K. conceived of the research, designed the experiments. S.B., S.L., M.K., K.N. and S.K. provided formal analysis and funding acquisition. S.B., S.L., C.T., P.W., M.K., K.N. and W.Y. fabricated the materials and performed methodologies. C.T. conducted the synthesise and characterize of Cur-AgNPs and GG/Cur-AgNPs hydrogels. S.B., S.L., P.W., M.K., K.N. and W.Y. performed the in vitro and in vivo experiments. S.L., S.K. and J.A.H. supervised the work and wrote the manuscript. S.B., S.L., C.T., P.W., M.K., K.N., W.Y., S.K. and J.A.H. carried out reviewing and editing. All authors were involved in the discussion and participated in manuscript input.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41598-021-01262-x>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to S.L. or S.K.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2021

ประวัติผู้วิจัย

| | |
|--------------------------------|---|
| ชื่อ | อาจารย์ ดร.ศักรินทร์ ภูพานิล |
| วัน เดือน ปีเกิด | 29 มีนาคม 2529 |
| สถานที่เกิด | จังหวัดสุรินทร์ |
| ประวัติการศึกษา | ปริญญาตรีบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์ชีวภาพประยุกต์ สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ พ.ศ. 2557 วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาชีววิทยา (เกียรตินิยมอันดับสอง) คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล พ.ศ. 2551 |
| สถานที่ทำงาน | คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสยาม แขวงบางหว้า เขตภาษีเจริญ กรุงเทพมหานคร |
| ตำแหน่ง | อาจารย์ประจำสาขาชีววิทยาและวิทยาศาสตร์ชีวภาพ |
| สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ | ชีววิทยา ชีวเคมีและชีววิทยาโมเลกุล |

ประวัติการได้รับทุนวิจัย

1. ทุนอุดหนุนการวิจัย สำนักส่งเสริมและพัฒนางานวิจัยมหาวิทยาลัยสยาม พ.ศ. 2562-2563
2. ทุนสมทบการวิจัยเพิ่มเติม คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสยาม พ.ศ. 2563

ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ

1. **Bhubhanil, S.**, Talodthaisong, C., Khongkow, M., Namdee, K., Wongchitrat, P., Yingmema, W., Hutchison, J. A., Lapmanee, S., & Kulchat, S. (2021). Enhanced wound healing properties of guar gum/curcumin-stabilized silver nanoparticle hydrogels. *Scientific reports*, 11(1), 21836.
2. Takahashi, N., Gruber, C. C., Yang, J. H., Liu, X., Braff, D., Yashaswini, C. N., **Bhubhanil, S.**, Furuta, Y., Andreescu, S., Collins, J. J., & Walker, G. C. (2017). Lethality of MalE-LacZ hybrid protein shares mechanistic attributes with oxidative component of antibiotic lethality. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(34), 9164–9169.
3. **Bhubhanil, S.**, Sittipo, P., Chaoprasid, P., Nookabkaew, S., Sukchawalit, R., & Mongkolsuk, S. (2014). Control of zinc homeostasis in *Agrobacterium tumefaciens* via zur and the zinc uptake genes znuABC and zinT. *Microbiology (Reading, England)*, 160(Pt 11), 2452–2463.

4. **Bhubhanil, S.**, Chamsing, J., Sittipo, P., Chaoprasid, P., Sukchawalit, R., & Mongkolsuk, S. (2014). Roles of *Agrobacterium tumefaciens* membrane-bound ferritin (MbfA) in iron transport and resistance to iron under acidic conditions. *Microbiology (Reading, England)*, 160(Pt 5), 863–871.
5. **Bhubhanil, S.**, Niamyim, P., Sukchawalit, R., & Mongkolsuk, S. (2014). Cysteine desulphurase-encoding gene *sufS2* is required for the repressor function of *RirA* and oxidative resistance in *Agrobacterium tumefaciens*. *Microbiology (Reading, England)*, 160(Pt 1), 79–90.
6. **Bhubhanil, S.**, Ruangkiattikul, N., Niamyim, P., Chamsing, J., Ngok-Ngam, P., Sukchawalit, R., & Mongkolsuk, S. (2012). Identification of amino acid residues important for the function of *Agrobacterium tumefaciens* *Irr* protein. *FEMS microbiology letters*, 335(1), 68–77.
7. Ruangkiattikul, N., **Bhubhanil, S.**, Chamsing, J., Niamyim, P., Sukchawalit, R., & Mongkolsuk, S. (2012). *Agrobacterium tumefaciens* membrane-bound ferritin plays a role in protection against hydrogen peroxide toxicity and is negatively regulated by the iron response regulator. *FEMS microbiology letters*, 329(1), 87–92.

ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับชาติ

1. Danviboon, K., Sripradite, S., Tangbumrungskul, P., Sangkanjanavanich, C., Pruksaseat, C., Jeamanukoolkit, P., Saijai, K., Pongputcharapun, K., **Bhubhanil, S.**, Lapmanee, S. (2021). The effects of heat on sperm quality and male infertility: A systematic review. *Journal of Medicine and Health Sciences*. 28(2): 178-188.
2. Sriwong, S., Kotsaouppara, N., Chawmuangkhong, K., Tingpej, P., **Bhubhanil, S.**, Lapmanee, S. (2021). The assessment and improvement of microbiological environmental quality in the laboratory animal center, Thammasat University, Thailand. *Journal of Safety and Health*. 13(2).
3. Sukcharoen, W., Tangaromsuk, P., Sontiatchara, M., Waithayakul, K., Savedkairop, C., Jidapa Poopongpet, J., Kengkoom, R., **Bhubhanil, S.**, Lapmanee, S. (2020). The Study on Thailand's Particulate Matter 2.5 (PM 2.5) Management in Accordance with The World Health Organization (WHO) Guidelines. *Vajira Medical Journal: Journal of Urban Medicine*. 64(5):345-356.
4. Lecktip, C., Woratanarat, T., **Bhubhanil, S.**, Lapmanee, S. (2019). Risk factors for falls in elderly. *Journal of Medicine and Health Sciences*. 26(1):85-103.