



## รายงานการวิจัย

เรื่อง

การศึกษาประสิทธิภาพนาโนไฮโดรเจลที่มีส่วนผสมสารแอนโดรกราโฟไลด์จาก  
สารสกัดฟ้าทะลายโจรต่อการสมานแผลและการระคายเคืองผิวหนังในสัตว์ทดลอง

**The efficacy of nanohydrogel-based containing andrographolide on  
wound healing and skin irritation of animal model**

โดย

อาจารย์ ดร.ศราวุธ ลาภมณีย์

คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสยาม

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยสยาม

(ทุนสนับสนุนด้านวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม พื้นฐาน ปีงบประมาณ พ.ศ. 2566)

การศึกษาประสิทธิภาพนาโนไฮโดรเจลที่มีส่วนผสมสารแอนโดรกราโฟไลด์จาก  
สารสกัดฟ้าทะลายโจรต่อการสมานแผลและการระคายเคืองผิวหนังในสัตว์ทดลอง

**The efficacy of nanohydrogel-based containing andrographolide on  
wound healing and skin irritation of animal model**

โดย

อาจารย์ ดร.ศราวุธ ลาภมณีย์  
คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสยาม

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยสยาม  
(ทุนสนับสนุนด้านวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม พื้นฐาน ปีงบประมาณ พ.ศ. 2566)

**ชื่อโครงการ** การศึกษาประสิทธิภาพนาโนไฮโดรเจลที่มีส่วนผสมสารแอนโดรกราโฟไลด์จากสารสกัดฟ้าทะลายโจรต่อการสมานแผลและการระคายเคืองผิวหนังในสัตว์ทดลอง

**ผู้วิจัย**

1. ดร.ศราวุธ ลาภมณีชัย คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสยาม
2. ดร.มัตถกา คงขาว ศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ
3. ดร.คทาวุธ นามดี ศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ
4. ดร.นฤมล ภูมมาพันธ์ วิทยาลัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
5. ดร.ชานนท์ ตลอดไธสง ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
6. ผศ.ดร.ศิรินันท์ กุลชาติ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

#### บทคัดย่อ

การพัฒนาและการปรับปรุงการรักษาบาดแผลยังต้องมีวิธีการสมัยใหม่เพื่อนำมารักษาปิดแผลและต้องไม่มีผลข้างเคียง งานวิจัยนี้สังเคราะห์เจลลาตินไฮโดรเจลที่มีส่วนผสมของวานิลลินและเฟอริกไอออน (GVF) การสังเคราะห์เจลลาตินไฮโดรเจล GVF/AGP-AgNP สูตรนี้มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพสามารถห่อหุ้มและเข้ากันได้ดีกับอนุภาคเงินและสารแอนโดรกราโฟไลด์ (AGP-AgNPs) และไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ นอกจากนี้ AGP-AgNPs เร่งการสมานรอยแผล เพิ่มปริมาณคอลลาเจนในเซลล์ผิวหนังเพาะเลี้ยงและด้านการติดเชื้อมแบคทีเรียในงานวันเพาะเลี้ยง มากไปกว่านั้น เจลลาตินไฮโดรเจล GVF/AGP-AgNP สามารถเร่งอัตราการสมานแผลและปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่แผลผ่าตัดในหนูแรทตลอดระยะเวลาการรักษา 28 วัน โดยการลดระยะช่วงการอักเสบของแผลและเร่งให้แผลเข้าสู่ช่วงการซ่อมแซมและปรับรูปร่าง ผลการย้อมสี H&E และสี Masson's Trichrome พบว่า แผลมีปริมาณเซลล์ชักนำการอักเสบลดลงและการสะสมคอลลาเจนเพิ่มขึ้น อีกทั้งผลการวิเคราะห์ปริมาณยีนควบคุมหรือส่งเสริมการสมานแผลด้วยเทคนิค qRT-PCR พบว่า ยีน TGF- $\beta$ 1, EGF, VEGF, MMP1, collagen 1 และ collagen 3 เพิ่มขึ้นในขบวนการหายของแผลมากกว่าไฮโดรเจลทั่วไป ยิ่งไปกว่านั้น เจลลาตินไฮโดรเจล GVF/AGP-AgNP ไม่มีความระคายเคืองผิวหนังของกระต่ายตามแนวทาง OECD สำหรับเครื่องสำอางและวัตถุอันตราย ดังนั้นไฮโดรเจลสูตรนี้จึงเป็นวัสดุชีวภาพสมานแผลที่มีความปลอดภัยและไม่ระคายเคืองผิวหนัง ซึ่งสามารถนำมาศึกษาในระดับขั้นคลินิกถัดไป

**คำสำคัญ** แอนโดรกราโฟไลด์, เจลลาตินไฮโดรเจล, อนุภาคเงินนาโน, การระคายเคืองผิวหนัง, การสมานแผล

**Research title** THE EFFICIENCY OF NANOHYDROGEL-BASED CONTAINING ANDROGRAPHOLIDE ON WOUND HEALING AND SKIN IRRITATION OF ANIMAL MODEL IN RATS

**Researchers**

1. Dr. Sarawut Lapmanee, Faculty of Medicine, Siam University
2. Dr. Mattaka Kongkow, National Nanotechnology Centre
3. Dr. Katawut Namdee, National Nanotechnology Centre
4. Dr. Narumol Bhummaphan, College of Public Health Sciences Chulalongkorn University
5. Dr. Chanon Talodthaisong Department of Chemistry, Faculty of Science Khon Kaen University
6. Asst. Prof. Dr. Sirinan Kulchat, Department of Chemistry, Faculty of Science Khon Kaen University

**ABSTRACT**

The advancement and optimization of wound healing necessitate the application of contemporary wound closure techniques devoid of adverse side effects. In this study, a gelatin hydrogel incorporating vanillin and ferric ions (GVF), was meticulously synthesized. Furthermore, the synthesis of GVF hydrogels containing andrographolide-encapsulated silver nanoparticles (AGP-AgNPs) was diligently executed. These GVF/AGP-AgNP hydrogels exhibited remarkable biocompatibility while demonstrating no evidence of toxicity. Additionally, GVF/AGP-AgNP hydrogels showed the capacity to accelerate the wound healing process by stimulating collagen production in cultured dermal human cells and exhibiting antibacterial activity. Furthermore, in a 28-day treatment regimen involving rats with surgically induced wounds, the GVF/AGP-AgNP hydrogels not only expedited wound healing but also effectively reduced the bacterial colonies by attenuating the inflammatory phase of the wound, thereby expediting the transition to the proliferation and remodeling phase. Histological analyses, encompassing H & E and Masson's trichrome staining, showed the presence of inflammation-inducing cells and heightened collagen deposition at the wound site. In addition, qRT-PCR analysis unveiled an upregulation of genes associated with the promotion of wound healing, including TGF- $\beta$ 1, EGF, VEGF, MMP1, collagen 1, and collagen 3, in comparison to the control hydrogel. Furthermore, the GVF/AGP-AgNP hydrogels exhibited non-irritating properties when applied to rabbit skin, in alignment with the OECD guidelines for cosmetics and hazardous substances. Taken together, this formulation of bioactive hydrogel presents itself as a safe and non-irritating biomaterial for wound dressing, warranting further investigation at the clinical level.

**Keywords:** andrographolide, gelatin hydrogel, silver nanoparticles, skin irritation, wound healing

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยสำเร็จลุล่วงได้ตามความมุ่งหมาย ผู้วิจัยขอขอบคุณผู้ร่วมวิจัย ผศ.ดร.ศิรินันท์ กุลชาติ และ ดร.ชานนท์ ตลอด ไธสง ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ดร. มัตถกา คงขาว และ ดร.คทาวุธ นามดี นักวิจัยอาวุโส ศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ และดร.นฤมล ภูมิมาพันธ์ วิทยาลัยวิทยาศาสตร์ สาธารณสุข จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ให้ความช่วยเหลือในการสังเคราะห์สารและวิเคราะห์ข้อมูล เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงด้วยเครื่องมือวิจัยและให้คำแนะนำซึ่งเป็นประโยชน์ในการทำวิจัยเป็นอย่างมาก

อีกทั้งขอขอบพระคุณ รศ. ดร. ประพิมพรรณ วงศ์จิตรัตน์ ศูนย์วิจัยพัฒนานวัตกรรม และชีวการแพทย์สารสนเทศ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล ซึ่งสนับสนุน ไพโรเมอร์และ วิเคราะห์ปริมาณยีนส่งเสริมการสมานแผล รวมถึงอนุกรรมการจรรยาบรรณการวิจัยในสัตว์และ คณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและใช้สัตว์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ในการอนุมัติให้ดำเนินงาน วิจัยในสัตว์ทดลอง รวมถึงนายสัตวแพทย์วีรยุทธ ยังมีมา รองผู้อำนวยการศูนย์สัตว์ทดลอง และ นางสาวสิริวรรณ ศรีวงศ์ นักวิทยาศาสตร์ ศูนย์สัตว์ทดลอง มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ที่ให้คำปรึกษา และช่วยเหลือด้านสัตว์ทดลองและทดสอบการระคายเคืองผิวหนัง

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณสำนักส่งเสริมและพัฒนางานวิจัย มหาวิทยาลัยสยาม และทุน สนับสนุนงาน วิจัยมูลฐาน (Fundamental Fund) ประเภท Basic Research Fund ประจำปี งบประมาณ พ.ศ. 2566 ของสำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (สกสว.) ในการส่งเสริมและสนับสนุนทุนวิจัยครั้งนี้

อาจารย์ ดร.ศราวุธ ลาภมณีย์

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย .....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ .....	ข
กิตติกรรมประกาศ .....	ค
สารบัญ .....	ง
สารบัญตาราง .....	ช
สารบัญภาพ .....	ซ
<b>บทที่ 1 บทนำ</b>	
หลักการและเหตุผล .....	1
วัตถุประสงค์การวิจัย .....	3
กรอบแนวคิดการวิจัย .....	3
สมมติฐานการวิจัย .....	4
ขอบเขตของการวิจัย .....	4
นิยามศัพท์เฉพาะ .....	5
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ .....	5
<b>บทที่ 2 วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง</b>	
การพัฒนานาโนคอมพอสิตไฮโดรเจล .....	6
การสแกนแผล .....	8
พยาธิวิทยาการระคายเคืองผิวหนัง .....	9
ข้อมูลและสรรพคุณสมุนไพรฟ้าทะลายโจร .....	11
<b>บทที่ 3 การดำเนินการวิจัย</b>	
การสังเคราะห์ไฮโดรเจลและการพิสูจน์เอกลักษณ์ .....	14
การสังเคราะห์อนุภาคเงินนาโนและการพิสูจน์เอกลักษณ์ .....	15
การคอมพอสิตไฮโดรเจลกับอนุภาคเงินนาโนห่อหุ้มสารแอนโดรกราโฟไลต์ .....	15
การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนังเพาะเลี้ยง .....	16
การศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์ผิวหนังเพาะเลี้ยง .....	17
การศึกษาปริมาณคอลลาเจนด้วยวิธี Sirius red staining .....	17

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
การศึกษาการสมานแผลของเซลล์ผิวหนังเพาะเลี้ยง.....	18
การศึกษาความสามารถในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียในงานเพาะเลี้ยง.....	18
การศึกษาอัตราการสมานแผลในสัตว์ทดลอง.....	19
การศึกษาจุลพยาธิวิทยาของการสมานแผล.....	20
การศึกษาปริมาณยีนส่งเสริมการสมานแผล.....	20
การศึกษาความระคายเคืองผิวหนัง.....	21
การรับรองจริยธรรมการวิจัยในสัตว์ทดลอง.....	23
การวิเคราะห์ทางสถิติ.....	23
<b>บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล</b>	
ผลการสังเคราะห์และเอกลักษณ์ของเจลาคตินไฮโดรเจลที่มีอนุภาคเงินนาโน.....	24
และห่อหุ้มด้วยสารแอนโดรกราโฟไลด์จากสารสกัดฟ้าทะลายโจร	
ผลของอนุภาคเงินนาโนที่ห่อหุ้มสารแอนโดรกราโฟไลด์ต่อความเป็นพิษ.....	25
การสมานแผลในเซลล์ผิวหนังและฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียในงานเพาะเลี้ยง	
ผลของเจลาคตินไฮโดรเจลกับอนุภาคเงินนาโนที่ห่อหุ้มสารแอนโดรกราโฟไลด์.....	29
ต่อการสมานแผล การเปลี่ยนแปลงพยาธิสรีรวิทยาของการสมานแผลระดับเนื้อเยื่อและ	
ระดับอนุชีวโมเลกุล และการระคายเคืองผิวหนังในสัตว์ทดลอง	
<b>บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ</b>	
สรุปผลการวิจัย.....	35
อภิปรายผล.....	36
ข้อเสนอแนะ.....	41
<b>บรรณานุกรม</b> .....	42

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

ภาคผนวก

ก หนังสืออนุมัติการพิจารณาขรรษาบรรณการใช้สัตว์ทดลอง.....	49
ข ผลผลิตที่เกิดขึ้นจากโครงการวิจัย.....	51
ค ผลที่คาดว่าจะได้รับจากโครงการวิจัย.....	52
ง บทความวิจัยที่ได้รับตีพิมพ์.....	53
จ นิพนธ์ต้นฉบับบทความวิจัย.....	54
ประวัติผู้วิจัย.....	55





## สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 3.1 รายการไพรมอร์อื่นควบคุมและส่งเสริมการสมานแผล.....	21
ตารางที่ 3.2 การให้คะแนนความแดงและการบวมของผิวหนัง.....	22
ตารางที่ 3.3 ดัชนีการระคายเคืองตามเกณฑ์เครื่องมือแพทย์.....	23
ตารางที่ 3.4 ดัชนีการระคายเคืองตามเกณฑ์เครื่องสำอางและวัตถุอันตราย.....	23
ตารางที่ 4.1 ผลของเจลาตินไฮโดรเจลผสมเงินนาโนที่ห่อหุ้มแอนโดรกราโฟไลด์.....	34
ต่อการระคายเคืองผิวหนังของกระต่าย	



## สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1.1	แผนผังตัวแปรต้นและตัวแปรตามของงานวิจัย.....3
ภาพที่ 2.1	การพัฒนาไฮโดรเจลที่ผสมอนุภาคเงินนาโนในการรักษาแผล.....7
ภาพที่ 2.2	กระบวนการและระยะเวลาการหายของแผล.....10
ภาพที่ 2.3	การเปลี่ยนแปลงลักษณะทางจุลภาคและการระคายเคืองผิวหนัง.....11
ภาพที่ 2.4	ลักษณะของสมุนไพรรักษาแผล.....13
ภาพที่ 2.5	สารเคมีสำคัญที่สกัดจากสมุนไพรรักษาแผล.....13
ภาพที่ 4.1	ค่าโมดูลัสและความหนืดของเจลาตินไฮโดรเจลผสมเงินนาโนที่ห่อหุ้มแอนโดรกราโฟไลด์.....24
ภาพที่ 4.2	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและขนาดของเจลาตินไฮโดรเจลผสมเงินนาโนที่ห่อหุ้มแอนโดรกราโฟไลด์ด้วยเครื่อง UV-VIS Spectrophotometer และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน.....25
ภาพที่ 4.3	ผลของอนุภาคเงินนาโนที่ห่อหุ้มสารแอนโดรกราโฟไลด์ต่อความเป็นพิษ.....26
	การเพิ่มจำนวนเซลล์และการสร้างคอลลาเจนเซลล์ในเนื้อเยื่อผิวหนังเพาะเลี้ยง
ภาพที่ 4.4	ผลของอนุภาคเงินนาโนที่ห่อหุ้มสารแอนโดรกราโฟไลด์ต่อการปิดรอยแผล.....27
ภาพที่ 4.5	ผลของเจลาตินไฮโดรเจลผสมเงินนาโนที่ห่อหุ้มแอนโดรกราโฟไลด์ต่อการต้านเชื้อแบคทีเรีย.....28
ภาพที่ 4.6	ผลของเจลาตินไฮโดรเจลผสมเงินนาโนที่ห่อหุ้มแอนโดรกราโฟไลด์ต่อการสมานแผลการต้านเชื้อแบคทีเรียบริเวณแผลที่ผิวหนังสัตว์ทดลอง.....29
ภาพที่ 4.7	ผลของเจลาตินไฮโดรเจลผสมเงินนาโนที่ห่อหุ้มแอนโดรกราโฟไลด์ต่อการสร้างเยื่อผิวใหม่ที่ผิวหนังสัตว์ทดลอง.....30
ภาพที่ 4.8	ผลของเจลาตินไฮโดรเจลผสมเงินนาโนที่ห่อหุ้มแอนโดรกราโฟไลด์ต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างผิวหนังระดับจุลภาคของสัตว์ทดลอง.....31
ภาพที่ 4.9	ผลของเจลาตินไฮโดรเจลผสมเงินนาโนที่ห่อหุ้มแอนโดรกราโฟไลด์ต่อการสังเคราะห์คอลลาเจนที่ผิวหนังสัตว์ทดลอง.....32
ภาพที่ 4.10	ผลของเจลาตินไฮโดรเจลผสมเงินนาโนที่ห่อหุ้มแอนโดรกราโฟไลด์ต่อปริมาณขึ้นควบคุมและส่งเสริมการสมานแผล.....33
ภาพที่ 5.1	สรุปขั้นตอนการวิจัย.....36

## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1.1 หลักการและเหตุผล

การติดเชื้อของบาดแผลเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ผู้ป่วยที่ได้รับบาดเจ็บหรือเข้ารับการรักษาด้วยภาวะแทรกซ้อนและเสียชีวิต แม้ว่าปัจจุบันมียาปฏิชีวนะที่ออกฤทธิ์อย่างมีประสิทธิภาพแต่ก็ยังคงพบความผิดปกติในการสมานแผล ซึ่งนำไปสู่ความการติดเชื้อเรื้อรังหรือความพิการทุพพลภาพและการเสียชีวิต ฉะนั้นการพัฒนาแผ่นปิดแผลทำมาจากวัสดุเชิงประกอบและอนุภาคนาโนอาจเป็นทางเลือกในการรักษาและลดภาวะแทรกซ้อนจากการแผลติดเชื้อจึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจ

ปัจจุบันมีหลายกลุ่มวิจัยที่ได้ศึกษาเกี่ยวกับเจลซึ่งเป็นโครงสร้างที่เป็นคล้ายของแข็ง เช่น ไฮโดรเจลสามารถพองตัวได้เมื่อมีน้ำ (Osada and Gong, 1998) ในขณะที่เจลตัวอื่นที่เป็นไฮโดรโพลิเมอร์สามารถพองตัวได้เมื่อมีตัวทำละลายอินทรีย์ (Vintiloiu et al., 2008; Vigata et al., 2020) นอกจากนี้ยังมีการพัฒนาไฮโดรเจลที่มีคุณสมบัติพิเศษที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้ ในวิทยาศาสตร์การแพทย์ เช่น เซนเซอร์ แอคชูเอเตอร์ (actuators) ระบบนำส่งยา (drug delivery) และวิศวกรรมเนื้อเยื่อ (tissues engendering) (Hoffman, 2013; Adibfar et al., 2020) เป็นต้น จากผลการศึกษาของคณะวิจัยในการพัฒนาและสังเคราะห์นาโนไฮโดรเจลให้มีความซ่อมแซมตัวเองและกลับคืนมาสู่รูปร่างปกติเหมือนเดิมได้ด้วยหลักการของเคมีคอนสทิติวชันไดนามิก (constitutional dynamic chemistry) ซึ่งประกอบด้วยพันธะโคเวเลนต์และนอน-โคเวเลนต์ที่มีหมู่ฟังก์ชันผันกลับได้และมีความเป็นไดนามิก (Phadke et al., 2012; Talodthaisong et al., 2021) รวมถึงประสิทธิภาพของการสังเคราะห์ไฮโดรเจลสูตรนี้มีต่อการลดจำนวนแบคทีเรียบนจานเพาะเลี้ยงและผิวหนังบริเวณแผลของสัตว์ทดลอง (Bhubhanil et al., 2021; Talodthaisong et al., 2021) ฉะนั้น โครงการวิจัยนี้จึงต่อยอดผลการศึกษาดังกล่าวด้วยการสังเคราะห์ไฮโดรเจลที่มีคุณสมบัติซ่อมแซมตัวเองและทำการคอมพอลิทกับอนุภาคเงินนาโนที่ห่อหุ้มด้วยสารที่มีฤทธิ์ด้านการอักเสบและเชื้อแบคทีเรียจากสมุนไพรโดยใช้วัสดุเชิงชีวภาพที่ไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อมเพื่อนำมาประยุกต์ใช้เป็นแผ่นปิดแผลในการรักษาและสมานแผลที่ได้รับบาดเจ็บ

ฟ้าทะลายโจร (*Andrographis paniculata* (Burm.f.) Wall ex Nees) มีสารแอนโดรกราโฟไลด์ (andrographolide) เป็นส่วนประกอบที่สำคัญ ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของฟ้าทะลายโจรสามารถต้านไวรัสไข้หวัดและเชื้อแบคทีเรีย กระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกัน ลดไข้และต้านการอักเสบ เป็นต้น (Puri et al., 1993; Cáceres et al., 1999; Zaidan et al., 2005; Sheeja et al., 2006) สำหรับประเทศไทยได้บรรจุฟ้าทะลายโจรอยู่ในบัญชียาหลักของกระทรวงสาธารณสุข ด้วยสรรพคุณของสารแอนโดรกราโฟไลด์ที่สกัดจากฟ้าทะลายโจรในการลดการอักเสบและเชื้อแบคทีเรียดังกล่าว คณะวิจัยจึงพัฒนาและสังเคราะห์ไฮโดรเจลที่มีคุณสมบัติซ่อมแซมตัวเองร่วมกับอนุภาคเงินนาโนที่ล้อมรอบด้วยสารแอนโดรกราโฟไลด์ที่สกัดจากฟ้าทะลายโจรต่อการสมานแผลและการระคายเคืองผิวหนัง อย่างไรก็ตาม การศึกษาประสิทธิภาพของนาโนไฮโดรเจลที่มีสารแอนโดรกราโฟไลด์ที่สกัดจากฟ้าทะลายโจรที่มีฤทธิ์ลดการอักเสบและการติดเชื้อแบคทีเรียต่อกระบวนการสมานแผลและการระคายเคืองผิวหนังมีกลไกที่ซับซ้อนและยังมีไม่ชัดเจน

โครงการวิจัยจึงทำการศึกษาความปลอดภัยของนาโนไฮโดรเจลสูตรนี้ในเซลล์ผิวหนังเพาะเลี้ยงและสัตว์ทดลอง ผลการศึกษานี้ทำให้ทราบถึงความปลอดภัยของนาโนไฮโดรเจลที่มีสารแอนโดรกราโฟไลด์ที่สกัดจากฟ้าทะลายโจรก่อนนำไปใช้ในการศึกษาในมนุษย์ต่อไป โดยทำการสังเคราะห์เจลาตินไฮโดรเจลกับอนุภาคเงินนาโนที่ห่อหุ้มด้วยสารแอนโดรกราโฟไลด์ที่สกัดจากฟ้าทะลายโจร แล้วทำการทดสอบความสามารถในการความเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนังเพาะเลี้ยง มาเชื้อแบคทีเรีย ความสามารถในการสมานแผลของผิวหนังหนูแรท การระคายเคืองผิวหนังของกระต่าย รวมถึงศึกษาการเปลี่ยนแปลงพยาธิสรีรวิทยาของการสมานแผลและการระคายเคืองผิวหนังในระดับเนื้อเยื่อและระดับอนุชีวโมเลกุล ตามลำดับ

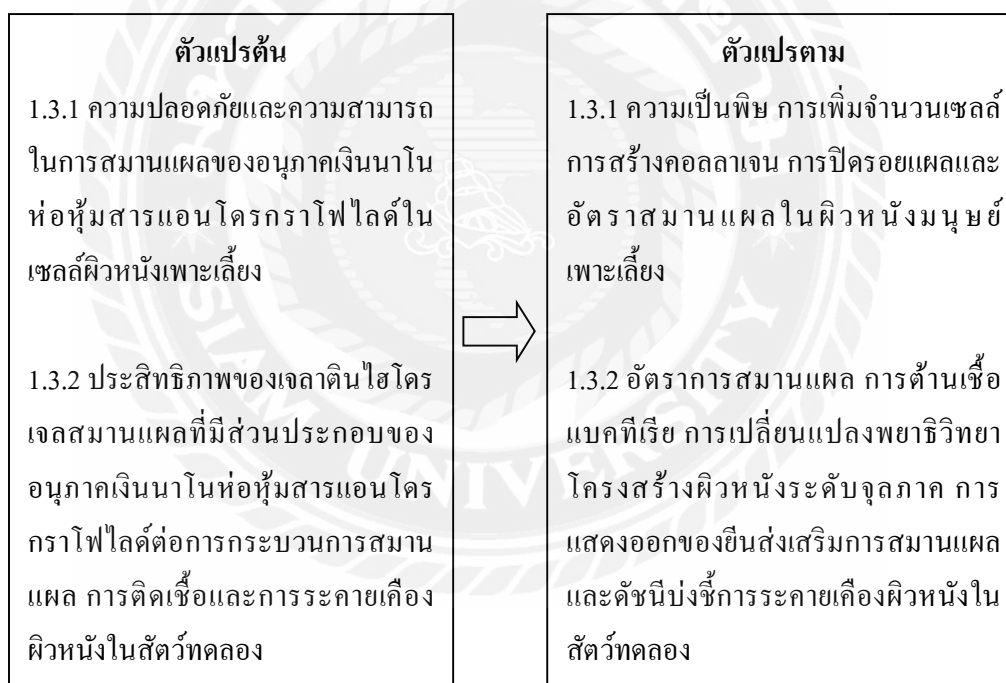
ดังนั้น โครงการวิจัยครั้งนี้จึงมีคุณค่าและเป็นประโยชน์ในการรักษาและศึกษากลไกการสมานแผลและการระคายเคืองผิวหนัง ซึ่งนำไปสู่การพัฒนาแผ่นปิดแผลที่นำมาใช้ในการรักษาทางการแพทย์ เช่น แผลที่เกิดจากการกดทับและแผลติดเชื้อโรคเบาหวานในผู้สูงอายุ เป็นต้น อีกทั้งโครงการวิจัยนี้เป็นส่วนหนึ่งการสนับสนุนและขับเคลื่อนการพัฒนาสมุนไพรไทยที่มีคุณภาพและความปลอดภัย

## 1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย

1.2.1 เพื่อสังเคราะห์และพิสูจน์เอกลักษณ์ของเจลาตินไฮโดรเจลที่สามารถซ่อมแซมตนเองที่มีส่วนประกอบของอนุภาคเงินนาโนและสารแอนโดรกราโฟไลด์จากฟ้าทะลายโจร

1.2.2 เพื่อศึกษาผลของการรักษาแผลด้วยเจลาตินไฮโดรเจลนาโนคอมโพสิตกับอนุภาคเงินนาโนที่ห่อหุ้มด้วยสารแอนโดรกราโฟไลด์จากฟ้าทะลายโจรต่อความเป็นพิษต่อเซลล์ การฆ่าเชื้อแบคทีเรีย และพยาธิสรีรวิทยาของการระคายเคืองผิวหนังและการสมานแผลในระดับเนื้อเยื่อและระดับอนุชีวโมเลกุลในสัตว์ทดลอง

## 1.3 กรอบแนวคิดการวิจัย



ภาพที่ 1.1 แผนผังตัวแปรต้นและตัวแปรตามของงานวิจัย

#### 1.4 สมมติฐานการวิจัย

การสังเคราะห์เจลาตินไฮโดรเจลที่มีส่วนผสมสารแอนโดรกราโฟไลด์จากฟ้าทะลายโจรมีความปลอดภัยต่อเนื้อเยื่อผิวหนังเพาะเลี้ยง เร่งการสมานแผลและการระคายเคืองน้อยในสัตว์ทดลอง ไฮโดรเจลสูตรนี้สามารถลดปริมาณแบคทีเรียและส่งเสริมการสมานแผลด้วยการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างระดับจุลภาคและปริมาณยีนควบคุมการสมานแผลทางชีววิทยาระดับโมเลกุล

#### 1.5 ขอบเขตของการวิจัย

โครงการวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อพัฒนาเจลาตินไฮโดรเจลซ่อมแซมตนเองอัจฉริยะที่สังเคราะห์มาจากวัสดุชีวภาพ เน้นวัสดุที่มีราคาถูกลงและสามารถเข้ากันได้กับระบบชีวภาพ ไฮโดรเจลเป็นวัสดุที่ทำจากโพลิเมอร์ มีลักษณะคล้ายเยล มีความอ่อนนุ่มแต่มีคุณสมบัติในการดูดซับน้ำและสารชีวภาพจึงสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้หลากหลาย คณะวิจัยได้ทำการศึกษาสำรวจในการพัฒนานาโนไฮโดรเจลที่ทำการคอมพอสิตกับอนุภาคเงินนาโนที่ห่อหุ้มด้วยสารจำเพาะที่สกัดจากสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบและฆ่าเชื้อแบคทีเรีย จากองค์ความรู้ในการพัฒนาและสังเคราะห์ไฮโดรเจลาตินนาโนคอมพอสิตดังกล่าว โครงการวิจัยนี้จึงนำเจลาตินไฮโดรเจลกับอนุภาคเงินนาโนที่ห่อหุ้มด้วยสารแอนโดรกราโฟไลด์ที่สกัดจากฟ้าทะลายโจรมาศึกษาประสิทธิภาพในการสมานแผลและการระคายเคืองผิวหนังในสัตว์ทดลอง โดยทำการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนังเพาะเลี้ยง การต้านเชื้อแบคทีเรีย ความสามารถในการสมานแผลและการระคายเคืองผิวหนังของสัตว์ทดลอง รวมถึงศึกษาการเปลี่ยนแปลงพยาธิสรีรวิทยาของการสมานแผลและการระคายเคืองผิวหนังในระดับเนื้อเยื่อและระดับอณูชีวโมเลกุล ผลการศึกษานี้ทำให้ทราบถึงความปลอดภัยของเจลาตินไฮโดรเจลที่มีสารสกัดฟ้าทะลายโจรก่อนนำไปใช้ในการศึกษาในมนุษย์ รวมทั้งการพัฒนานาโนไฮโดรเจลสูตรนี้เป็นผลิตภัณฑ์ต้นแบบในการรักษาแผลภายนอกหรือแผ่นปิดแผลฆ่าเชื้อที่สามารถประยุกต์ใช้ในเชิงพาณิชย์ได้อีกด้วย

## 1.6 นิยามศัพท์เฉพาะ

1.6.1 ไฮโดรเจล (hydrogel) คือ เจลที่มีคุณสมบัติเป็นวัสดุเชิงชีวภาพที่ไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดลอม และนำมาประยุกต์ใช้เป็นแผ่นปิดแผลในการรักษาและซ่อมแซมแผลที่ได้รับบาดเจ็บ

1.6.2 แผล (wound) คือ การฉีกขาดของเนื้อเยื่อตั้งแต่ชั้นผิวหนังจนถึงชั้นไขมันแต่ไม่ถึงระดับของกล้ามเนื้อ

1.6.3 การหายของแผล (wound healing) คือ การเชื่อมต่อเนื้อเยื่อภายใต้บาดแผล

1.6.4 การระคายเคืองผิว (skin irritation) คือ ภาวะของอาการคันหรือระคายเคืองเกิดขึ้นได้เมื่อผิวสัมผัสกับสารหรือสภาวะที่ก่อให้เกิดการระคายเคือง

## 1.7 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.7.1 สร้างองค์ความรู้ใหม่เกี่ยวกับการพัฒนาองค์ประกอบและวิธีการสังเคราะห์แผ่นปิดแผลจากวัสดุชีวภาพไฮโดรเจลที่มีความปลอดภัยและมีประสิทธิภาพในการสมานแผล

1.7.2 ข้อมูลพื้นฐานการพัฒนาผลิตภัณฑ์แผ่นปิดแผลจากวัสดุเชิงประกอบไฮโดรเจลห่อหุ้มสารสกัดสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านการติดเชื้อและการอักเสบ ซึ่งสามารถนำมารักษาผู้ป่วยในการสมานแผลที่ได้รับบาดเจ็บ

## บทที่ 2

### วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 2.1 การพัฒนาโนคอมพอลิไทโครเจล

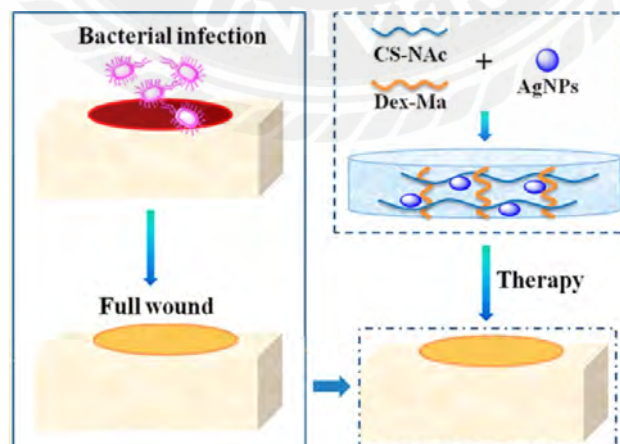
ไฮโครเจลสามารถสังเคราะห์ได้จากโครงข่ายพอลิเมอร์แบบสามมิติที่มีคุณสมบัติเป็นไฮโดรฟิลิก โดยไฮโครเจลสามารถดูดซับสารอื่นตั้งแต่ 10-20% ถึงหนึ่งพันเท่าจนกว่าจะเข้าสู่สมดุล ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสารตั้งต้นและรูปแบบของโครงข่ายของพอลิเมอร์ที่นำมาสังเคราะห์เป็นไฮโครเจล (Hoare et al., 2008) จากคุณสมบัตินี้ส่งผลให้ไฮโครเจลสามารถทำให้บาดแผลแห้งได้เร็ว และช่วยให้บาดแผลซ่อมแซมตัวเองได้เร็วยิ่งขึ้น โดยไฮโครเจลที่พองตัวได้สมบูรณ์แล้ว ไฮโครเจลมีคุณสมบัติเหมือนกับเนื้อเยื่อในสิ่งมีชีวิต เช่น มีความอ่อนนุ่ม ยืดหยุ่น สามารถลดความตึงเครียดของผิวหนังได้ เป็นต้น ซึ่งคุณสมบัติความยืดหยุ่นของไฮโครเจลนี้สามารถลดความตึงเครียดของเนื้อเยื่อหรือผิวหนัง ฉะนั้นไฮโครเจลจึงส่งผลให้เซลล์มีการติดกันเร็วขึ้น (Amsden et al., 2015) พอลิเมอร์ไฮโครเจลที่สังเคราะห์มาจากพอลิอะคริลิกแอซิด พอลิเอทิลีนไกลคอล และพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ สามารถเพิ่มเวลาในการขนส่งยาและความสามารถในการซึมผ่านเนื้อเยื่อ เนื่องจากไฮโครเจลมีคุณสมบัติที่น่าสนใจ เช่น คุณสมบัติเชิงกลที่เหมือนกับเมทริกซ์ที่อยู่นอกเซลล์ ดังนั้นไฮโครเจลไม่ได้มีหน้าที่เพียงแค่ว่าจะช่วยในกระบวนการตัดแต่งเนื้อเยื่อ แต่ยังสามารถใช้เป็นตัวกลางในการช่วยขนส่งยาได้อีกด้วย (Tessmar et al., 2007)

ในปัจจุบันนี้มีนักวิจัยหลายกลุ่มสนใจในการพัฒนาและใช้นาโนคอมพอลิไทโครเจลที่สังเคราะห์มาจากพอลิเมอร์ที่สังเคราะห์มาจากคาร์โบไฮเดรต เพราะมีคุณสมบัติที่น่าสนใจทั้งทางกายภาพและเคมี ซึ่งนาโนคอมพอลิไทโครเจลสามารถประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์ การเกษตร และสิ่งแวดล้อม (Chen et al., 2019) ยิ่งไปกว่านั้น เจลาติน (gelatin) เป็นพอลิเมอร์ทางชีวภาพที่เป็นไฮโดรคอลลอยด์ มีคุณสมบัติในการดูดซับสูง ไม่มีความเป็นพิษและมีความสามารถในการเข้ากันได้กับทางชีวภาพสูง เจลาตินเป็นโปรตีนที่ได้มาจากการสลายคอลลาเจน (collagen) โดยการใช้กรดหรือด่างและน้ำร้อนในการสกัด เจลาตินสามารถสกัดได้จากแหล่งคอลลาเจนหลายแหล่ง เช่น กระดูกวัว หนังสัตว์ หนังหมู และปลา เป็นต้น (Mariod et al., 2018; Krishnan et al., 2020) โครงสร้างของเจลาตินจะเป็นสายพอลิเมอร์ของโปรตีนที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนชนิดต่างๆ มาต่อกันเป็นสายยาว ได้แก่ อะลานีน อาร์จินีน แอสปาดิกแอซิด ซีสเตอีน กลูตามิก แอซิด ไกลซีน ฮีสติดีน ไฮดรอกซีไลซีน ไฮดรอกซีโพรลีน ไอโซลิวซีน ลิวซีน ไลซีน เมไทโอนีน ฟีนิลอะลานีน โพรลีน ซีรีน ทรีโอนีน ทริปโตแฟน ไทโรซีน และวาเลอีน ซึ่งจะพบไกลซีนในปริมาณมากที่สุด ยิ่งไปกว่านั้นระหว่างกรดอะมิโนแต่ละชนิดมีพันธะเพปไทด์เชื่อมอยู่เพื่อประกอบเป็นสายพอลิเพปไทด์



เกิดการบิดเป็นเกลียวที่มีพันธะไฮโดรเจนเชื่อมอยู่ระหว่างกรดอะมิโนเกิดโครงสร้างที่เป็นเกลียว ( $\alpha$ -chain) เจลาตินสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้หลายด้าน รวมไปถึงการนำเจลาตินไปใช้เป็นเจลตก แต่งแผล โดยทำหน้าที่เป็นไฮโดรเจลผสมกับตัวยาเพื่อใช้รักษาแผลหรือใช้เจลาตินเป็นตัวรีดิวซ์ และเป็นตัวล้อมรอบอนุภาคเงินนาโนเพื่อให้เกิดความเสถียร ร่วมกับการนำอนุภาคเงินนาโนไปใช้เป็นยาฆ่าเชื้อเพื่อรักษาแผล (Gaspar-Pintilieșcu et al., 2019; Ye et al., 2019)

ยิ่งไปกว่านั้น ผลการศึกษาของ He และคณะ ปี ค.ศ. 2017 ได้พัฒนานาโนคอมพอสิตไฮโดรเจลโดยสังเคราะห์ได้จากการนำสารละลายอนุภาคเงินนาโนเจือจางและมีส่วนผสมของสาร maleic acid-grafted dextran (Dex-Ma) และ สาร thiolated chitosan (CS-NAC) ทำให้เกิดสาร AgNPs@CNDM ไฮโดรเจล เมื่อนำไปทดสอบคุณสมบัติการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* และ *P. aeruginosa* พบว่า พัฒนานาโนคอมพอสิตไฮโดรเจลสูตรนี้สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทั้งนี้ AgNPs@CNDM ไฮโดรเจล ยังมีคุณสมบัติที่ดีในการรักษาแผลสัตว์ทดลอง โดยเมื่อรักษาด้วย AgNPs@CNDM ไฮโดรเจลเป็นเวลา 10 วัน พบว่า แผลส่วนใหญ่ใกล้หายสนิท เมื่อเทียบกับ สารละลาย AgNPs และ CNDM โดย AgNPs@CNDM ไฮโดรเจลสามารถปล่อย  $Ag^+$  ออกมาได้อย่างต่อเนื่องและคงที่ ซึ่งบ่งชี้การฆ่าเชื้อได้อย่างต่อเนื่องเป็นเวลานาน นอกจากนี้ไฮโดรเจลนี้ยังสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันจากการติดเชื้อและเร่งการซ่อมแซมแผลเบาหวานได้ (ภาพที่ 2.1) ดังนั้นการสังเคราะห์ AgNPs@CNDM ไฮโดรเจลสูตรนี้จึงเป็นแนวโน้มในการพัฒนาการสังเคราะห์ไฮโดรเจลคอมพอสิตไฮโดรเจลกับสารสมุนไพรที่มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรียและลดการอักเสบ และนำแผ่นปิดแผลแบบใหม่ในการรักษาแผลเบาหวานและอาการติดเชื้อของแผลเรื้อรัง



ภาพที่ 2.1 การพัฒนาไฮโดรเจลที่ผสมอนุภาคเงินนาโนในการรักษาแผล (He et al., 2017)

สืบเนื่องจากการสังเคราะห์และการศึกษาคุณสมบัติการด้านแบคทีเรียด้วยไฮโดรเจลที่ผสมอนุภาคเงินนาโนต่อของคณะ พบว่า ไฮโดรเจลที่ผสมอนุภาคเงินสามารถยับยั้งจำนวนแบคทีเรียในงานเพาะเลี้ยง ได้แก่ *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus* (Talodthaisong et al., 2021) และผิวหนังรอบแผลสัตว์ทดลอง (Bhubhanil et al., 2021) โครงการวิจัยจึงใช้เจลาตินไฮโดรเจลที่ผสมอนุภาคเงินสูตรนี้มาผสมกับสารแอนโดรกราโฟไลด์ที่สกัดจากฟ้าทะลายโจรเพื่อศึกษาคุณสมบัติการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย

## 2.2 การสมานแผล

กระบวนการซ่อมแซมของแผล (wound healing) สามารถสังเกตได้จากการมีผิวหนังมาปกคลุมบาดแผลและการเชื่อมต่อเนื้อเยื่อ ภายใต้อาการแผล โดยทั่วไปแล้วกระบวนการซ่อมแซมของแผล ประกอบด้วย 3 ระยะ ดังที่แสดงในภาพที่ 2.2 ดังนี้ (Li et al., 2007; Yildirim et al., 2012)

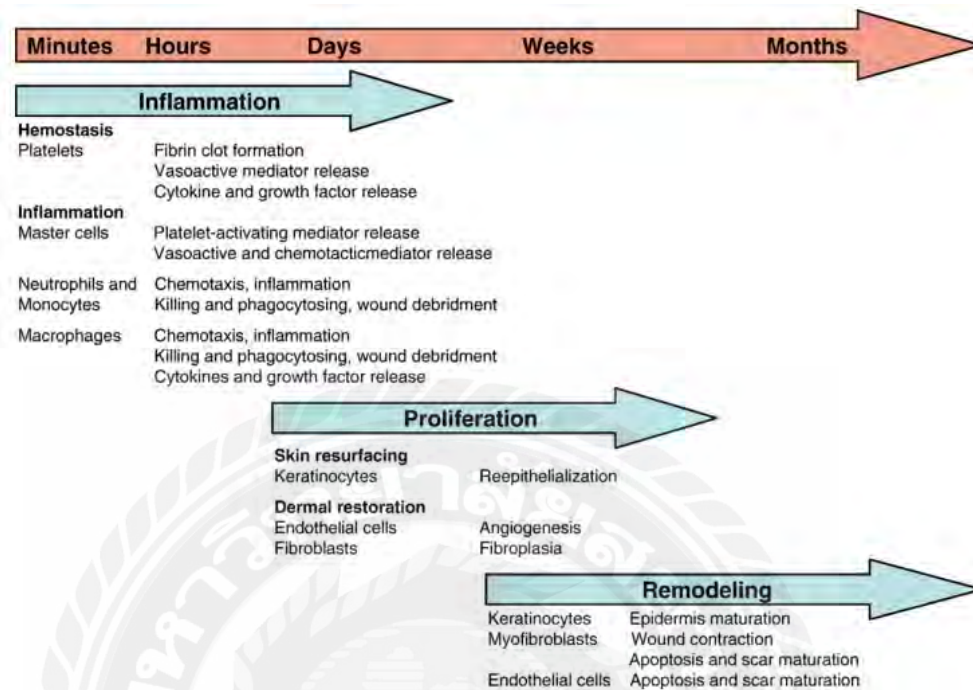
2.2.1 ระยะการอักเสบ (inflammatory phase) คือ ระยะที่ร่างกายกำจัดเนื้อตายและป้องกันการติดเชื้อไม่ให้ลุกลาม กระบวนการอักเสบเกิดขึ้นทันทีเมื่อเกิดแผล โดยเริ่มจากการห้ามเลือด เมื่อเกิดแผลขึ้น โปรตีน คอลลาเจนที่เป็นเส้นใยและสารส่งเสริมการสร้างผิวหนังใหม่ growth factors จะกระตุ้นเกิดการแข็งตัวของเลือด หลอดเลือดที่ผิดปกติจะกระตุ้นให้เกิดลิ่มเลือดเกิดการจับตัวกันเพื่อห้ามเลือด โดยในระยะนี้เกล็ดเลือดจะหลั่ง growth factors ร่วมด้วย เช่น platelet-derived growth factor (PDGF) และ transforming growth factor P(TGF-p) กระบวนการนี้ทำให้ fibrinogen เปลี่ยนเป็น fibrin และกลายเป็นร่างแห ทำให้มีการห้ามเลือด และในเดียวกัน inflammatory cells ต่างๆก็ถูกกระตุ้นให้มาที่บริเวณบาดแผล โดยเซลล์เม็ดเลือดขาว neutrophils ซึ่งปรากฏภายใน 2 วันแรกหลังเกิดแผล ทำหน้าที่กำจัดเนื้อตายโดยกระบวนการ phagocytosis และป้องกันการติดเชื้อ อีกทั้งยังหลั่ง protease เพื่อช่วยให้ย่อย extracellular matrix (ECM) ให้เหมาะสมแก่การหายของแผล ถัดมาเซลล์เม็ดเลือดขาว monocytes และ macrophages ซึ่งจะเข้ามาหลังเกิดแผล 48-72 ชั่วโมง โดยเซลล์เม็ดเลือดขาว monocyte จะถูกกระตุ้นมายังบริเวณที่เกิดแผล โดย monocyte chemoattractant protein 1 แล้วเปลี่ยนเป็นเซลล์เม็ดเลือดขาว macrophages ซึ่งจะเป็เซลล์ที่มีปริมาณมากที่สุด ภายหลังจากเกิดแผล 3 วัน โดยเซลล์เม็ดเลือดขาว macrophages ทำหน้าที่กำจัดเนื้อตายและแบคทีเรียในแผล แต่บทบาทที่สำคัญต่อการหายของแผลคือการหลั่งสาร growth factors ต่างๆซึ่งจำเป็นต่อการสร้าง ECM ทั้งกระตุ้นการสร้าง fibroblast และการสร้างหลอดเลือดใหม่ ถัดมาเซลล์เม็ดเลือดขาว lymphocytes และ mast cell ซึ่งจะเข้ามาบริเวณแผล 5-7 วันหลังเกิดแผล บทบาทของเซลล์ทั้ง 2 ชนิดต่อการหายของแผลยังไม่ทราบแน่ชัด โดยสาร CD-4 และ inhibitory CD-8 ที่หลั่งจากเซลล์เม็ดเลือดขาว lymphocytes มีผลต่อการหายของแผลในระยะต่อไป

2.2.2 ระยะเพิ่มจำนวน (proliferative phase) คือ ระยะที่เนื้อเยื่อเกิดการเพิ่มจำนวน พร้อมๆกับการเกิดแผลเป็น ระยะนี้มักจะเกิดขึ้นภายหลังเกิดแผลประมาณ 4 วัน ถึง 3 สัปดาห์ แต่แท้จริงแล้วระยะเวลาหายของแผลในแต่ละระยะมีความทับซ้อนกัน กระบวนการเชื่อมผิวหนังใหม่ (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 ต่างๆที่จำเป็น เช่น PDGF และ TGF- $\beta$ 1 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)

2.2.3 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

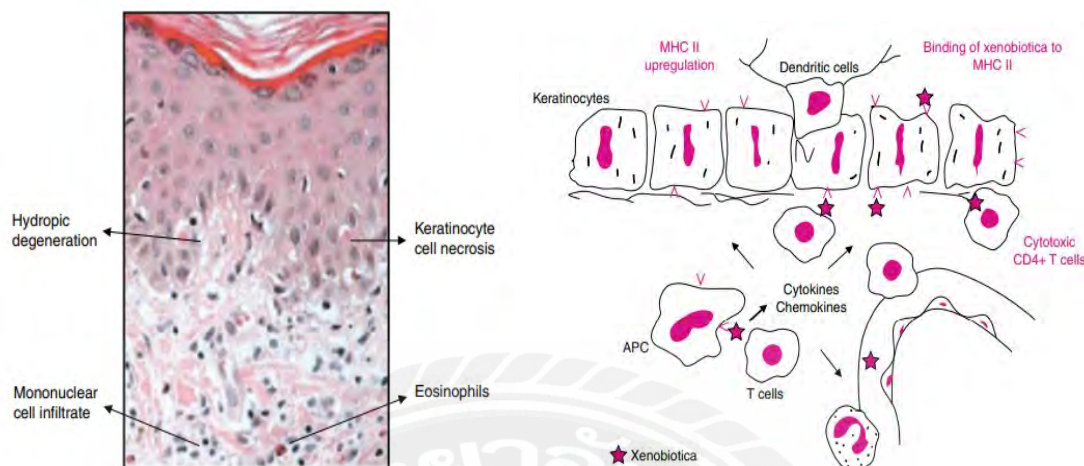
### 2.3 พยาธิสรีรวิทยาการระคายเคืองผิวหนัง

การระคายเคืองและอักเสบส่งผลให้เกิดผื่นแพ้ผิวหนัง เนื่องจากปฏิกิริยาทางภูมิแพ้ ซึ่งร่างกายมีภูมิที่ไวต่อการตอบสนองต่อปัจจัยกระตุ้น เช่น สารเคมี อากาศ หรือ พันธุกรรม ทั้งนี้ผู้ป่วยที่มีอาการภูมิแพ้ผิวหนัง อาจมีอาการภูมิแพ้อื่นๆร่วมกับเยื่อบุจมูกและเยื่อบุตาอักเสบจากภูมิแพ้ และหอบหืด เป็นต้น การดำเนินของโรคที่เกิดขึ้นจะมีลักษณะเป็นผื่นผิวหนังแดงและมีอาการคัน อย่างไรก็ตามสาเหตุของการเกิดการผื่นแพ้ผิวหนังยังไม่พบสาเหตุที่แน่ชัด โดยสาเหตุหลักอย่างหนึ่งมาจากปัจจัยทางพันธุกรรมของตัวบุคคลที่มีประวัติภูมิแพ้ซึ่งมีภูมิที่ไวต่อสิ่งกระตุ้นร่วมกับปัจจัยจากสิ่งแวดล้อมภายนอกที่เป็นตัวกระตุ้นให้เกิดผื่นเพิ่มมากขึ้น เช่น ยาหรือเวชสำอาง เป็นต้น



ภาพที่ 2.2 กระบวนการและระยะเวลาการหายของแผล (Li et al., 2007)

การกำเริบของผิวหนังที่ลุกลามมาจากการเกา เนื่องจากผิวหนังที่เกาจะมีอาการคัน เมื่อมีการเกาจะทำให้โรคเกิดการลุกลามของผิวหนังมากขึ้น รวมถึงสภาพผิวหนังที่ค่อนข้างแห้งหรือแห้งมากจะส่งผลให้เกิดอาการคัน ลักษณะการอักเสบของผิวหนังในระยะเฉียบพลันมักมีลักษณะเห่อแดงคัน ตุ่มน้ำใสหรือมีน้ำเหลืองจากการติดเชื้อแบคทีเรียที่ผิวหนังร่วมด้วย ถัดมามีลักษณะเป็นขุยแห้งหรือสะเก็ด และระยะเรื้อรังซึ่งรอยโรคจะมีลักษณะเป็นรอยนูน คัน และมีการหนาตัวของผิวหนัง (Berardesca et al., 2013) การเปลี่ยนแปลงทางจุลภาคของผิวหนังที่มีอาการระคายเคืองจากยาหรือสารเคมี ซึ่งพบการเสื่อมหรือการตายของเซลล์โปรตีนเคราติน การเพิ่มจำนวนเม็ดเลือดนิวโตรฟิล (neutrophils) และอีโอซิโนฟิล (eosinophil) ในชั้นหนังกำพวด (epidermis) และชั้นหนังแท้ (dermis) โดยมีการกระตุ้น T cells สารเหนี่ยวนำการอักเสบ ได้แก่ interleukin (IL)-5, IL-6, tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , interferon (IFN)- $\gamma$  และ chemokines และสาร histocompatibility complex (MHC) class I and II ก่อให้เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันและเปลี่ยนแปลงของโปรตีนเคราตินและหลอดเลือด ดังที่แสดงในภาพที่ 2.3 (Pichler et al., 2002)



ภาพที่ 2.3 การเปลี่ยนแปลงลักษณะทางจุลภาคและการระคายเคืองผิวหนัง (Pichler et al., 2002)

#### 2.4 ข้อมูลและสรรพคุณสมุนไพรฟ้าทะลายโจร

ฟ้าทะลายโจรจัดเป็นสมุนไพรท้องถิ่นในประเทศแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ที่นำมาถูกใช้กันอย่างแพร่หลาย สำหรับประเทศไทยได้บรรจุฟ้าทะลายโจรอยู่ในบัญชียาหลักแห่งชาติ กระทรวงสาธารณสุข ในหมวดหมู่ยารักษาอาการของระบบทางเดินอาหารและระบบทางเดินหายใจ

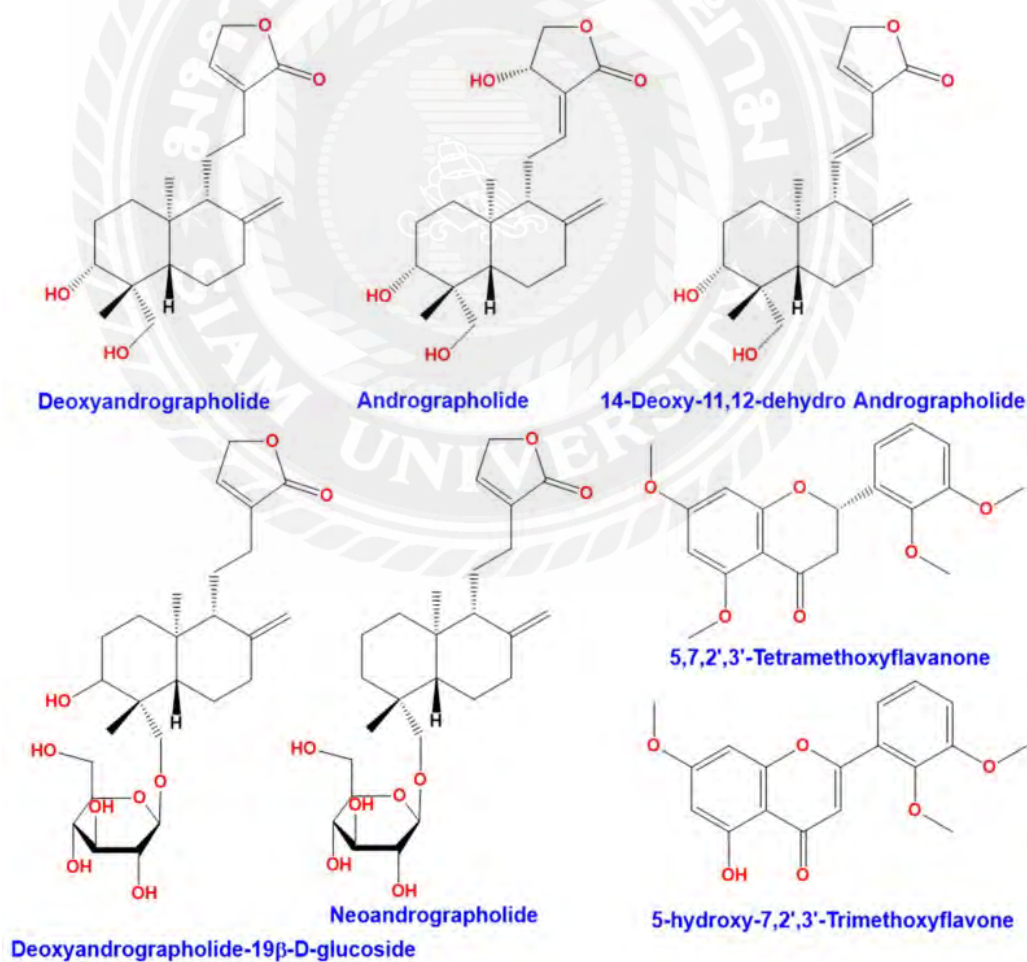
ชื่อวิทยาศาสตร์: *Andrographis paniculata* (Burm.f.) Nees (วงศ์ *Acanthaceae*) เป็นพืชล้มลุก สูงประมาณ 30-60 ซม. ลำต้นตั้งตรงกิ่งก้านเป็นสันสี่เหลี่ยม ใบเดี่ยว เรียงตรงข้าม รูปใบหอก กว้าง 1-2.5 ซม. ยาว 4-10 ซม. โคนใบและปลายใบแหลม ขอบใบเรียบหรือเป็นคลื่นเล็กน้อย เนื้อใบสีเขียวเข้ม เป็นมัน ก้านใบยาว 2-8 มม. ดอกออกเป็นช่อใหญ่ที่ปลายกิ่งและซอกใบ ช่อโปร่ง ยาว 5-30 ซม. ดอกย่อยขนาดเล็ก ดอกสีขาวแกมม่วง มีขน กลีบเลี้ยงโคนติดกัน ผลเป็นฝักรูปทรงกระบอก สีเขียวอมน้ำตาล ปลายแหลม เมื่อผลแก่จะแตกติดเมล็ดออกมา มีเมล็ด 8-14 เมล็ดขนาดเล็ก สีน้ำตาลแดง ใช้เมล็ดขยายพันธุ์ (Thai Herbal Pharmacopoeia, 1995) ดังที่แสดงในภาพที่ 2.4 โดยปัจจุบันมีสมุนไพรฟ้าทะลายโจรจำหน่ายในท้องตลาดทั้งที่ผลิตจากโรงงานผลิตยาที่ได้รับ การรับรองมาตรฐานจากกระทรวงสาธารณสุข โดยนำฟ้าทะลายโจรมาทำเป็นยาลูกกลอนหรือใส่แคปซูลเพื่อความสะดวกในการกิน

สารสำคัญในการออกฤทธิ์ คือ สารกลุ่ม Lactone เช่น สารแอนโดรกราโฟไลด์ (Andrographolide), นีโอแอนโดรกราโฟไลด์ (Neoandrographolide), ไดออกซีแอนโดรกราโฟไลด์ (14-Deoxyandrographolide) และไดออกซีไดดีไฮโดรแอนโดรกราโฟไลด์ (14-Deoxy-11,12-didehydroandrographolide) เป็นต้น ซึ่งมีสูตรโครงสร้างทางเคมี (ภาพที่ 2.5) ทั้งนี้ฟ้าทะลายโจรมีสารแอนโดรกราโฟไลด์ที่เป็นตัวยาสำคัญที่มีอยู่ใน ราก ต้น ใบ โดยต้องมีส่วนประกอบของสารแอนโดรกราโฟไลด์ไม่น้อยกว่า 6 % w/w และมีสารแอนโดรกราโฟไลด์ไม่น้อยกว่าร้อยละ 1 %w/w โดยปัจจุบันมีการใช้สมุนไพรฟ้าทะลายโจรในการรักษา ไข้หวัด ท้องเสีย อันเกิดจากการติดเชื้ออย่างแพร่หลาย (Dai et al., 2019) สารสกัดสมุนไพรฟ้าทะลายโจรมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาหลากหลาย เช่น ต้านไวรัส HIV1 ไข้หวัดและเชื้อแบคทีเรีย กระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกัน ป้องกันความเป็นพิษของตับ ลดไข้และต้านการอักเสบ เป็นต้น (Puri et al., 1993; Cáceres et al., 1999; Zaidan et al., 2005; Sheeja et al., 2006; Dai et al., 2019)

ผลการศึกษาด้านด้านเภสัชวิทยาพบว่า ฟ้าทะลายโจรสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียอันเป็นสาเหตุของการเป็นหนอง (Zhang et al., 2020) รวมถึงลดการอักเสบด้วยการยับยั้งการถ่ายโอนสัญญาณ NF-KB/MAPK signaling pathway และลดปริมาณสารเหนียวนำการอักเสบอีกด้วย (Li et al., 2017) ยิ่งไปกว่านั้น จากการศึกษาประสิทธิภาพของสารแอนโดรกราโฟไลด์ที่สกัดจากฟ้าทะลายโจรต่อการซ่อมแซมผิวหนังทั้งเซลล์เพาะเลี้ยงและสัตว์ทดลอง พบว่า สารแอนโดรกราโฟไลด์ที่ความเข้มข้น 0.1-100 ppm มีเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนังเพาะเลี้ยงต่ำ (Jamaludin et al., 2021) ฉะนั้นทางคณะวิจัยจึงนำช่วงความเข้มข้นดังกล่าวมาประยุกต์ใช้ในการสังเคราะห์ร่วมกับเจลาตินไฮโดรเจลอนุภาคเงินนาโน ผลการศึกษานำร่องทำให้ทราบว่า ความเข้มข้นสารแอนโดรกราโฟไลด์ 0.44 นาโนโมลาร์ มีความเสถียรของการคอมโพสิต ฉะนั้นด้วยสรรพคุณของสารแอนโดรกราโฟไลด์นี้ทำให้คณะวิจัยมีแผนพัฒนาเจลาตินไฮโดรเจลอนุภาคเงินนาโนที่ห่อหุ้มด้วยสารแอนโดรกราโฟไลด์จากสมุนไพรฟ้าทะลายโจรเพื่อศึกษาความปลอดภัยในการบรรเทาภาวะอักเสบของกระบวนการสมานแผลและการระคายเคืองผิวหนัง



ภาพที่ 2.4 ลักษณะของสมุนไพรฟ้าทะลายโจร (Mussard et al., 2019)



ภาพที่ 2.5 สารเคมีสำคัญที่สกัดจากสมุนไพรฟ้าทะลายโจร (Mussard et al., 2019)

### บทที่ 3

#### วิธีดำเนินการวิจัย

**การศึกษาตอนที่ 3.1** เพื่อสังเคราะห์และพิสูจน์เอกลักษณ์ของไฮโดรเจลที่สามารถซ่อมแซมตนเองที่มีอนุภาคเงินนาโนที่ห่อหุ้มด้วยสารแอนโดรกราโฟไลด์จากสารสกัดฟ้าทะลายโจร

#### การสังเคราะห์ไฮโดรเจลและการพิสูจน์เอกลักษณ์

การสังเคราะห์ไฮโดรเจลสูตรเจลาติน (Gelatin-based hydrogels, GVF) โดยชั่งเจลาตินมา 0.48 กรัม ละลายด้วยน้ำปราศจากไอออน ปริมาณ 8 มิลลิลิตร ลงในบีกเกอร์ขนาด 25 มิลลิลิตร ให้ความร้อนที่ 60 องศาเซลเซียสจนกระทั่งเจลาตินละลายหมด และรอนสารละลายอุณหภูมิลดลงแล้วเติมสารละลาย 20 wt% วานิลลินในเอทานอล (1 มิลลิลิตร) กวนให้เข้ากันสารละลายจะกลายเป็นสีเหลืองใส จากนั้นเติม 0.1M  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (1 มิลลิลิตร) แล้วกวนให้เข้ากัน สารละลายจะเป็นสีน้ำตาลแดงและเกิดการสร้างไฮโดรเจล GVF ทันที การพิสูจน์เอกลักษณ์ไฮโดรเจล GVF เพื่อหาส่วนผสมที่เหมาะสมที่สุด โดยเริ่มจากการเตรียมไฮโดรเจลที่ใช้ความเข้มข้นของสารเฟอร์ริกคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) ที่แตกต่างกัน เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดของ  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  สำหรับการเตรียมไฮโดรเจล GVF ในการศึกษาหาส่วนผสมที่เหมาะสมที่สุดของไฮโดรเจล GVF ได้รับการศึกษาโดยใช้เทคนิครีโอโลยี จากการศึกษาด้วยเทคนิครีโอโลยีภายใต้โหมด strain sweep (0.1-100%) ที่ความถี่ที่เท่ากับ 1 รอบ/วินาที สำหรับปริมาณของวานิลลินที่เหมาะสมที่สุดในการเตรียมไฮโดรเจลได้รับการศึกษาด้วยเทคนิครีโอโลยี จากการศึกษาด้วยเทคนิครีโอโลยีภายใต้โหมด strain sweep (0.1-1000%) ที่ความถี่ที่เท่ากับ 1 รอบ/วินาที และได้ศึกษาความเป็นเชิรท์ทินนิ่งไฮโดรเจล (Shear thinning hydrogel) โดยทดสอบในโหมดหมุนด้วยอัตราเฉียดที่ 0.1-1 1/วินาที จากการศึกษาสามารถบ่งชี้ว่าไฮโดรเจลมีสมบัติการเป็นเชิรท์ทินนิ่งก็ต่อเมื่อความหนืดของไฮโดรเจล ลดลงเมื่อ shear rate มากขึ้น ถ้ามีสมบัติเชิรท์ทินนิ่งที่บ่งชี้ว่าไฮโดรเจลเหมาะแก่การนำไปประยุกต์ใช้ทางด้านการชีวการแพทย์ (Talodthaisong et al., 2021; Bhubhanil et al., 2021)



### การสังเคราะห์อนุภาคเงินนาโนและการพิสูจน์เอกลักษณ์

อนุภาคเงินนาโนสามารถสังเคราะห์ได้ด้วยการใช้โมเลกุลของสารแอนโดรกราโฟไลด์เป็นตัวล้อมรอบหรือเป็นตัวทำให้เสถียร โดยเริ่มจากการเตรียมสารละลายสารแอนโดรกราโฟไลด์ที่สกัดมาได้ฟ้าละลายโอร (ปริมาณสารแอนโดรกราโฟไลด์ 9 มิลลิกรัม/แคปซูล) ผลิตโดยบริษัท ขาวละออเภสัช จำกัด จังหวัดสมุทรปราการ โดยทำการตรวจสอบปริมาณสารแอนโดรกราโฟไลด์ด้วยเครื่องแยกและวิเคราะห์ปริมาณสาร Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) ซึ่งใช้เครื่องตรวจจับชนิด diode array ในการตรวจวัดสัญญาณที่วัดค่าการดูดกลืนแสงของสาร ซึ่งสามารถวัดได้ทีละหลายความยาวคลื่นในเวลาเดียวกันร่วมกับเครื่องแมสสเปกโตรเมทรี (mass spectrometer) เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานแอนโดรกราโฟไลด์ USP โดยวัตถุดิบที่ผลิตได้ควรมีความบริสุทธิ์ของสารแอนโดรกราโฟไลด์มากกว่าร้อยละ 95 มี UV spectrum และ mass spectrum สอดคล้องกับแถบสีของสารมาตรฐานแอนโดรกราโฟไลด์ USP

จากนั้นเติมสารละลายแอนโดรกราโฟไลด์ที่เตรียมได้ 3 มิลลิลิตร ลงในน้ำปราศจากไอออนปริมาณ 30 มิลลิลิตร แล้วทำการกวนให้เข้ากัน จากนั้นเติมสารละลายซิลเวอร์ไนเตรด ( $\text{AgNO}_3$ ) ลงไปในสารละลายก่อนหน้านี้ แล้วทำการกวนต่อเนื่องที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 ชั่วโมงจนกระทั่งได้สารละลายเปลี่ยนสีเป็นสีส้ม จะได้อนุภาคเงินนาโนที่ล้อมรอบด้วยแอนโดรกราโฟไลด์ (Andro-AgNPs) หลังจากนั้นนำไปพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิคยูวีวิสซิบิล สเปกโทรสโกปี เทคนิคฟูรีเยร์ทรานสฟอร์มสเปกโตรสโกปี และนำไปศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและหาขนาดโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (transmission electron microscope) ผลการศึกษา นำร่องของคณะวิจัย พบว่า ความเข้มข้นของสารแอนโดรกราโฟไลด์ 0.44 นาโนโมลาร์ ถูกล้อมรอบด้วยอนุภาคเงินนาโนได้อย่างเสถียร ดังนั้นความเข้มข้นของสารแอนโดรกราโฟไลด์นี้จึงมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้ (Talodthaisong et al., 2021; Bhubhanil et al., 2021)

### การคอมพอสิตไฮโดรเจลกับอนุภาคเงินนาโนห่อหุ้มสารแอนโดรกราโฟไลด์ (GVF/Andro-AgNPs)

เจลลาตินไฮโดรเจล GVF/Andro-AgNPs สังเคราะห์จากการผสมเจลลาตินในละลาย Andro-AgNPs ปริมาณ 8 มิลลิลิตร จากนั้นให้ความร้อนจนกระทั่งเจลลาตินละลายหมด เมื่ออุณหภูมิสารละลายลดลงแล้วทำการเติมสารละลายวานิลินที่ละลายในเอทานอลลงไป แล้วทำการกวน

สารละลายให้เข้ากันและเติมสารละลายสารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์ ( $\text{FeCl}_3$ ) เพื่อเป็นตัวเชื่อมขวางในการสร้างไฮโดรเจล จากนั้นกวนสารละลายให้เข้ากันจนกระทั่งได้เจลาติน ไฮโดรเจล GVF/Andro-AgNPs เพื่อนำมาใช้ศึกษาประสิทธิภาพการสมานแผลและการระคายเคืองผิวหนังในสัตว์ทดลอง (Talodthaisong et al., 2021; Bhubhanil et al., 2021)

**การศึกษาตอนที่ 3.2** เพื่อศึกษาประสิทธิภาพอนุภาคนาโนที่ห่อหุ้มสารแอนโดรกราโฟไลด์ต่อความเป็นพิษการสมานแผลในเซลล์ผิวหนังและฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียในจานเพาะเลี้ยง

#### การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนังเพาะเลี้ยง

เซลล์ผิวหนังไฟโบรบลาสต์ (fibroblasts) เลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดดัลเบ็คโค โมดิฟายด์ อีเกิลส์ (Dulbecco's Modified Eagle Medium: DMEM) ในถาดหลุมเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม (96-well plate) ให้ความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ  $2 \times 10^4$  เซลล์ต่อหลุม บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทั้งนี้ความเข้มข้นของอนุภาคนาโนที่ห่อหุ้มสารแอนโดรกราโฟไลด์ 0.44 นาโนโมลาร์ ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่สามารถคงความเสถียรร่วมกับไฮโดรเจลอนุภาคนาโน 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 นาโนโมลาร์ ตามลำดับ จากนั้นเติมสารละลายของสารที่ต้องการทดสอบที่ความเข้มข้นต่างๆ หลุมละ 100 ไมโครลิตร 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;  $\text{IC}_{50}$ ) ซึ่งแสดงถึงความเป็นพิษต่อเซลล์ (Bhubhanil et al., 2021)

### การศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์ผิวหนังเพาะเลี้ยง

เซลล์ผิวหนังถูกเพาะเลี้ยงในถาดหลุมเลี้ยงเซลล์ชนิด 48 หลุม ให้ความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ  $2.5 \times 10^4$  เซลล์ต่อหลุม บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาจึงใส่สารทดสอบอนุภาคเงินที่ห่อหุ้มสารแอนโดรกราโฟไลด์ความเข้มข้น 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 บ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 10 นาที แล้วจึงนำไปอ่านค่าการเปลี่ยนแปลงของการเปล่งแสง (luminescence) (Bhubhanil et al., 2021)

### การศึกษาปริมาณคอลลาเจนด้วยวิธี Sirius red staining

เซลล์ผิวหนังถูกเลี้ยงในถาดหลุมเลี้ยงเซลล์ชนิด 48 หลุม ให้ความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ  $2.5 \times 10^4$  เซลล์ต่อหลุม บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาจึงใส่สารทดสอบอนุภาคที่ห่อหุ้มสารแอนโดรกราโฟไลด์ ความเข้มข้น 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 เมื่อครบกำหนดจึงนำอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าออกและล้างเซลล์ด้วยสารละลาย PBS หลังจากนั้น นำ PBS ออก แล้วทำการดึงเซลล์โดยเติมสารละลาย paraformaldehyde (PFA) ความเข้มข้น 4% หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที จึงนำสารละลาย PFA ออก ล้างเซลล์ด้วย PBS 2 ครั้ง ย้อมเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยสารละลาย direct red 80 ความเข้มข้น 0.1% เป็นเวลา 10 นาที จากนั้น ล้างสีย้อมด้วย 0.01 N กรดไฮโดรคลอริกในสารละลายเอทานอล 70% 2 ครั้งๆ ละ 2 นาที แล้วถ่ายรูปเซลล์ที่ย้อมติดคอลลาเจน หลังจากนั้นละลายสีย้อมด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.5 N หลุมละ 100 ไมโครลิตร และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร (Bhubhanil et al., 2021)

### การศึกษาการสมานแผลของเซลล์ผิวหนังเพาะเลี้ยง

เซลล์ไฟโบรบลาสต์ถูกเลี้ยงใน Culture-insert 4 well เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา จึงเอาแผ่นกั้นเซลล์ออกและล้างเซลล์ที่หลุดออกด้วย PBS หลังจากนั้นบ่มเซลล์กับสารทดสอบ ความอนุภาค Andro-Ag ความเข้มข้น 0.001 และ 0.002 นาโนโมลาร์ และโปรตีน FGF (สารควบคุมเชิงบวก) ความเข้มข้น 100 นาโนกรัม/มิลลิลิตร ปริมาณ 2 มิลลิลิตร บันทึกภาพเซลล์เพาะเลี้ยงด้วยกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 4X ที่เวลาต่าง ๆ ฤทธิ์การกระตุ้นการสมานแผลจะประเมินจากเปอร์เซ็นต์ของรอยแผลที่ปิด (Bhubhamil et al., 2021) ซึ่งสามารถคำนวณตามสมการที่แสดงดังนี้

$$\% \text{ การปิดของรอยแผล} = \frac{\text{พื้นที่รอยแผลเริ่มต้น} - \text{พื้นที่รอยแผลในเวลาต่างๆ}}{\text{พื้นที่รอยแผลเริ่มต้น}} \times 100$$

พื้นที่รอยแผลเริ่มต้น

### การศึกษาความสามารถในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียในจานเพาะเลี้ยง

การทดสอบความสามารถในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียของอนุภาคเงินนาโนจะใช้วิธีการทดสอบโซนยับยั้ง (inhibition zone method) เริ่มจาก นำหัวเชื้อของแบคทีเรียมาเช็ดบนจานเลี้ยงเชื้อ Mueller–Hinton Agar (MHA) จากนั้นเจาะรูทำเป็นหลุมให้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 6 มิลลิเมตร หลังจากนั้นเติมไฮโดรเจลที่ต้องการทดสอบปริมาณ 0.05 กรัม ลงในหลุมบนจานเพาะเลี้ยง แล้วทำให้แห้งในสภาวะการไหลแบบลามินาร์ จากนั้นจานจะถูบบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาที่กำหนดจะทำการวัดขนาดโซนการยับยั้งของไฮโดรเจลที่มีต่อเชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus* (Talodthaisong et al., 2021)

**การศึกษาตอนที่ 3.3** เพื่อศึกษาผลการรักษาด้วยคอมพอสิตไฮโดรเจลกับอนุภาคเงินนาโนที่ห่อหุ้มสารแอนโดรกราไฟไลต์ต่อการสมานแผล การเปลี่ยนแปลงพยาธิสรีรวิทยาของการสมานแผลระดับเนื้อเยื่อและระดับอนุชีวโมเลกุล และการระคายเคืองผิวหนังในสัตว์ทดลอง

### การศึกษาอัตราการสมานแผลในสัตว์ทดลอง

หนูสายพันธุ์ Wistar เพศผู้ อายุ 8 สัปดาห์ น้ำหนักประมาณ 180–200 กรัม จากบริษัท โนมูระสยามอินเตอร์เนชั่นแนลจำกัด หนูถูกเลี้ยงอยู่ในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิ  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$  และความชื้น  $55\pm 5\%$  ด้วยแสงสว่างตามวงจรเวลากลางวันกลางคืนรอบละ 12 ชั่วโมง

หนูทุกตัวได้รับอาหารและน้ำที่มาตรฐาน น้ำหนักของหนูและปริมาณอาหารที่กินจะทำการบันทึกทุกวัน โครงการวิจัยนี้ได้ใช้จำนวนสัตว์ทดลองและระยะเวลาการทรมานต่อสัตว์อย่างน้อยที่สุด เมื่อครบระยะเวลาที่กำหนด สัตว์ทดลองเป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์ หนูจะถูกสุ่มแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่

กลุ่มควบคุมที่ถูกทำให้มีแผล ขนาดของแผล  $1\times 1$  ซม. ที่แนวกระดูกสันหลังของสัตว์ทดลองจำนวน 2 บริเวณ โดยระยะห่างกัน 2 ซม. และได้รับยาลดปวดร่วมกับแผ่นไฮโดรเจลมาตรฐาน

กลุ่มที่ถูกทำให้มีแผลและได้รับยาลดปวดร่วมกับเจลตินไฮโดรเจลนาโนคอมโพสิตกับอนุภาคเงินนาโนที่ห่อหุ้มด้วยสารแอนโดรกราโฟไลด์จากสารสกัดสมุนไพรฟ้าทะลายโจร

ขั้นตอนการผ่าตัดดำเนินการภายใต้การดูแลและกำกับโดยสัตวแพทย์และสัตวบาลของศูนย์สัตว์ทดลอง มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ (Bhubhanil et al., 2021) หลังจากการผ่าตัด หนูทุกตัวถูกทำความสะอาดแผลด้วย 0.9% normal saline ร่วมกับทาเจลตินไฮโดรเจลอนุภาคเงินที่ห่อหุ้มสารแอนโดรกราโฟไลด์จากฟ้าทะลายโจรความเข้มข้นที่เป็นพิษต่ำและมีความปลอดภัยต่อเซลล์ผิวหนังเพาะเลี้ยง และถูกประเมินลักษณะและอัตราการซ่อมแซมของแผลทุกวัน โดยทำการเก็บตัวอย่างผิวหนัง 5 ช่วงเวลา (วันที่ 3, 7, 14, 21 และ 28) ช่วงเวลาละ 6 ตัว รวมทั้งหมด 30 ตัว แล้วคำนวณร้อยละของการหายของบาดแผล เพื่อศึกษาความสามารถของเจลตินไฮโดรเจลนาโนคอมโพสิตอนุภาคเงินนาโนที่ห่อหุ้มด้วยสารแอนโดรกราโฟไลด์จากสารสกัดฟ้าทะลายโจรในการสมานแผล จากสมการดังนี้

$$\text{ร้อยละของการหายของบาดแผล} = \frac{\text{ขนาดของบาดแผลวันผ่าตัด} - \text{ขนาดของบาดแผลหลังจากทายา}}{\text{ขนาดของบาดแผลวันผ่าตัด}}$$

ทั้งนี้หนูทำให้ตายอย่างสงบด้วยยาสลบที่เกินขนาด แล้วทำการเก็บเนื้อเยื่อรอบแผลและแผลเพื่อนำไปวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างระดับจุลภาคด้วยการย้อมสีเนื้อเยื่อและปริมาณยีนส่งเสริมการสมานแผล (Bhubhanil et al., 2021)

#### **การศึกษาจุลพยาธิวิทยาของการสมานแผล**

ตัวอย่างอย่างถูกตรึงสภาพเนื้อเยื่อในสารละลาย 10% PFA และนำเนื้อเยื่อที่ผ่านการดิ่งน้ำออกจากเซลล์แล้วทำให้แข็งด้วยเครื่องฝังเนื้อเยื่อ (embedding center) และลงในบล็อกพลาสติก ซึ่งตรึงสภาพเนื้อเยื่อในพาราฟิน ถัดมาเนื้อเยื่อถูกนำมาตัดด้วยเครื่องตัดชิ้นเนื้อ microtome (Leica Biosystems) ให้มีความหนาประมาณ 5 ไมโครเมตร แล้วนำมาย้อมสี Hematoxylin and eosin (H&E) เพื่อศึกษาโครงสร้างของเซลล์และเนื้อเยื่อ ซึ่งสี Hematoxylin มีน้ำเงินอมม่วงย้อมติดนิวเคลียสของเซลล์และสี Eosin มีสีแดงอมส้มย้อมติดไซโตพลาสซึม อีกทั้งทำการย้อมสี Masson's trichrome เพื่อตรวจหาเส้นใยคอลลาเจนในเนื้อเยื่อ โดยสีแดงย้อมติดไซโตพลาสซึม สีฟ้าหรือเขียวอ่อนย้อมติดเนื้อเยื่อเกี่ยวพันและสีดำย้อมติดนิวเคลียสจามลำดับ แผ่นสไลด์ที่ย้อมสีแล้วปิดด้วยน้ำยา Permount และกระจกปิดสไลด์ (Fisher Chemical™) การศึกษาลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาของการสมานแผลด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบแสง ได้แก่ เซลล์เหนียวนำการอักเสบ ได้แก่ mononuclear cell และ polymorphonuclear leucocytes, เซลล์สร้างเส้นใย (fibroblast), เส้นใยคอลลาเจน (collagen), เซลล์หลอดเลือดใหม่ (angiogenesis) และการสร้างใหม่ของหนังกำพริบ (re-epithelialization) (Bhubhanil et al., 2021)

#### **การศึกษาปริมาณยีนส่งเสริมการสมานแผล**

ตัวอย่างแผลและผิวหนังบริเวณแผลถูกนำมาแยก messenger RNA (mRNA) ด้วยชุดน้ำยาลำเร็จรูปใช้สำหรับสกัด DNA (DNA extraction kit) จากนั้นทำการวัดความเข้มข้นของ total RNA ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Nanodrop Spectrophotometer) รุ่น NanoDrop2000 และทำการศึกษาปริมาณ mRNA ด้วยวิธี Real-time PCR (quantitative method) แล้วทำการศึกษาปริมาณยีนที่สนใจ ได้แก่ Collagen 1, Collagen 3, EGF, MMP1, TGF- $\beta$ 1, และ VEGF ซึ่งยีน beta actin เป็นตัวควบคุมภายในเพื่อนำมาเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของยีนที่ควบคุมและส่งเสริมการสมานแผลในการศึกษาครั้งนี้ ดังที่แสดงในตารางที่ 3.1 (Bhubhanil et al., 2021)

**ตารางที่ 3.1** รายการไพรเมอร์ยีนควบคุมและส่งเสริมการสมานแผล

Gene	Primer sequence	Melting temperature
$\beta$ -actin	Forward: 5'-CCCTGGCTCCTAGCACCAT-3' Reverse: 5'-GATAGAGCCACCAATCCACACA-3'	60°C
Collagen 1	Forward: 5'-CATGTTTCAGCTTTGTGGACCT-3' Reverse: 5'-GCAGCTGACTTCAGGGATGT-3'	60°C
Collagen 3	Forward: 5'-GGGATCCAATGAGGGAGAAT-3' Reverse: 5'-CCTTGCCTGTTTGTATATT-3'	60°C
EGF	Forward: 5'-CTCAGGCCTCTGACTCCGAA-3' Reverse: 5'-ATGCCGACGAGTCTGAGTTG-3'	60°C
MMP1	Forward: 5'-CCGGCAGAAATGTGGAAACAG-3' Reverse: 5'-GCTGCATTTGCCTCAGCTTT-3'	55°C
TGF- $\beta$ 1	Forward: 5'-GGGCTACCATGCCAACTTCTG-3' Reverse: 5'-GAGGGCAAGGACCTTGCTGTA-3'	60°C
VEGF	Forward: 5'-GTACCTCCACCATGCCAAGT-3' Reverse: 5'-AATAGCTGCGCTGGTAGACG-3'	55°C

EGF: Epidermal growth factor; MMP1: Matrix metalloproteinase 1; TGF- $\beta$ 1: Transforming growth factor beta 1;

VEGF: Vascular endothelial growth factor

### การศึกษาความระคายเคืองผิวหนัง

การทดสอบการระคายเคืองเบื้องต้นต่อผิวหนังสัตว์ทดลองดำเนินการตามมาตรฐานที่กำหนดใน OECD guideline กระดาษพันธุนิวซีแลนด์ไวท์ จากบริษัท โนมูระสยามอินเตอร์เนชั่นแนล จำกัด จำนวน 3 ตัว โดยก่อนการทดสอบอย่างน้อย 24 ชั่วโมง กระดาษถูกโกนขนบริเวณส่วนหลังตั้งแต่สะบักลงมาทั้งสองข้าง ตามแนวนานกับกระดูกสันหลัง โดยกระดาษที่นำมาทดลองต้องมีผิวหนังปกติ ไม่มีรอยแผลก่อนทำการศึกษา แล้วทำการทาเจลลาตินไฮโดรเจลอนุภาคเงินที่ห่อหุ้มสารแอนโดรกราโฟไลด์ ปริมาณ 5-10 มิลลิกรัม และปิดด้วยพลาสติกใสปิดแผลเพื่อยึดเพื่อป้องกันการเลื่อน เมื่อครบ 4 ชั่วโมง พื้นที่ผิวหนังที่ทำการทดสอบแล้วเช็ดไฮโดรเจลด้วยน้ำกลั่น และสังเกตความผิดปกติบริเวณที่ปิดแผ่นทดสอบ ที่เวลา 1, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง โดยบันทึกผลที่ได้และให้คะแนนตามเกณฑ์การให้คะแนนการระคายเคืองต่อไป เมื่อครบแล้วนำไปคำนวณหาดัชนีการระคายเคืองเบื้องต้น (Primary irritation index, PII) โดยหลักเกณฑ์การให้คะแนนและการอ่านผลจากความแดงของผิวหนัง (erythema and eschar formation) และการบวม (edema formation) ดังที่แสดงในตารางที่ 3.2

### ตารางที่ 3.2 การให้คะแนนความแดงและการบวมของผิวหนัง

ความแดงและชั้นเนื้อตาย	คะแนน
ไม่พบผื่นแดง	0
พบผื่นแดงเล็กน้อย	1
พบผื่นแดงชัดเจน	2
พบผื่นแดงปานกลาง	3
พบผื่นแดงรุนแรงถึงมีชั้นเนื้อตายของผิวหนัง	4
<b>การบวม</b>	
ไม่พบการบวม	0
พบการบวมเล็กน้อย	1
พบการบวมที่มองเห็นขอบเขตชัดเจน	2
พบการบวมปานกลาง สูงขึ้นประมาณ 1 มิลลิเมตร	3
พบการบวมรุนแรง ขอบสูงกว่า 1 มิลลิเมตร และลามไปทั่วบริเวณที่สัมผัสตัวอย่าง	4

คะแนนการระคายเคืองเบื้องต้น (Primary irritation score, PIS)

PIS บริเวณทดสอบ =  $\frac{\text{ผลรวมคะแนนความแดงและการบวมบริเวณทดสอบ}}{\text{จำนวนจุดที่สังเกต}}$

PIS บริเวณควบคุม =  $\frac{\text{ผลรวมคะแนนความแดงและการบวมบริเวณควบคุม}}{\text{จำนวนจุดที่สังเกต}}$

PIS ของกระต่ายแต่ละตัว = PIS บริเวณทดสอบ - PIS บริเวณควบคุม

เมื่อได้ค่าดัชนีความระคายเคืองเบื้องต้น (PIS) ของกระต่ายแต่ละตัวแล้ว นำคะแนน PIS มาคำนวณ

ค่าดัชนีความระคายเคืองเบื้องต้น (Primary Irritation Index, PII) ดังนี้

ค่าดัชนีความระคายเคืองเบื้องต้น (PII) ต่อผิวหนัง =  $\frac{\text{ผลรวมคะแนน PIS ของกระต่ายทั้ง 3 ตัว}}{3}$

3

แล้วนำค่า PII ที่ได้มาสรุปเพื่อรายงานต่อไปตามเกณฑ์ตารางที่ 3.3 และ 3.4



**ตาราง 3.3** คัดนิการระคายเคืองตามเกณฑ์เครื่องมือแพทย์

ความแดงและชั้นเนื้อตาย	ระดับความระคายเคือง
0.0- 0.4	ไม่ระคายเคือง
0.5-1.9	ระคายเคืองเล็กน้อย
2.0-4.9	ระคายเคืองปานกลาง
5.0-8.0	ระคายเคืองรุนแรง

**ตาราง 3.4** คัดนิการระคายเคืองตามเกณฑ์เครื่องสำอางและวัตถุอันตราย

ความแดงและชั้นเนื้อตาย	ระดับความระคายเคือง
0.0 – 1.0	ไม่ระคายเคือง
มากกว่า 1.0 – 2.0	ระคายเคืองเล็กน้อย
มากกว่า 2.0 – 5.0	ระคายเคืองปานกลาง
มากกว่า 5.0 – 8.0	ระคายเคืองรุนแรง

#### การรับรองจริยธรรมการวิจัยในสัตว์ทดลอง

การศึกษาในสัตว์ทดลองงานทุกขั้นตอน ได้รับการพิจารณาและขอรับรองจาก คณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและใช้สัตว์ทดลอง มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ และดำเนินการเลี้ยง และดำเนินการเลี้ยงตามมาตรฐานระดับสากล ณ ศูนย์สัตว์ทดลอง มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต จังหวัดปทุมธานี (Protocol number: 01/2023)

#### การวิเคราะห์ทางสถิติ

ผลของการศึกษาแสดงในรูปค่าเฉลี่ยและค่าคลาดเคลื่อนมาตรฐานของการวัด (Mean±SEM) สำหรับการเปรียบเทียบระหว่าง 2 ข้อมูล ใช้วิธี unpaired student's t-test และข้อมูล ตั้งแต่ 3 กลุ่มด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-way ANOVA) กำหนดให้ค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติน้อยกว่า 0.05 (P<0.05) การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติทั้งหมดใช้โปรแกรม GraphPad Prism 8.0

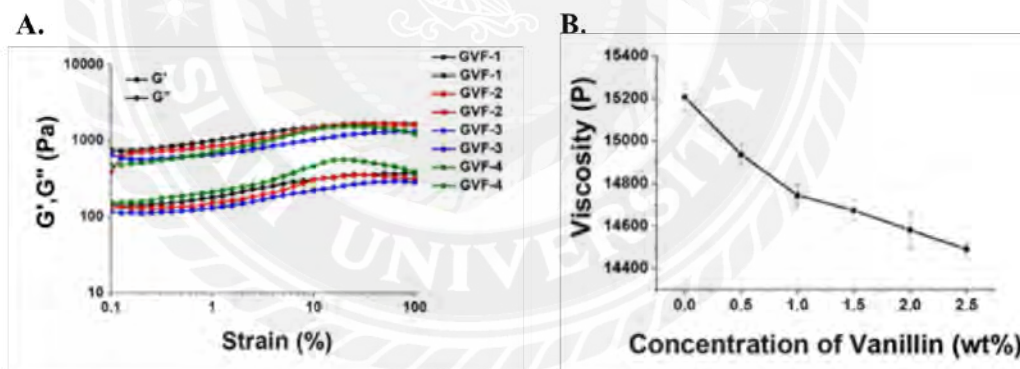
## บทที่ 4

### ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

การศึกษาตอนที่ 1 เพื่อสังเคราะห์และพิสูจน์เอกลักษณ์ของไฮโดรเจลที่สามารถซ่อมแซมตนเองที่มีอนุภาคเงินนาโนที่ห่อหุ้มด้วยสารแอนโดรกราไฟไลด์จากสารสกัดฟ้าทะลายโจร

#### 4.1 ผลการสังเคราะห์และเอกลักษณ์ของเจลาคตินไฮโดรเจลที่มีอนุภาคเงินนาโนและห่อหุ้มด้วยสารแอนโดรกราไฟไลด์จากสารสกัดฟ้าทะลายโจร

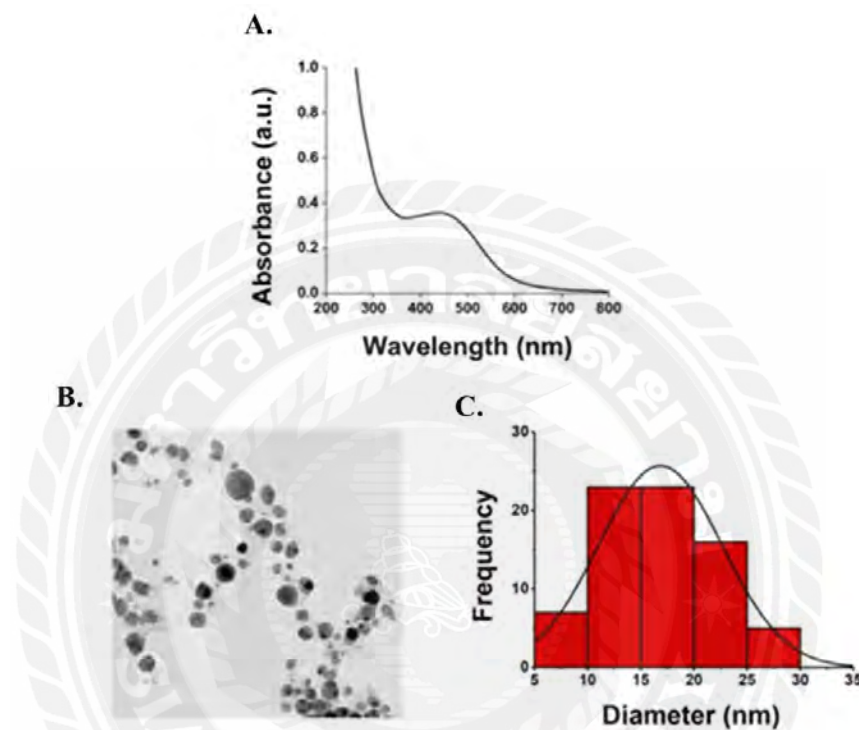
ผลการสังเคราะห์และเอกลักษณ์ของเจลาคตินไฮโดรเจล (GVF) พบว่า ค่าโมดูลัสในการจัดเก็บ (storage modulus,  $G'$ ) มากกว่าโมดูลัสการสูญเสีย (loss modulus,  $G''$ ) ซึ่งบ่งชี้ว่า ไฮโดรเจล GVF สูตรนี้มีความแข็งแรง การเชื่อมประสานเป็นเนื้อเดียวกัน และมีความคงรูปร่าง อีกทั้งไฮโดรเจลที่สังเคราะห์ได้มีความแข็งแรงและมีความเสถียร (ภาพที่ 4.1A) นอกจากนี้ไฮโดรเจล GVF มีความหนืดตามฟังก์ชันของอัตราการเจือที่ต่ำ ดังที่แสดงในภาพที่ 4.1B



ภาพที่ 4.1 ค่าโมดูลัสและความหนืดของเจลาคตินไฮโดรเจลผสมเงินนาโนที่ห่อหุ้มแอนโดรกราไฟไลด์

นอกจากนี้ ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและขนาดของการคอมพอสิตอนุภาคเงินนาโนที่ห่อหุ้มสารแอนโดรกราไฟไลด์กับไฮโดรเจล GVF พบว่า ความเข้มข้นของสารแอนโดรกราไฟไลด์ 0.44 mM ถูกล้อมรอบด้วยอนุภาคเงินนาโนได้อย่างเสถียร โดยลักษณะของอนุภาคเงินนาโนที่ล้อมรอบด้วยแอนโดรกราไฟไลด์ (Andro-AgNPs) มีขนาด 441 nm ทั้งนี้อนุภาคนาโนเชิงประกอบมีการกระจายขนาดที่แคบและมีรูปร่างทรงกลม โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางอยู่ในช่วง  $17.82 \pm 5.95$  nm ค่าความเสถียรของคอลลอยด์สูง (zeta potential value =  $-20.6 \pm 0.98$  mV) เส้นผ่านศูนย์กลางของ

อนุภาคเฉลี่ย  $93.12 \pm 3.76$  nm โดยมีดัชนีการกระจายตัวหลายจุด (polydispersity index, PDI) เท่ากับ 0.36 บ่งชี้ความสามารถในการกระจายตัวหรือไฮดรอสันสเฟียร์ในสารละลายที่เป็นน้ำได้ดีตามลำดับ (ภาพที่ 4.2)



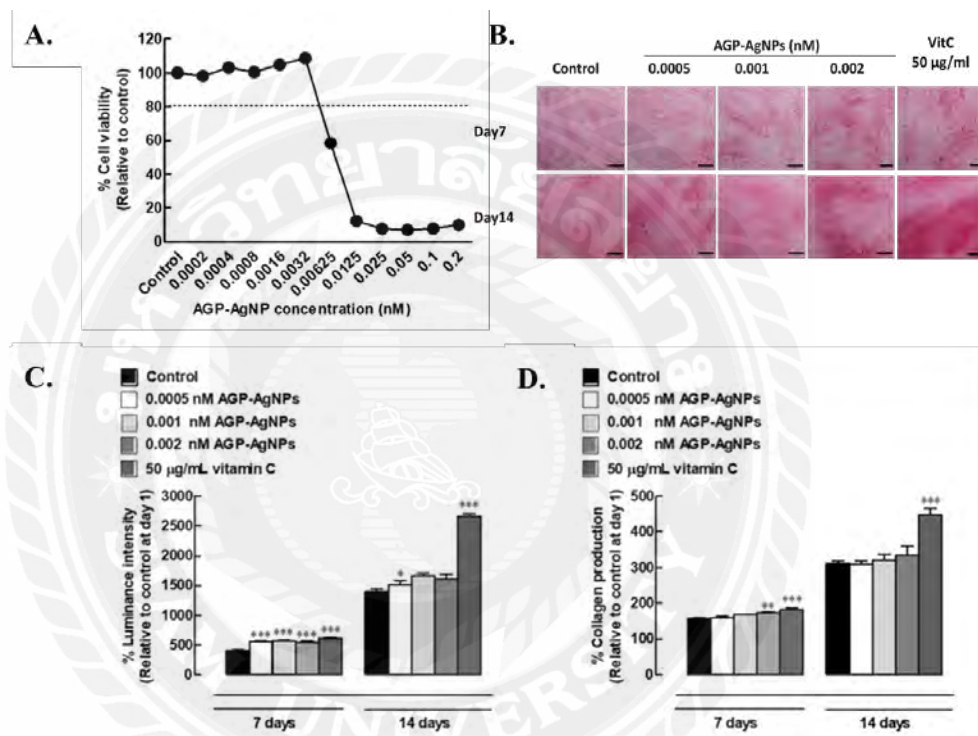
ภาพที่ 4.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและขนาดของเจลาตินไฮโดรเจลผสมเงินนาโนที่ห่อหุ้มแอนโดรกราโฟไลต์ด้วยเครื่อง UV-VIS Spectrophotometer และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

การศึกษาตอนที่ 2 เพื่อศึกษาประสิทธิภาพอนุภาคเงินนาโนที่ห่อหุ้มสารแอนโดรกราโฟไลต์ต่อความเป็นพิษการสมานแผลในเซลล์ผิวหนังและฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียในจานเพาะเลี้ยง

#### 4.2 ผลของอนุภาคเงินนาโนที่ห่อหุ้มสารแอนโดรกราโฟไลต์ต่อความเป็นพิษ การสมานแผลในเซลล์ผิวหนังและฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียในจานเพาะเลี้ยง

อนุภาคเงินนาโนที่ห่อหุ้มสารแอนโดรกราโฟไลต์ (AGP-AgNPs) ความเข้มข้น 0.032-0.05 nM มีความเป็นพิษต่ำ โดยเซลล์ผิวหนังเพาะเลี้ยงยังคงรอดชีวิตมากกว่าร้อยละ 80 อีกทั้งความสามารถของอนุภาคเงินนาโนในการห่อหุ้มสารแอนโดรกราโฟไลต์ที่ความเข้มข้น 0.044 nM

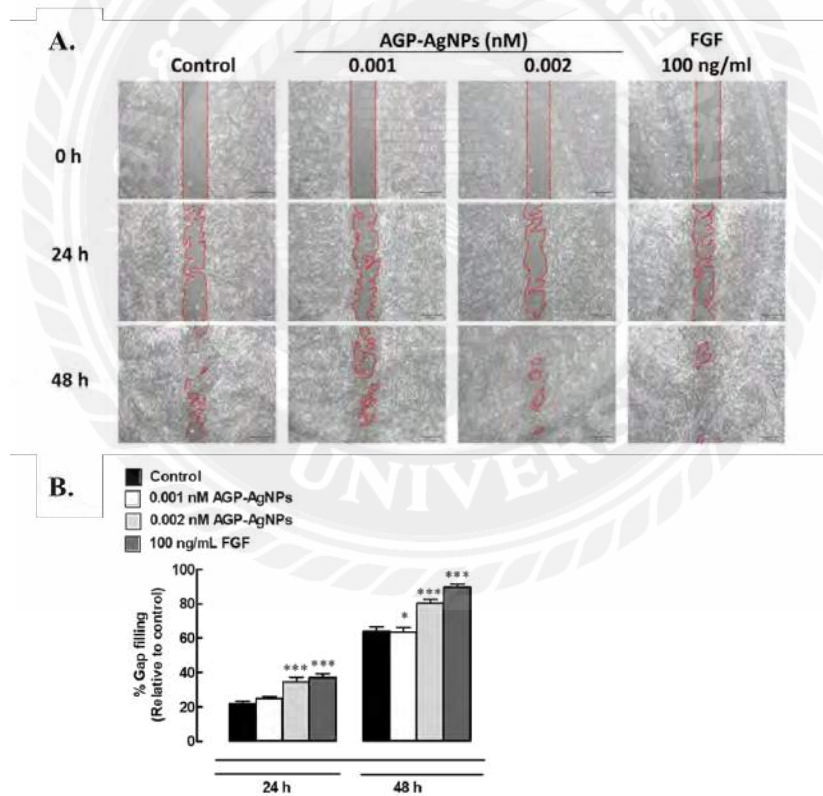
ซึ่งไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ (ภาพที่ 4.3A) ยิ่งไปกว่านั้น ผลการศึกษาการเพิ่มจำนวนเซลล์ การคอลลาเจน และการปิดปากแผลในเซลล์ผิวหนังเพาะเลี้ยง พบว่า หลังจาก 7 วันของบ่มสารอนุภาคเงินนาโนที่ล้อมรอบด้วยแอนโดรกราโฟไลด์ (Andro-AgNPs) ความเข้มข้น 0.0005, 0.001 และ 0.002 nM สามารถเพิ่มจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ( $P < 0.001$ ) ซึ่งมีรูปแบบที่คล้ายคลึงกันกับกลุ่มควบคุมเชิงบวกด้วยการบ่มด้วยวิตามินซี (ascorbic acid)



ภาพที่ 4.3 ผลของอนุภาคเงินนาโนที่ห่อหุ้มสารแอนโดรกราโฟไลด์ต่อความเป็นพิษ การเพิ่มจำนวนเซลล์และการสร้างคอลลาเจนเซลล์ในเนื้อเยื่อผิวหนังเพาะเลี้ยง กำหนดให้ \*  $P < 0.05$ , \*\*\*  $P < 0.001$  เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองในวันที่ 7 และ วันที่ 14

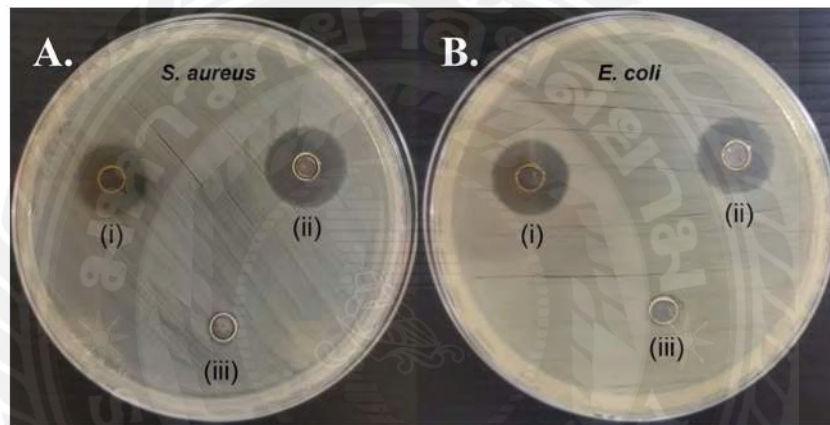
นอกจากนี้ AGP-AgNPs ความเข้มข้น 0.001 nM และวิตามินซีสามารถช่วยเพิ่มการเพิ่มจำนวนเซลล์ ( $P < 0.001$ ) หลังการบ่มเพาะในเซลล์ผิวหนังเพาะเลี้ยง 14 วัน นอกจากนี้ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม พบว่า สาร AGP-AgNPs สามารถเพิ่มปริมาณคอลลาเจน 6%, 24%, 47% และ 152% ตามลำดับ (ภาพที่ 4.3B-C)

ยิ่งไปกว่านั้น AGP-AgNPs สามารถเร่งการปิดรอยแผลเซลล์ผิวหนังเพาะเลี้ยงตามระยะเวลาที่เซลล์ได้สัมผัสกับสารที่นานขึ้น การบ่มสารระยะเวลา 24 ชั่วโมงด้วย AGP-AgNPs ความเข้มข้น 0.001 และ 0.002 nM และไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์ (FGF) ความเข้มข้น 100 ng/mL สามารถเพิ่มขึ้นในการย้ายเซลล์ ( $P < 0.001$ ) เพื่อการปิดรอยแผล 25%, 33% และ 37% ในขณะที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง สามารถส่งเสริมการย้ายเซลล์เพิ่มขึ้น 60%, 82% และ 90% ตามลำดับ ( $P < 0.001$ ) และสิ่งที่น่าสนใจคือ การบ่มสาร AGP-AgNPs ความเข้มข้น 0.001 และ 0.002 nM เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำให้การปิดรอยแผลเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ 1.1 และ 1.5 เท่า ในขณะที่การบ่มสาร AGP-AgNPs ความเข้มข้น 0.002 nM ระยะเวลา 48 ชั่วโมง ทำให้เกิดปิดรอยแผล 1.3 เท่า อีกทั้งความเข้มข้น 0.002 nM AGP-AgNPs สามารถการปิดรอยแผลคล้ายคลึงกับ FGF (ภาพที่ 4.4)



ภาพที่ 4.4 ผลของอนุภาคเงินนาโนที่ห่อหุ้มสารแอนโดรกราโฟไลด์ต่อการปิดรอยแผล กำหนดให้ \*  $P < 0.05$ , \*\*\*  $P < 0.001$  เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองในหลังจาก 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง

เจลาตินไฮโดรเจล GVF/AGP-AgNPs มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย ดังแสดงในภาพที่ 4.5 โดยการทดสอบการแพร่กระจาย พบว่า ไฮโดรเจล GVF/AGP-AgNP จำกัดพื้นที่บริเวณแบคทีเรียทั้งแกรมบวก (*S. aureus*) และแกรมลบ (*E. coli*) ซึ่งโดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง  $12.92 \pm 1.66$  nm และ  $17.00 \pm 0.90$  nm ตามลำดับ นอกจากนี้ สารแอนติไบโอติกจากฟ้าทะลายโจรที่ห่อหุ้มด้วยอนุภาคเงินนาโน ความเข้มข้น 0.0032 nM ทำให้เซลล์ผิวหนังเพาะเลี้ยงยังคงมีค่าร้อยละการมีชีวิตของเซลล์มากกว่าร้อยละ 80 ฉะนั้นความเข้มข้นนี้จึงเป็นมีความปลอดภัยของเซลล์ (0.0008-0.0032 nM) หากเลือกใช้ความเข้มข้นมากกว่านี้จะทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนังได้

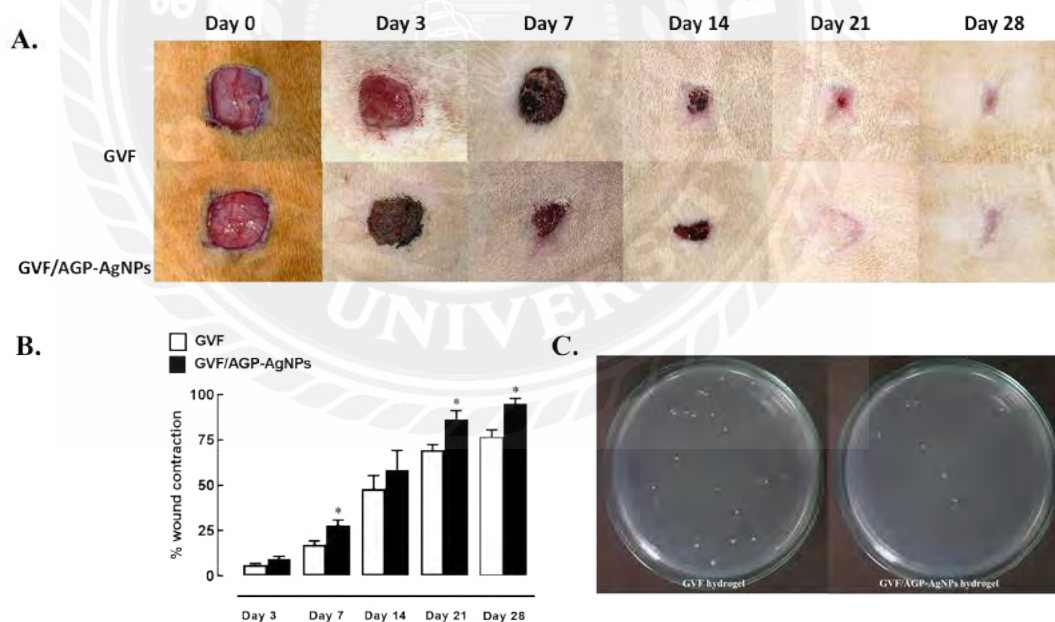


ภาพที่ 4.5 ผลของเจลาตินไฮโดรเจลผสมเงินนาโนที่ห่อหุ้มแอนติไบโอติกต่อการต้านเชื้อแบคทีเรีย เมื่อ (i) GVF/AGP-AgNPs hydrogel, (ii) gentamicin (*S. aureus* และ *E. coli*) และ (iii) น้ำกลั่น ตามลำดับ

การศึกษาตอนที่ 3 เพื่อศึกษาผลการรักษาด้วยคอมพอสิตไฮโดรเจลกับอนุภาคเงินนาโนที่ห่อหุ้มสารแอนโดรกราโฟไลด์ต่อการสมานแผล การเปลี่ยนแปลงพยาธิสรีรวิทยาของการสมานแผลระดับเนื้อเยื่อและระดับอนุชีวโมเลกุล และการระคายเคืองผิวหนังในสัตว์ทดลอง

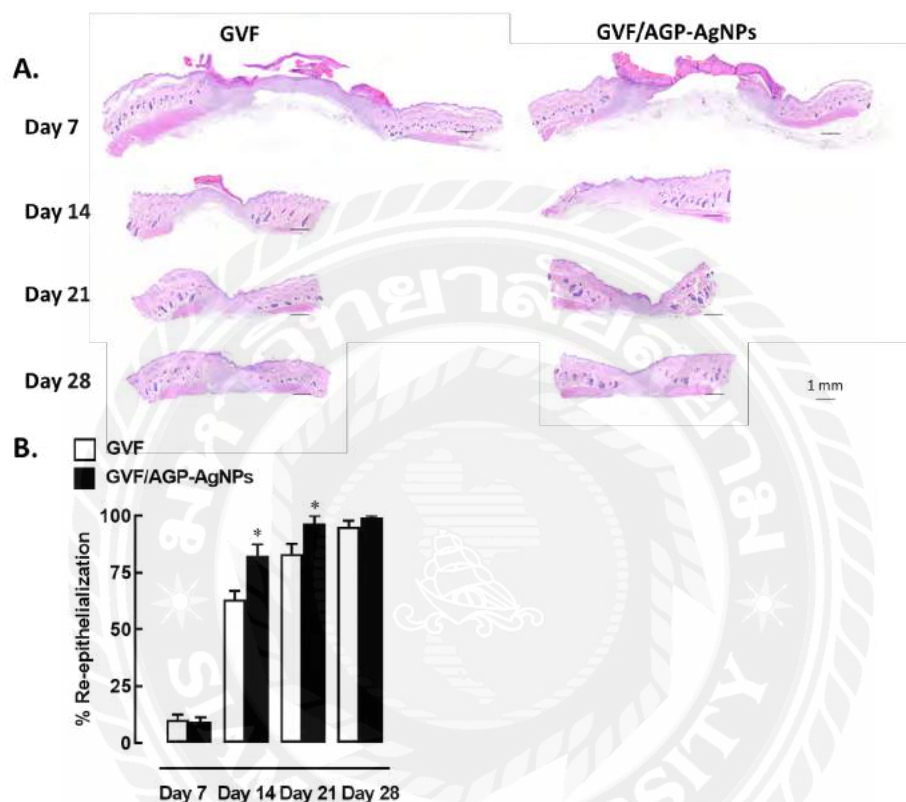
#### 4.3 ผลของเจลาคตินไฮโดรเจลกับอนุภาคเงินนาโนที่ห่อหุ้มสารแอนโดรกราโฟไลด์ต่อการสมานแผล การเปลี่ยนแปลงพยาธิสรีรวิทยาของการสมานแผลระดับเนื้อเยื่อและระดับอนุชีวโมเลกุล และการระคายเคืองผิวหนังในสัตว์ทดลอง

ผลของการรักษาแผลด้วยเจลาคตินไฮโดรเจล GVF/AGP-AgNPs พบว่า อัตราการสมานแผลดีกว่ากลุ่มควบคุมที่ได้รับเจลาคตินไฮโดรเจล GVF (ภาพที่ 4.6A-B) รวมทั้งปริมาณเชื้อแบคทีเรียแผลและบริเวณขอบแผลผ่าตัดที่ผิวหนังสัตว์ทดลองลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (ภาพที่ 4.6C) โดยเจลาคตินไฮโดรเจล GVF/AGP-AgNPs สามารถกระตุ้นให้แผลหายเร็วกว่าไฮโดรเจล GVF โดยร้อยละการสมานของแผลสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในกลุ่มที่ได้รับ GVF/AGP-AgNPs ในวันที่ 7 ( $P=0.02$ ) วันที่ 21 ( $P=0.017$ ) และวันที่ 28 ( $P=0.01$ ) (20% , 17% และ 18.5% ตามลำดับ)



ภาพที่ 4.6 ผลของเจลาคตินไฮโดรเจลผสมเงินนาโนที่ห่อหุ้มสารแอนโดรกราโฟไลด์ต่อการสมานแผล การต้านเชื้อแบคทีเรียบริเวณแผลที่ผิวหนังสัตว์ทดลอง กำหนดให้ \*  $P < 0.05$ , เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง

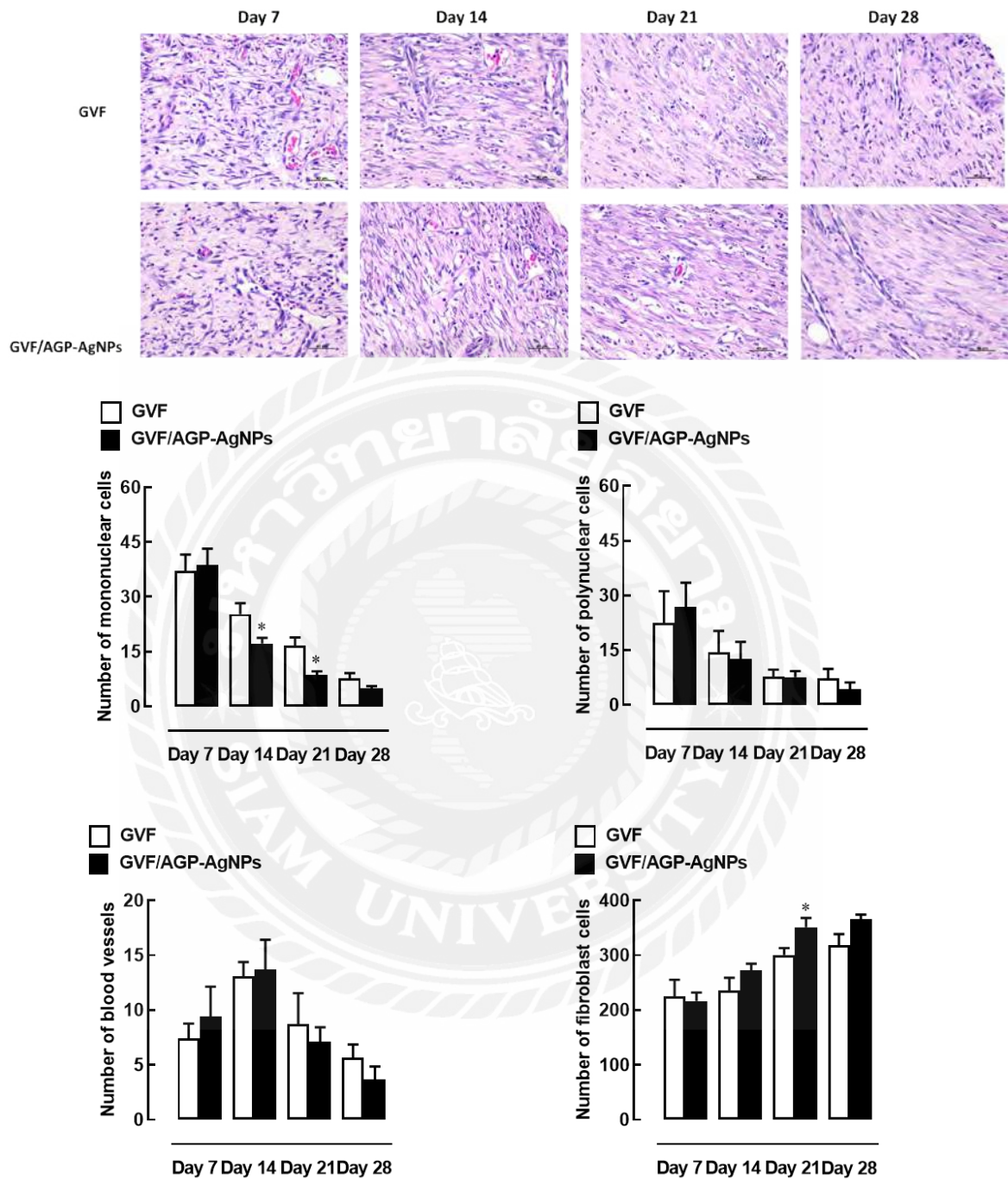
ผลการศึกษการสมานแผลนี้สอดคล้องกับผลการสร้างเยื่อผิวหนังใหม่ในกลุ่มที่ได้รับเจลลาตินไฮโดรเจล GVF/AGP-AgNPs ซึ่งมีการสร้างเยื่อผิวหนังใหม่ได้ดีกว่ากลุ่มควบคุมในวันที่ 14 (82.43%) ( $P=0.019$ ) และวันที่ 21 (96.67%) ( $P=0.037$ ) ตามลำดับ (ภาพที่ 4.7) ทั้งนี้ไม่พบความแตกต่างของการสร้างเยื่อผิวหนังใหม่ในวันที่ 28 วันของการทาเจลลาตินไฮโดรเจล



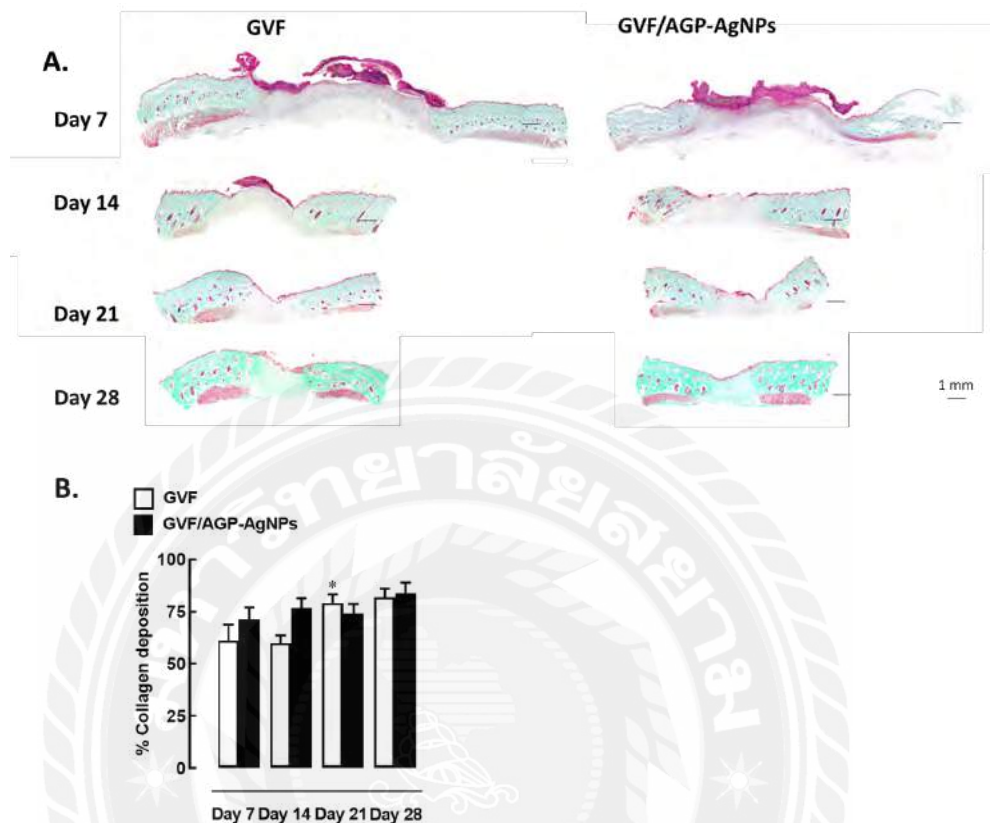
ภาพที่ 4.7 ผลของเจลลาตินไฮโดรเจลผสมเงินนาโนที่ห่อหุ้มแอนโดรกราโฟไลด์ต่อการสร้างเยื่อผิวหนังใหม่ที่ผิวหนังสัตว์ทดลองกำหนดให้ \*  $P < 0.05$ , เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง

นอกจากนี้ ผลการวิเคราะห์ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของการสมานแผลที่ผิวหนังของสัตว์ทดลองที่ได้รับเจลลาตินไฮโดรเจล GVF/AGP-AgNPs พบว่า เจลลาตินไฮโดรเจล GVF/AGP-AgNPs สามารถลดจำนวนเซลล์เหนียวนำการอักเสบ (mononuclear leucocytes) ในวันที่ 7 ( $P=0.038$ ) และวันที่ 21 ( $P=0.016$ ) รวมทั้งเพิ่มปริมาณเซลล์สร้างเส้นใย (fibroblast) ในวันที่ 21 ( $P=0.036$ ) ดังแสดงในภาพที่ 4.8 ยิ่งไปกว่านั้น เจลลาตินไฮโดรเจล GVF/AGP-AgNPs สามารถเพิ่มปริมาณเส้นใยคอลลาเจน (collagen) ได้มากกว่าไฮโดรเจลควบคุมในวันที่ 14 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพที่ 4.9)



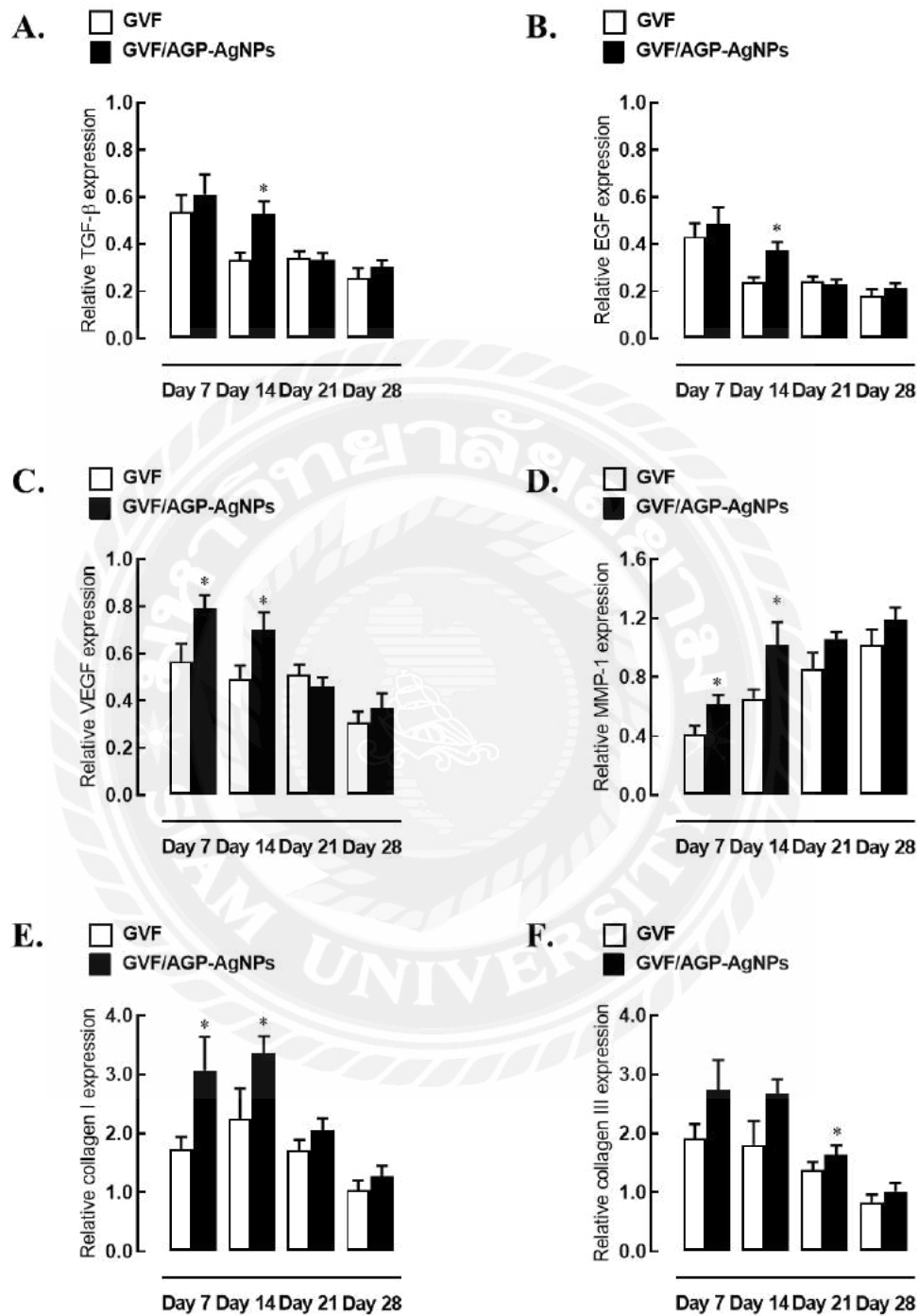


ภาพที่ 4.8 ผลของเจลาตินไฮโดรเจลผสมเงินนาโนที่ห่อหุ้มแอนโดรกราโฟไลด์ต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างผิวหนังระดับจุลภาคของสัตว์ทดลอง



ภาพที่ 4.9 ผลของเจลาคินไฮโดรเจลผสมเงินนาโนที่ห่อหุ้มแอนโดรกราโฟไลด์ต่อการสังเคราะห์คอลลาเจนที่ผิวหนังสัตว์ทดลอง กำหนดให้ \*  $P < 0.05$ , เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง

การศึกษาครั้งนี้ได้วิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงปริมาณยีนส่งเสริมการสมานแผลระดับ mRNA ได้แก่ transforming growth factor  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ ), epidermal growth factor (EGF), และ vascular endothelial growth factor (VEGF), matrix metalloproteinase 1 (MMP1), collagen I และ collagen III ด้วยเทคนิค RT-qPCR ดังแสดงในภาพที่ 4.10 ผลการศึกษา พบว่า หลังจากรักษาแผลด้วยเจลาคินไฮโดรเจล GVF/AGP-AgNPs สามารถเร่งการสมานแผลโดยเพิ่มปริมาณยีน VEGF ( $P=0.024$ ), MMP1 ( $P=0.026$ ) และ collagen I ( $P=0.029$ ) ในวันที่ 7 ขณะที่วันที่ 14 มีปริมาณยีน TGF- $\beta$  ( $P=0.006$ ), EGF ( $P=0.007$ ), VEGF ( $P=0.028$ ), MMP1 ( $P=0.034$ ) และ collagen I ( $P=0.049$ ) เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ การแสดงออกของปริมาณยีน collagen III เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในวันที่ 21 วัน ( $P=0.049$ ) ดังแสดงในภาพที่ 4.10



ภาพที่ 4.10 ผลของเจลาตินไฮโดรเจลผสมเงินนาโนที่ห่อหุ้มแอนโดรกราโฟไลด์ต่อปริมาณอินควมคุมและส่งเสริมการสมานแผล กำหนดให้ \*  $P < 0.05$ , เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง

ผลจากการสังเกตความผิดปกติบริเวณที่ทำการปิดเจลาคตินไฮโดรเจล GVF/AGP-AgNPs ที่ผิวหนังกระต่ายจำนวน 3 ตัว ที่เวลา 3 นาที, 1, 4, 24, 48 และ 72 ชั่วโมงหลังจากการสัมผัส จากนั้นติดตามผลการระคายเคืองในวันที่ 14 โดยพิจารณาความแดง ชั้นเนื้อตาย และการบวม ผลการประเมินความระคายเคืองของเจลาคตินไฮโดรเจล GVF/AGP-AgNPs พบว่า คะแนนการระคายเคืองรวม 13 คะแนน และดัชนีการระคายเคืองเท่ากับ 0.62 ซึ่งประเมินระดับการระคายเคืองผิวหนังด้วยเกณฑ์ความระคายเคืองจากเครื่องมือแพทย์ พบว่า เจลาคตินไฮโดรเจล GVF/AGP-AgNPs มีความระคายเคืองต่อผิวหนังสัตว์ทดลองเล็กน้อย ขณะที่เกณฑ์ความระคายเคืองจากเครื่องสำอางและวัตถุอันตรายระบุว่า เจลาคตินไฮโดรเจล GVF/AGP-AgNPs ไม่มีความระคายเคืองผิวหนัง ตามลำดับ (ตารางที่ 4.1)

**ตารางที่ 4.1** ผลของเจลาคตินไฮโดรเจลผสมเงินนาโนที่ห่อหุ้มแอนโดรกราโฟไลต์ต่อการระคายเคืองผิวหนังของกระต่าย

ระยะเวลา	ลำดับ กระต่าย	คะแนนการระคายเคือง		
		ความแดงและชั้นเนื้อตาย	การบวม	คะแนนรวม
3 นาที	1	1	0	1
	2	1	0	1
	3	1	0	1
1 ชั่วโมง	1	1	0	1
	2	1	0	1
	3	1	0	1
4 ชั่วโมง	1	1	0	1
	2	1	0	1
	3	1	0	1
24 ชั่วโมง	1	1	0	1
	2	1	0	1
	3	0	0	0
48 ชั่วโมง	1	1	0	1
	2	1	0	1
	3	0	0	0
72 ชั่วโมง	1	0	0	0
	2	0	0	0
	3	0	0	0
<b>คะแนนรวมของการระคายเคือง</b>				<b>13</b>
<b>ดัชนีการระคายเคือง</b>				<b>0.62</b>

## บทที่ 5

### สรุปผล อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

#### 5.1 สรุปผลการวิจัย

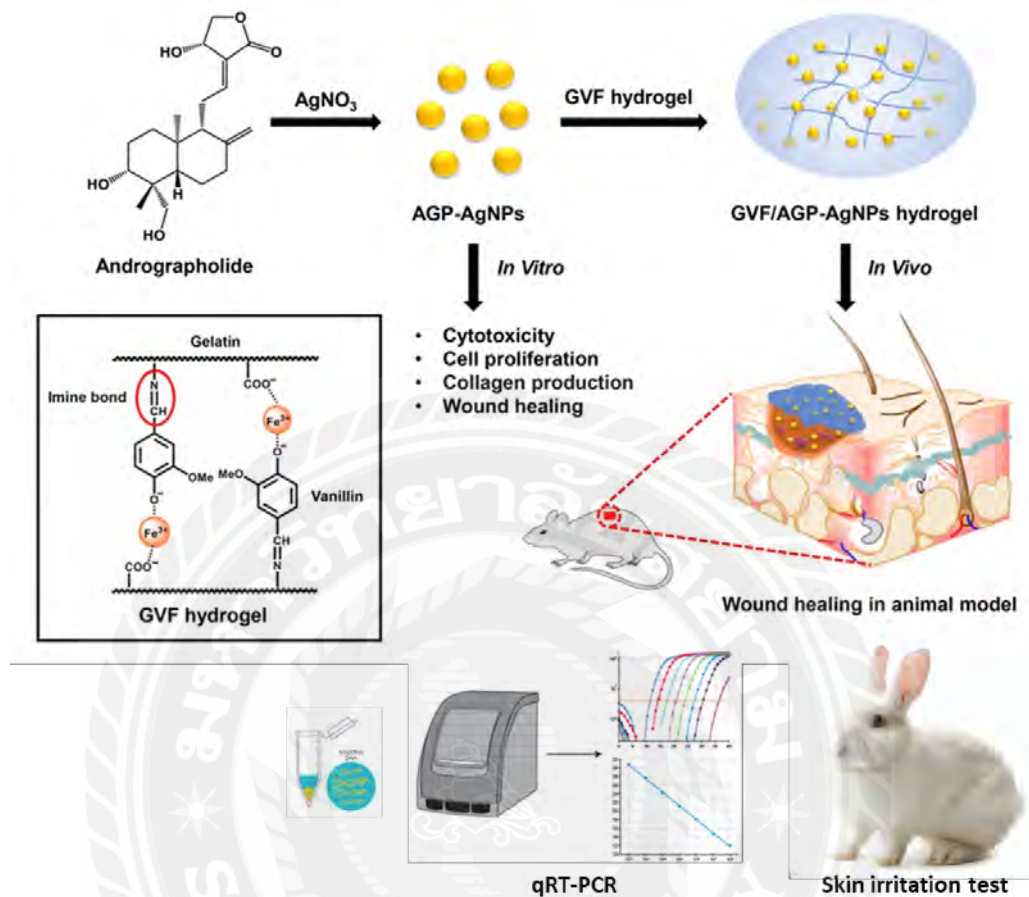
งานวิจัยนี้มีขั้นตอนของการศึกษาดังแสดงในภาพที่ 5.1 โดยแบ่งการศึกษาออกเป็น 3 ส่วน ประกอบด้วย การสังเคราะห์และเอกลักษณ์ของไฮโดรเจลที่สามารถซ่อมแซมตนเองที่มีอนุภาคเงินนาโนที่ห่อหุ้มด้วยสารแอนโดรกราโฟไลด์จากสารสกัดฟ้าทะลายโจร (GVF/AGP-AgNPs) โดยทำการสังเคราะห์จากเครือข่ายวิจัยและนักวิจัยร่วม ศศ.ดร.ศิรินันท์ กุลชาติ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น และการศึกษาความเป็นพิษ การสมานแผลในเซลล์ผิวหนัง และฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียในจานเพาะเลี้ยงของอนุภาคเงินนาโนที่ห่อหุ้มสารแอนโดรกราโฟไลด์ ซึ่งดำเนินการวิจัยโดยมีนักวิจัยอาวุโส ดร.มัตถกา คงขาว ศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ และการศึกษาผลของเจลลาตินไฮโดรเจลกับอนุภาคเงินนาโนที่ห่อหุ้มสารแอนโดรกราโฟไลด์ต่อการสมานแผล การเปลี่ยนแปลงพยาธิสรีรวิทยาของการสมานแผลระดับเนื้อเยื่อและระดับอนุชีวโมเลกุล และการระคายเคืองผิวหนังในสัตว์ทดลองได้ ดำเนินการวิจัยที่ศูนย์สัตว์ทดลอง มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์, คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล, คณะแพทยศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสยาม ผลการศึกษาพบว่า

5.1.1 เจลลาตินไฮโดรเจล GVF/AGP-AgNPs มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพสามารถห่อหุ้มและเข้ากันได้ดีกับอนุภาคเงินและสารแอนโดรกราโฟไลด์ ซึ่งสามารถนำไปใช้ทางการแพทย์ได้

5.1.2 อนุภาคเงินนาโนที่ห่อหุ้มสารแอนโดรกราโฟไลด์มีความเป็นพิษต่ำและสามารถเพิ่มจำนวนเซลล์ ปริมาณคอลลาเจน การปิดรอยแผล และการสมานแผลในเซลล์เนื้อเยื่อผิวหนังมนุษย์เพาะเลี้ยง

5.1.3 เจลลาตินไฮโดรเจล GVF/AGP-AgNPs สามารถลดจำนวนเชื้อแบคทีเรีย ยับยั้งการอักเสบ เร่งอัตราการสมานแผลด้วยการเพิ่มปริมาณอินซูลินส่งเสริม ได้แก่ อิน VEGF, MMP1 และ collagen I ในช่วงอักเสบและ อิน TGF- $\beta$ , EGF, VEGF, MMP1 และ collagen I ในช่วงซ่อมแซมและอิน collagen III ในช่วงการปรับรูปร่าง วัน ตามลำดับ

5.1.4 เจลลาตินไฮโดรเจล GVF/AGP-AgNPs มีความระคายเคืองผิวหนังเล็กน้อยตามเกณฑ์เครื่องมือทางการแพทย์และไม่มีความระคายเคืองเล็กน้อยตามเกณฑ์เครื่องมือเครื่องสำอางและวัตถุอันตราย



ภาพที่ 5.1 สรุปขั้นตอนการวิจัย

## 5.2. อภิปรายผล

ฟ้าทะลายโจร (*Andrographis paniculata* (Burm.f.) Nees) ในวงศ์ Acanthaceae เป็นสมุนไพรท้องถิ่นในประเทศแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ที่นำมาถูกใช้กันอย่างแพร่หลาย ซึ่งมีสรรพคุณบรรเทาอาการของโรคหวัด การอักเสบและการติดเชื้อ (Hossain et al., 2014) ประเทศไทยได้บรรจุฟ้าทะลายโจรอยู่ในบัญชียาหลักแห่งชาติ พ.ศ. 2542 มีสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ทางยาสมุนไพรของฟ้าทะลายโจร คือ สารแอนโดรกราโฟไลด์ ซึ่งสารนี้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและช่วยกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันในร่างกาย (Li et al., 2022; Messire et al., 2023) รวมถึงมีประสิทธิภาพในการลดการอักเสบด้วยการลดปริมาณสารชักนำการอักเสบในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง (Tzeng et al., 2012) อย่างไรก็ตามยังมีการศึกษาเกี่ยวกับผลของสารแอนโดรกราโฟไลด์จากฟ้าทะลายโจรต่อการลดการอักเสบเชิงระบบและบาดแผลในสัตว์ทดลองหรือในคนไม่มากนัก นอกจากนี้สารแอน-

โดรกราโฟไลด์จากฟ้าทะลายโจรมีความสามารถในการละลายน้ำได้น้อยและทนทานต่อสภาพแวดล้อมต่ำจึงทำให้ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาไม่ดีเท่าที่ควร (Loureiro Damasceno et al., 2022) ฉะนั้นการพัฒนา นวัตกรรมไฮโดรเจลเป็นวิธีการใหม่ที่ห่อหุ้มสารสารแอนโดรกราโฟไลด์จากฟ้าทะลายโจรเพื่อส่งเสริมการสมานแผลและลดผลการอักเสบจึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจ

การศึกษาครั้งนี้ได้พัฒนาสูตรไฮโดรเจลจากเจลาตินและวานิลลิน (vanillin) พอลิเมอร์ชีวภาพผสมกับสารแอนโดรกราโฟไลด์จากสารสกัดฟ้าทะลายโจรที่ห่อหุ้มด้วยอนุภาคเงิน (GVF/AGP-AgNPs) ผลการศึกษาของการสังเคราะห์ การพิสูจน์เอกลักษณ์ ความเป็นพิษ การสมานแผลในเซลล์ผิวหนังเพาะเลี้ยง การต้านเชื้อแบคทีเรีย อัตราการสมานแผล การเปลี่ยนแปลงพยาธิสรีรวิทยาของการสมานแผลระดับเนื้อเยื่อและระดับอนุชีวโมเลกุล และการระคายเคืองผิวหนังในสัตว์ทดลองสามารถอภิปรายผลดังนี้

### 5.2.1 เอกลักษณ์และคุณสมบัติของเจลาตินไฮโดรเจลอนุภาคเงินนาโนที่ห่อหุ้มด้วยสารแอนโดรกราโฟไลด์จากสารสกัดฟ้าทะลายโจร

เป็นที่ทราบกันทั่วไปว่า เจลาตินไฮโดรเจลถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวางสำหรับการใช้งานด้านชีวการแพทย์ เนื่องจากมีต้นทุนต่ำ ความสามารถในการย่อยสลายทางชีวภาพ รวมทั้งคุณสมบัติเจลาตินไฮโดรเจลมีความเข้ากันได้ทางชีวภาพสูงและการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันวิทยาน้อย ซึ่งกลไกเหล่านี้สามารถส่งเสริมการยึดเกาะและการเพิ่มจำนวนของเซลล์มากยิ่งขึ้น (Cava-Roda et al., 2012; Yao et al., 2019) นอกจากนี้กลุ่มอัลดีไฮด์ของวานิลลินสามารถสร้างพันธะ Schiff เบส (Schiff-base bond) กับกลุ่มอะมิโนของโมเลกุลเจลาติน ซึ่งนำไปสู่การสร้างใหม่แบบไดนามิกในระหว่างกระบวนการรักษาตัวเอง (self-healing process) ยิ่งไปกว่านั้น หมู่ไฮดรอกซิลของวานิลลินสามารถสร้างพันธะไฮโดรเจนกับหมู่ไฮดรอกซิลหรืออะมิโนในโมเลกุลเจลาตินได้อีกด้วย ซึ่งส่งเสริมการเชื่อมขวางของไฮโดรเจลที่มีส่วนผสมเหล็กเฟอร์ริก ( $Fe^{3+}$ ) แบบเครือข่ายลูกผสมที่ผันกลับได้มากขึ้น (reversibly-bonded hybrid network) (Hunger et al., 2020) ซึ่งสามารถทดสอบด้วยเทคนิคที่ใช้ในการพิสูจน์โครงสร้างโมเลกุลของสารเคมีนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโคปี (nuclear magnetic resonance) และเทคนิคทางเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ตรวจสอบถึงหมู่ฟังก์ชันของโมเลกุลของสาร (attenuated total reflection fourier transform infrared spectroscopy) (Hoatson and Vold, 1994; Xu et al., 2018) การพิสูจน์เอกลักษณ์อนุภาคนาโนที่ห่อหุ้มด้วยสารแอนโดรกราโฟไลด์ AGP-AgNPs ด้วยเครื่องยูวีวิสิเบิล (UV-Vis) ที่ระดับการดูดกลืนของแสง 441 นาโนเมตร ซึ่งเป็นผลมาจากคลื่นผิวพลาสมอน (surface plasmon resonance) และผลมาจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านของ AGP-AgNPs ทำให้ทราบถึงการกระจายขนาดที่แคบและมีรูปร่างเป็นทรงกลมหรือทรงกลมเทียมที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางตั้งแต่  $16.85 \pm 5.81$  นาโนเมตร ผล

การศึกษานี้บ่งชี้ความสำเร็จของการสังเคราะห์ AGP-AgNPs แบบคอลลอยด์ที่เสถียร ซึ่งสามารถห่อหุ้มและเข้ากันได้ดีกับอนุภาคเงินและสารแอนโดรกราโฟไลด์ ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับรายงานของ Talodthaisong et al., 2020 ที่ได้สังเคราะห์และพิสูจน์ลักษณะโครงสร้างและขนาดของอนุภาคเงินร่วมกับสารแอนโดรกราโฟไลด์ ฉะนั้นสารโพลีเมอร์คอมโพสิตที่สังเคราะห์ในการศึกษานี้จึงเป็นเจลาตินไฮโดรเจลที่สามารถซ่อมแซมตัวเองและมีความเป็นเนื้อเดียวกันกับสารประกอบรวม อีกทั้งไฮโดรเจลโพลีเมอร์คอมโพสิตนี้ยังมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียเมื่อรวมกับอนุภาคเงินร่วมกับสารแอนโดรกราโฟไลด์ (Talodthaisong et al., 2020)

### 5.2.2 อนุภาคนาโนที่ห่อหุ้มสารแอนโดรกราโฟไลด์มีความเป็นพิษต่ำ เร่งการสร้างคอลลาเจนและการปิดรอยแผลในเซลล์ผิวหนังมนุษย์และมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียในจานเพาะเลี้ยง

เมื่อทดสอบอนุภาคนาโนที่ห่อหุ้มสารแอนโดรกราโฟไลด์ พบว่า AGP-AgNPs มีความเป็นพิษต่อเซลล์ต่ำกว่า 80% ของเซลล์ผิวหนังไฟโบรบลาสต์ยังคงทำงานได้ที่ความเข้มข้น 0.0032 nM นอกจากนี้การบ่มเซลล์ผิวหนังไฟโบรบลาสต์ด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ทำให้เกิดความเครียดออกซิเดชัน แต่สารแอนโดรกราโฟไลด์มีฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระ (Li et al., 2022) จึงสามารถลดภาวะเครียดออกซิเดชันจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์เพาะเลี้ยงได้ ซึ่งสารแอนโดรกราโฟไลด์สามารถลดสารชักนำการอักเสบและเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ superoxide dismutase และ catalase เป็นต้น (Li et al., 2018) นอกจากนี้ AGP-AgNPs สามารถเพิ่มจำนวนเซลล์ การคอลลาเจน และการปิดปากแผลในเซลล์ผิวหนังไฟโบรบลาสต์คล้ายคลึงกับกลุ่มควบคุมเชิงบวกด้วยการบ่มด้วยวิตามินซี แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของสารแอนโดรกราโฟไลด์ต่อการสมานแผลในเซลล์ผิวหนังมนุษย์ ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับกลไก Wnt/ $\beta$ -catenin และปริมาณ Type 1 collagen และยีน TGF $\beta$ /BMP, SMAD, FGF, integrin  $\beta$ 1 และ VEGF เป็นต้น (You et al., 2015; Phunikom et al., 2021)

ยิ่งไปกว่านั้น เมื่อทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของเจลาตินไฮโดรเจล GVF/AGP-AgNPs พบว่า ไฮโดรเจลสูตรนี้สามารถจำกัดพื้นที่บริเวณจานแบคทีเรียเพาะเลี้ยงทั้งแกรมบวก (*S. aureus*) และแกรมลบ (*E. coli*) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัย Thammawithan et al., 2022 ซึ่งไฮโดรเจลสามารถทำให้เกิดสภาพเป็นกลางของเยื่อหุ้มเซลล์และการปล่อยซิลเวอร์ไอออน ( $Ag^+$ ) ทำให้เกิดสารอนุมูลอิสระและการสูญเสียความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์จึงทำให้เชื้อแบคทีเรียมีปริมาณลดลง



### 5.2.3 เจลาตินไฮโดรเจลอนุภาคเงินนาโนที่ห่อหุ้มด้วยสารแอนโดรกราโฟไลด์จากสารสกัดฟ้าทะลายโจรมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียและเร่งการสมานแผลด้วยการเพิ่มปริมาณยีนและเซลล์ควบคุมและส่งเสริมการสมานแผลผิวหนังในสัตว์ทดลอง

ผลการศึกษาจากหลายกลุ่มคณะวิจัยที่ได้สังเคราะห์ไฮโดรเจลห่อหุ้มโลหะนาโนในการรักษาบาดแผล เช่น ทองแดง, ทองคำ, เงิน, สังกะสี และเหล็ก เป็นต้น พบว่า ไฮโดรเจลที่มีส่วนผสมของโลหะเหล่านี้สามารถลดการติดเชื้อแบคทีเรียและเร่งการสมานแผลในสัตว์ทดลอง (Sheikh-Oleslami et al., 2023) ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของงานวิจัยนี้ กล่าวคือ เจลาตินไฮโดรเจล GVF/AGP-AgNPs ที่มีส่วนผสมของโลหะเหล็กและอนุภาคเงินนาโนมีประสิทธิภาพต่อการสมานแผลและลดเชื้อแบคทีเรียบริเวณแผลผ่าตัดของสัตว์ทดลอง ร้อยละการสมานของแผลมากกว่ากลุ่มควบคุมประมาณร้อยละ 20 ตลอดระยะเวลาการรักษาแผลเป็นระยะเวลา 28 วัน และมีร้อยละการสร้างเยื่อผิวหนังใหม่เพิ่มขึ้นมากกว่าร้อยละ 95 ในวันที่ 21 โดยเจลาตินไฮโดรเจล GVF/AGP-AgNPs สามารถลดจำนวนเซลล์เหนี่ยวการอักเสบ โมโนนิวเคลียร์เซลล์และเพิ่มปริมาณเซลล์สร้างเส้นใยไฟโบรบลาสต์กับปริมาณเส้นใยคอลลาเจนได้มากกว่าไฮโดรเจลควบคุมในวันที่ 14 และวันที่ 21 ผลการศึกษานี้อาจเป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลงปริมาณยีนควบคุมและส่งเสริมการสมานแผลในระยะเวลาที่แตกต่างกัน กล่าวคือ ยีน VEGF, MMP1 และ collagen I ในช่วงการอักเสบ และยีน TGF- $\beta$ , EGF, VEGF และ collagen I มีบทบาทสำคัญในช่วงซ่อมแซมที่มีการสร้างเนื้อเยื่อทดแทน ขณะที่ยีน collagen III มีปริมาณเพิ่มขึ้นในช่วงปรับรูปร่าง ตามลำดับ โดยทั่วไปหลังจากเกิดบาดแผล เกิดแผลฉีกขาดกระตุ้นในระยะแรกของการบาดเจ็บและมีบทบาทสำคัญในการก่อตัวเป็นก้อนระหว่างการแข็งตัวของเลือดหลังจากรวมตัวและการยึดติดกับพื้นผิวคอลลาเจนที่สัมผัสสารชักนำการอักเสบไซโตไคน์ เช่น สารกระตุ้นการเจริญเติบโตที่ได้มาจากเกล็ดเลือด (PDGF), TGF- $\beta$ , VEGF และปัจจัยอื่น ๆ ที่หลั่งออกมาโดยเกล็ดเลือดเป็นสื่อกลางในกระบวนการสมานแผล (Qing et al., 2017) ซึ่ง TGF- $\beta$  ควบคุมการเพิ่มจำนวนและการย้ายถิ่นของเซลล์ การผลิตเมทริกซ์นอกเซลล์ และการตอบสนองของภูมิคุ้มกัน (Penn et al., 2012) รวมถึง EGF ส่งเสริมพัฒนาของเนื้อเยื่อแกรนูโล การเจริญของผิวหนังชั้นนอกและการปรับการสร้างเส้นเลือดใหม่ตามลำดับ ทั้งนี้การสร้างเส้นเลือดใหม่มีบทบาทสำคัญในการรักษาบาดแผลโดยอำนวยความสะดวกในการขนส่งสารอาหารและออกซิเจนไปยังบริเวณที่มีบาดแผล (Bakker et al., 2016)

ฉะนั้นการสมานแผลมีกระบวนการตอบสนองทางสรีรวิทยาต่อการบาดเจ็บของเนื้อเยื่อซึ่งเป็นเส้นทางที่ซับซ้อนของปฏิกิริยาทางชีวเคมีและเหตุการณ์ภายในเซลล์ ปัจจัยการเจริญเติบโตและสารชักนำการอักเสบไซโตไคน์ องค์ประกอบเมทริกซ์นอกเซลล์เป็นองค์ประกอบสำคัญในการซ่อมแซมบาดแผล โดยมีการสร้างเมทริกซ์ชั่วคราวในช่วงที่มีการอักเสบ จากนั้น

โมเลกุลเมทริกซ์ควบคุมการทำงานของเซลล์ ปรับสมดุลปฏิสัมพันธ์ระหว่างเซลล์กับเซลล์และเมทริกซ์เซลล์ นอกจากนี้ TGF- $\beta$  ในช่วงของการสมานแผลระยะสุดท้าย มีบทบาทที่เกี่ยวข้องกับการชะลอการสร้างเยื่อหุ้มใหม่ของบาดแผล โดย TGF- $\beta$  สามารถสร้างภูมิคุ้มกันและเมทริกซ์นอกเซลล์ด้วยกระตุ้นยีน VEGF เพื่อให้มีการสร้างเนื้อเยื่อและหลอดเลือดใหม่ รวมทั้ง TGF- $\beta$  เพิ่มปริมาณ fibronectin และปรับลดปริมาณยีน MMP-1 เพื่อให้มีการสะสมของเส้นใยคอลลาเจน (Schultz and Wysocki, 2009; Pakyari et al., 2013; Ramirez et al., 2014) ทั้งนี้เมทริกซ์นอกเซลล์ทำหน้าที่เป็นแหล่งกักเก็บและเป็นตัวปรับไซโตไคน์และปริมาณโกรทแฟกเตอร์ เช่น ยีน EGF ทำหน้าที่กระตุ้นการทำงานยีน MMP-1 เพื่อสร้างเมทริกซ์นอกเซลล์ในช่วงการปรับปรุงร่างของกระบวนการสมานแผล เป็นต้น (Olczyk et al., 2014)

### 5.2.3 เจลาตินไฮโดรเจลอนุภาคเงินนาโนที่ห่อหุ้มด้วยสารแอนโดรกราโฟไลด์จากสารสกัดฟ้าทะลายโจรมีความระคายเคืองผิวหนังน้อยและมีความเป็นไปได้ในการพัฒนาเป็นวัสดุปิดแผลทางการแพทย์

การประเมินความระคายเคืองผิวหนัง ได้แก่ รอยแดงของผิวหนังเกิดจากภาวะเลือดคั่งของเส้นเลือดฝอยร่วมกับการสังเกตอาการบวมที่เกิดจากของเหลวในเนื้อเยื่อบริเวณผิวหนังที่ทำการทดสอบ (Wang et al., 2017) ผลการศึกษา รอยแดง ชั้นเนื้อตาย และการบวมของผิวหนังหลังจาทดสอบความระคายเคืองของเจลาตินไฮโดรเจล GVF/AGP-AgNPs ซึ่งประเมินระดับการระคายเคืองผิวหนังด้วยเกณฑ์ความระคายเคืองจากเครื่องมือแพทย์ พบว่า เจลาตินไฮโดรเจล GVF/AGP-AgNPs ไม่มีความระคายเคืองต่อผิวหนังสัตว์ทดลอง ขณะที่เกณฑ์ความระคายเคืองจากเครื่องสำอางและวัตถุอันตรายระบุว่า เจลาตินไฮโดรเจลสูตรนี้มีความระคายเคืองผิวหนังเล็กน้อย ผลการศึกษานี้ทำให้ทราบถึงฤทธิ์ด้านการอักเสบและการติดเชื้อของสารแอนโดรกราโฟไลด์จากสารสกัดฟ้าทะลายโจร ซึ่งสอดคล้องกับประสิทธิภาพของรางจืด (*T. laurifolia*, *C. longa*), มังคุด (*G. Mangostana*) และฟ้าทะลายโจร (*A. paniculata*) ที่มีสรรพคุณในการต้านอนุมูลอิสระและการกำจัดอนุมูลอิสระ ซึ่งส่งผลให้ผลการติดเชื้อแบคทีเรียมีผลให้ลดการทำงานของระบบต้านอนุมูลอิสระทั้งในระดับเอนไซม์ ยีน และกลูตาไธโอน อย่างไรก็ตามระบบต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องเมื่อรักษาด้วยสารสกัดจากสมุนไพรในข้างต้น นอกจากนี้การเพิ่มขึ้นของการบวมกรุกของแบคทีเรียที่ผิวหนัง, ความเข้มข้นของโมเลกุลที่ทำปฏิกิริยากับกรดไทโอบาร์บิทูริก, ระดับของลิพิดเปอร์ออกซิเดชัน และการแสดงออกของยีนไซโตไคน์ด้านการอักเสบลดลงเมื่อนำสารสกัดจากสมุนไพรมาใช้ในการรักษากระต่ายผิวหนังอักเสบที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยเชื้อแบคทีเรียสแตปฟีโลคอคคัส ออเรียส (*Staphylococcus Aureus*) (So-In and Sunthamala, 2022) รวมถึงการนำสารสกัดฟ้าทะลายโจรและอนุพันธ์จากขมิ้น (Curcuminoids) นำมาใช้เวชสำอางและรักษาผิว

ทั้งนี้คะแนนการระคายเคืองต่อผิวหนังได้รับการประเมินสีแดงและบวมน้ำในการทดสอบการระคายเคืองต่อผิวหนังของกระดาษอาจถูกรบกวนหรือมีความคลาดเคลื่อนได้ เนื่องจากผิวหนังที่หนาขึ้นและเปลี่ยนสีเป็นสีแดงมีความเกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของขนได้ (OECD Guidelines, 2002)

### 5.3 ข้อเสนอแนะ

1. งานวิจัยนี้ได้ใช้ธนาคารเงินนาโนร่วมกับการสังเคราะห์เจลาตินไฮโดรเจลสมานแผลจึงมีความจำเป็นต้องศึกษาการตกค้างของโลหะเงินในสัตว์ทดลองเพิ่มเติม รวมถึงการทดสอบความเป็นพิษโดยการป้อนหรือทาแผ่นปิดแผลอย่างต่อเนื่อง และศึกษาการเปลี่ยนแปลงพยาธิวิทยาของตับและไต

2. แม้ว่าโครงการวิจัยนี้ไม่ได้ทำการทดสอบการซึมผ่านผิวหนัง ทำให้ยังคงไม่มีข้อมูลเกี่ยวกับการศึกษากลไกหรือวิธีการดูดซึมของยาผ่านผิวหนังเพื่อออกฤทธิ์เฉพาะที่ผิวหนัง แต่ผลการศึกษาที่ได้ก็น่าสามารถยืนยันประสิทธิผลของการสังเคราะห์เจลาตินไฮโดรเจลสมานแผลได้ดังที่ได้แสดงผลการศึกษาในเซลล์ผิวหนังเพาะเลี้ยงและสัตว์ทดลอง

3. ไฮโดรเจลสมานแผลสูตรนี้สามารถนำไปศึกษาต่อยอดในผิวหนังแผลเรื้อรังสัตว์ทดลอง เช่น ภาวะเบาหวาน และแผลอักเสบเรื้อรัง หรือผิวหนังของมนุษย์สุขภาพดี ก่อนนำไปประยุกต์ใช้จริงกับผู้ป่วยที่มีบาดแผลในระดับชั้นคลินิกถัดไปในอนาคต

## บรรณานุกรม

- Adibfar, A., Hosseini, S., & Baghaban Eslaminejad, M. (2020). Smart Polymeric Systems: A Biomedical Viewpoint. *Advances in experimental medicine and biology*, 1298, 133–148.
- Amsden B. (2015). Novel biodegradable polymers for local growth factor delivery. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics: official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V.*, 97(Pt B), 318–328.
- Bakker, K., Apelqvist, J., Lipsky, B. A., Van Netten, J. J., & International Working Group on the Diabetic Foot (2016). The 2015 IWGDF guidance documents on prevention and management of foot problems in diabetes: development of an evidence-based global consensus. *Diabetes/metabolism research and reviews*, 32 Suppl 1, 2–6.
- Berardesca, E., Farage, M., & Maibach, H. (2013). Sensitive skin: an overview. *International journal of cosmetic science*, 35(1), 2–8.
- Bhubhanil, S., Talodthaisong, C., Khongkow, M., Namdee, K., Wongchitrat, P., Yingmema, W., et al. (2021). Enhanced wound healing properties of guar gum/curcumin-stabilized silver nanoparticle hydrogels. *Scientific reports*, 11(1), 21836.
- Caceres, D. D., Hancke, J. L., Burgos, R. A., Sandberg, F., & Wikman, G. K. (1999). Use of visual analogue scale measurements (VAS) to assess the effectiveness of standardized *Andrographis paniculata* extract SHA-10 in reducing the symptoms of common cold. A randomized double blind-placebo study. *Phytomedicine*, 6(4), 217–223.
- Cava-Roda, R.M., Taboada-Rodríguez, A., Valverde-Franco, M.T., & Marín-Iniesta, F. (2012). Antimicrobial Activity of Vanillin and Mixtures with Cinnamon and Clove Essential Oils in Controlling *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in Milk. *Food and Bioprocess Technology*, 5, 2120–2131.
- Chen, J., Peng, Q., Thundat, T., & Zeng, H. (2019). Stretchable, injectable, and self-healing conductive hydrogel enabled by multiple hydrogen bonding toward wearable electronics. *Chemistry of Materials*, 31(12), 4553–4563.

- Dai, Y., Chen, S. R., Chai, L., Zhao, J., Wang, Y., & Wang, Y. (2019). Overview of pharmacological activities of *Andrographis paniculata* and its major compound andrographolide. *Critical reviews in food science and nutrition*, 59(sup1), S17–S29.
- Gaspar-Pintilieșcu, A., Stanciuc, A. M., & Craciunescu, O. (2019). Natural composite dressings based on collagen, gelatin and plant bioactive compounds for wound healing: A review. *International journal of biological macromolecules*, 138, 854–865.
- He, H., Xia, D. L., Chen, Y. P., Li, X. D., Chen, C., Wang, Y. F., et al. (2017). Evaluation of a two-stage antibacterial hydrogel dressing for healing in an infected diabetic wound. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 105(7), 1808–1817.
- Hoare, T. R., & Kohane, D. S. (2008). Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges. *Polymer*, 49(8), 1993–2007.
- Hoatson, G.L., & Vold, R.L. (1994). 2H-NMR Spectroscopy of Solids and Liquid Crystals. *Solid-State NMR III Organic Matter*. 1–67.
- Hossain, M. S., Urbi, Z., Sule, A., & Hafizur Rahman, K. M. (2014). *Andrographis paniculata* (Burm. f.) Wall. ex Nees: a review of ethnobotany, phytochemistry, and pharmacology. *The Scientific World Journal*, 2014, 274905.
- Hunger, M., Domalik-Pyzik, P., Reczyńska, K., Chłopek, J. (2020). Double crosslinking of chitosan/vanillin hydrogels as a basis for mechanically strong gradient scaffolds for tissue engineering. *Engineering of Biomaterials*, (155), 2–11.
- Jamaludin, R., Daud, N. M., Sulong, R. S. R., Yaakob, H., Aziz, A. A., Khamis, S., et al. (2021). *Andrographis paniculata*-loaded niosome for wound healing application: characterisation and in vivo analyses. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 63, 102427.
- Krishnan, P. D., Banas, D., Durai, R. D., Kabanov, D., Hosnedlova, B., Kepinska, M., et al. (2020). Silver Nanomaterials for Wound Dressing Applications. *Pharmaceutics*, 12(9), 821.
- Li, B., Jiang, T., Liu, H., Miao, Z., Fang, D., Zheng, L., et al. (2018). Andrographolide protects chondrocytes from oxidative stress injury by activation of the Keap1-Nrf2-Are signaling pathway. *Journal of cellular physiology*, 234(1), 561–571.

- Li, J., Chen, J., & Kirsner, R. (2007). Pathophysiology of acute wound healing. *Clinics in dermatology*, 25(1), 9–18.
- Li, X., Yuan, W., Wu, J., Zhen, J., Sun, Q., & Yu, M. (2022). Andrographolide, a natural anti-inflammatory agent: An Update. *Frontiers in pharmacology*, 13, 920435.
- Li, Y., He, S., Tang, J., Ding, N., Chu, X., Cheng, L., et al. (2017). Andrographolide Inhibits Inflammatory Cytokines Secretion in LPS-Stimulated RAW264.7 Cells through Suppression of NF- $\kappa$ B/MAPK Signaling Pathway. *Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM*, 2017, 8248142.
- Loureiro Damasceno, J. P., Silva da Rosa, H., Silva de Araújo, L., & Jacometti Cardoso Furtado, N. A. (2022). Andrographis paniculata Formulations: Impact on Diterpene Lactone Oral Bioavailability. *European journal of drug metabolism and pharmacokinetics*, 47(1), 19–30.
- Mariod, A. A., & Fadul, H. (2013). Gelatin, source, extraction and industrial applications. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 12(2), 135–147.
- Messire, G., Serreau, R., & Berteina-Raboin, S. (2023). Antioxidant Effects of Catechins (EGCG), Andrographolide, and Curcuminoids Compounds for Skin Protection, Cosmetics, and Dermatological Uses: An Update. *Antioxidants* (Basel, Switzerland), 12(7), 1317.
- Mussard, E., Cesaro, A., Lespessailles, E., Legrain, B., Berteina-Raboin, S., & Toumi, H. (2019). Andrographolide, a Natural Antioxidant: An Update. *Antioxidants* (Basel, Switzerland), 8(12), 571.
- OECD guideline for the testing of chemicals: Test No. 404: acute dermal irritation/ corrosion. 2002, from Organisation for Economic Co-operation and Development website: [http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-404-acute-dermal-irritation-corrosion\\_9789264070622-en](http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-404-acute-dermal-irritation-corrosion_9789264070622-en).
- Olczyk, P., Mencner, Ł., & Komosinska-Vassev, K. (2014). The role of the extracellular matrix components in cutaneous wound healing. *BioMed research international*, 2014, 747584.
- Osada, Y., & Gong, J. P. (1998). Soft and wet materials: polymer gels. *Advanced Materials*, 10(11), 827–837.
- Pakyari, M., Farrokhi, A., Maharlooei, M. K., & Ghahary, A. (2013). Critical Role of Transforming Growth Factor Beta in Different Phases of Wound Healing. *Advances in wound care*, 2(5), 215–224.

- Penn, J. W., Grobbelaar, A. O., & Rolfe, K. J. (2012). The role of the TGF- $\beta$  family in wound healing, burns and scarring: a review. *International journal of burns and trauma*, 2(1), 18–28.
- Phadke, A., Zhang, C., Arman, B., Hsu, C. C., Mashelkar, R. A., Lele, A. K., et al. (2012). Rapid self-healing hydrogels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(12), 4383–4388.
- Phunikom, N., Boonmuen, N., Kheolamai, P., Suksen, K., Manochantr, S., Tantrawatpan, C., et al. (2021). Andrographolide promotes proliferative and osteogenic potentials of human placenta-derived mesenchymal stem cells through the activation of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling. *Stem cell research & therapy*, 12(1), 241.
- Pichler, W. J., Yawalkar, N., Britschgi, M., Depta, J., Strasser, I., Schmid, S., et al. (2002). Cellular and molecular pathophysiology of cutaneous drug reactions. *American journal of clinical dermatology*, 3(4), 229–238.
- Puri, A., Saxena, R., Saxena, R. P., Saxena, K. C., Srivastava, V., & Tandon, J. S. (1993). Immunostimulant agents from *Andrographis paniculata*. *Journal of natural products*, 56(7), 995–999.
- Qing C. (2017). The molecular biology in wound healing & non-healing wound. *Chinese journal of traumatology = Zhonghua chuang shang za zhi*, 20(4), 189–193.
- Ramirez, H., Patel, S. B., & Pastar, I. (2014). The Role of TGF $\beta$  Signaling in Wound Epithelialization. *Advances in wound care*, 3(7), 482–491.
- Schultz, G. S., & Wysocki, A. (2009). Interactions between extracellular matrix and growth factors in wound healing. *Wound repair and regeneration: official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*, 17(2), 153–162.
- Sheeja, K., Shihab, P. K., & Kuttan, G. (2006). Antioxidant and anti-inflammatory activities of the plant *Andrographis paniculata* Nees. *Immunopharmacology and immunotoxicology*, 28(1), 129–140.
- Sheikh-Oleslami, S., Tao, B., D'Souza, J., Butt, F., Suntharalingam, H., Rempel, L., et al. (2023). A Review of Metal Nanoparticles Embedded in Hydrogel Scaffolds for Wound Healing In Vivo. *Gels* (Basel, Switzerland), 9(7), 591.

- So-In, C., & Sunthamala, N. (2022). Treatment efficacy of *Thunbergia laurifolia*, *Curcuma longa*, *Garcinia mangostana*, and *Andrographis paniculata* extracts in *Staphylococcus aureus*-induced rabbit dermatitis model. *Veterinary world*, 15(1), 188–197.
- Talodthaisong, C., Boonta, W., Thammawithan, S., Patramanon, R., Kamonsutthipajit, N., Hutchison, J. A., et al. (2020). Composite guar gum-silver nanoparticle hydrogels as self-healing, injectable, and antibacterial biomaterials. *Materials Today Communications*, 24, 100992.
- Talodthaisong, C., Plaeyao, K., Mongseetong, C., Boonta, W., Srichaiyapol, O., Patramanon, R., et al. (2021). The Decoration of ZnO Nanoparticles by Gamma Aminobutyric Acid, Curcumin Derivative and Silver Nanoparticles: Synthesis, Characterization and Antibacterial Evaluation. *Nanomaterials* (Basel, Switzerland), 11(2), 442.
- Tessmar, J. K., & Göpferich, A. M. (2007). Matrices and scaffolds for protein delivery in tissue engineering. *Advanced drug delivery reviews*, 59(4-5), 274–291.
- Thai Pharmacopoeia Committee. (1995). *Thai Herbal Pharmacopoeia (1)*. Depart. Med. Sci, 1, 51-56.
- Thammawithan, S., Talodthaisong, C., Srichaiyapol, O., Patramanon, R., Hutchison, J. A., & Kulchat, S. (2022). Andrographolide stabilized-silver nanoparticles overcome ceftazidime-resistant *Burkholderia pseudomallei*: study of antimicrobial activity and mode of action. *Scientific reports*, 12(1), 10701.
- Tzeng, Y. M., Lee, Y. C., Cheng, W. T., Shih, H. N., Wang, H. C., Rao, Y. K., et al. (2012). Effects of andrographolide and 14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide on cultured primary astrocytes and PC12 cells. *Life sciences*, 90(7-8), 257–266.
- Vigata, M., Meinert, C., Hutmacher, D. W., & Bock, N. (2020). Hydrogels as Drug Delivery Systems: A Review of Current Characterization and Evaluation Techniques. *Pharmaceutics*, 12(12), 1188.
- Vintiloiu, A., & Leroux, J. C. (2008). Organogels and their use in drug delivery--a review. *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society*, 125(3), 179–192.
- Wang, J., Li, Z., Sun, F., Tang, S., Zhang, S., Lv, P., et al. (2017). Evaluation of dermal irritation and skin sensitization due to vitacoxib. *Toxicology reports*, 4, 287–290.



- Xu, C., Zhan, W., Tang, X., Mo, F., Fu, L., & Lin, B. (2018). Self-healing chitosan/vanillin hydrogels based on Schiff-base bond/hydrogen bond hybrid linkages. *Polymer Testing*, 66, 155–163.
- Yao, M., Gao, F., Xu, R., Zhang, J., Chen, Y., & Guan, F. (2019). A dual-enzymatically cross-linked injectable gelatin hydrogel loaded with BMSC improves neurological function recovery of traumatic brain injury in rats. *Biomaterials science*, 7(10), 4088–4098.
- Ye, H., Cheng, J., & Yu, K. (2019). In situ reduction of silver nanoparticles by gelatin to obtain porous silver nanoparticle/chitosan composites with enhanced antimicrobial and wound-healing activity. *International journal of biological macromolecules*, 121, 633–642.
- Yildirim, L., Thanh, N. T., & Seifalian, A. M. (2012). Skin regeneration scaffolds: a multimodal bottom-up approach. *Trends in biotechnology*, 30(12), 638–648.
- You, J., Roh, K. B., Li, Z., Liu, G., Tang, J., Shin, S., et al. (2015). The Antiaging Properties of *Andrographis paniculata* by Activation Epidermal Cell Stemness. *Molecules* (Basel, Switzerland), 20(9), 17557–17569.
- Zaidan, M. R., Noor Rain, A., Badrul, A. R., Adlin, A., Norazah, A., & Zakiah, I. (2005). In vitro screening of five local medicinal plants for antibacterial activity using disc diffusion method. *Tropical biomedicine*, 22(2), 165–170.
- Zhang, L., Bao, M., Liu, B., Zhao, H., Zhang, Y., Ji, X., et al. (2020). Effect of Andrographolide and Its Analogs on Bacterial Infection: A Review. *Pharmacology*, 105(3-4), 123–134.



ภาคผนวก

**ภาคผนวก ก**

หนังสืออนุมัติการพิจารณาจรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลอง  
คณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและใช้สัตว์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์





## ANIMAL USE PROTOCOL APPROVAL

Protocol Number 001/2023

Animal Protocol Title

(Thai).....ผลของไฮโดรเจลผลิตแผลจากโปรตีนไหมและสมุนไพรต้านการอักเสบที่ห่อหุ้มอนุภาคนาโนต่อการสมานแผล.....  
.....และการระคายเคืองผิวหนังในหนูเบาหวานและกระต่าย

(English). Effects of hydrogel wound dressing from silks and anti-inflammatory herbs encapsulated.....  
.....nanoparticles on wound healing and skin irritation in diabetic rats and skin irritation in rabbits

Main Project/Proposal Title (If available)

(Thai) 1.ผลรวมของโปรตีนไหมและโกรทแฟกเตอร์ที่ห่อหุ้มด้วยไฮโดรเจลต่อการสมานแผลและความระคายเคือง.....  
.....ผิวหนังในสัตว์ทดลอง

2.ประสิทธิภาพที่เป็นไปได้ของไฮโดรเจลแอนโดรกราโฟไลด์และเคอร์คูมินที่ห่อหุ้มด้วยอนุภาคนาโนต่อการ.....  
.....สมานแผลและความระคายเคืองผิวหนังในแบบจำลองสัตว์ทดลองโรคเบาหวาน

(English) 1.Combined effects of silk proteins and growth factors loaded hydrogels on wound healing.....  
.....and skin irritation in laboratory animals

2.Potentialefficacy of Andrographolide and Curcumin based nanohydrogels on wound.....  
.....healing and skin irritation in diabetic animal models

Principal Investigator

Name-Surname (Thai).....ดร.ศราวุธ ลากมณี

Name-Surname (English).....Dr. Sarawut Lapmanee

Affiliation (Thai).....คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสยาม

Affiliation (English).....Faculty of Medicine, Siam University

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 Yimsoo, DVM)

Chair of Animal Ethical and Post Approval  
Monitoring Subcommittee  
Thammasat University

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

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

Expiration Date

19 April, 2024

**ภาคผนวก ข**  
**ผลผลิตที่เกิดขึ้นจากโครงการวิจัย**

ผลผลิตเป้าหมาย	ผลผลิตที่เกิดขึ้นจริง	หมายเหตุ
1. บทความวิจัยระดับนานาชาติ จำนวน 1 เรื่อง (Q1-2)	บทความวิจัยระดับนานาชาติ Q 1 จำนวน 1 เรื่อง (ผู้ร่วมวิจัย)	อยู่ระหว่างพิจารณาตีพิมพ์ บทความวิจัยระดับนานาชาติ Q2 จำนวน 1 เรื่อง
2. ผลิตภัณฑ์ต้นแบบ	สังเคราะห์ผลิตภัณฑ์ต้นแบบ	-
3. นักศึกษาระดับบัณฑิต 1 คน	ร่วมผลิตกำลังคนและเป็น กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ นักศึกษาระดับบัณฑิต 1 คน	นักศึกษาระดับปริญญาโท คณะทันต แพทยศาสตร์ ม. ขอนแก่น
4. อนุสิทธิบัตร	อนุสิทธิบัตรการสังเคราะห์ แผ่นปิดแผลไฮโดรเจลที่มี ส่วนผสมของสารแอนโดร- กราโฟไลด์	อยู่ระหว่างยื่นแจ้งจดทะเบียน การประดิษฐ์ (KRRN 130454) เมื่อเดือนตุลาคม 2566

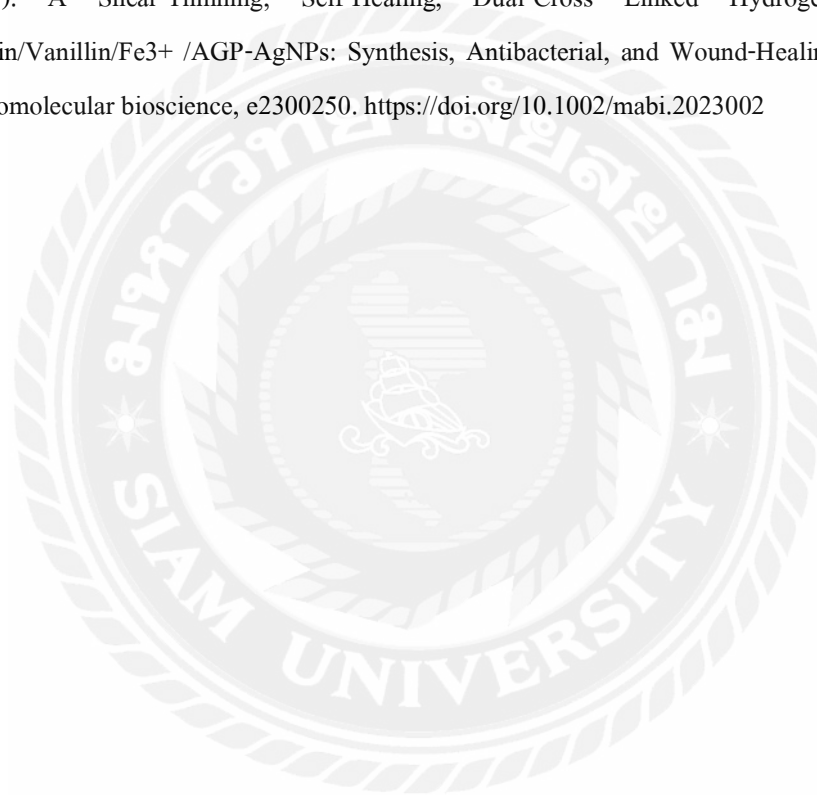
**ภาคผนวก ค**  
**ผลที่คาดว่าจะได้รับจากโครงการวิจัย**

ผลที่คาดว่าจะได้รับ	ผลที่เกิดขึ้นจริง	หมายเหตุ
1. ผลงานตีพิมพ์ (Publications)	บทความวิจัยระดับนานาชาติ Q 1 จำนวน 1 เรื่อง (ผู้ร่วมวิจัย)	อยู่ระหว่างพิจารณาตีพิมพ์ บทความวิจัยระดับนานาชาติ Q2 จำนวน 1 เรื่อง
2. การอ้างอิง (Citations)	-	-
3. ความก้าวหน้าในวิชาชีพของบุคลากรด้านวิทยาศาสตร์วิจัยและนวัตกรรม (Next destination)	ยื่นขอการพิจารณาตำแหน่งวิชาการระดับผู้ช่วยศาสตราจารย์	-
4. ทรัพย์สินทางปัญญา การขึ้นทะเบียนพันธุ์ พืชและพันธุ์สัตว์ หรือการอนุญาตให้ใช้สิทธิ (Intellectual property, Registered Plants Varieties and Animals Breeding or Licensing)	อนุสิทธิบัตรการสังเคราะห์แผ่นปิดแผลไฮโดรเจลที่มีส่วนผสมของสารแอนโดรกราโฟไลด์	อยู่ระหว่างยื่นแจ้งจดทะเบียนการประดิษฐ์ (KRRN 130454) เมื่อเดือนตุลาคม 2566
5. ผลิตภัณฑ์ใหม่ (New Products)	สังเคราะห์ผลิตภัณฑ์ต้นแบบ	-

## ภาคผนวก ง

### บทความวิจัยที่ได้รับตีพิมพ์

Talodthaisong, C., Patramanon, R., Thammawithan, S., **Lapmanee, S.**, Maikaeo, L., Sricharoen, P., Khongkow, M., Namdee, K., Jantimaporn, A., Kayunkid, N., Hutchison, J. A., & Kulchat, S. (2023). A Shear-Thinning, Self-Healing, Dual-Cross Linked Hydrogel Based on Gelatin/Vanillin/Fe<sup>3+</sup> /AGP-AgNPs: Synthesis, Antibacterial, and Wound-Healing Assessment. *Macromolecular bioscience*, e2300250. <https://doi.org/10.1002/mabi.2023002>



# A Shear-Thinning, Self-Healing, Dual-Cross Linked Hydrogel Based on Gelatin/Vanillin/ $\text{Fe}^{3+}$ /AGP-AgNPs: Synthesis, Antibacterial, and Wound-Healing Assessment

Chanon Talodthaisong, Rina Patramanon, Saengrawee Thammawithan, Sarawut Lapmanee, Lamai Maikaeo, Phitchan Sricharoen, Mattaka Khongkow, Katawut Namdee, Angkana Jantimaporn, Navaphun Kayunkid, James A. Hutchison, and Sirinan Kulchat\*

A shear-thinning and self-healing hydrogel based on a gelatin biopolymer is synthesized using vanillin and  $\text{Fe}^{3+}$  as dual crosslinking agents. Rheological studies indicate the formation of a strong gel found to be injectable and exhibit rapid self-healing (within 10 min). The hydrogels also exhibited a high degree of swelling, suggesting potential as wound dressings since the absorption of large amounts of wound exudate, and optimum moisture levels, lead to accelerated wound healing. Andrographolide, an anti-inflammatory natural product is used to fabricate silver nanoparticles, which are characterized and composited with the fabricated hydrogels to imbue them with anti-microbial activity. The nanoparticle/hydrogel composites exhibit activity against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, and *Burkholderia pseudomallei*, the pathogen that causes melioidosis, a serious but neglected disease affecting southeast Asia and northern Australia. Finally, the nanoparticle/hydrogel composites are shown to enhance wound closure in animal models compared to the hydrogel alone, confirming that these hydrogel composites hold great potential in the biomedical field.

## 1. Introduction

In recent years, self-healing materials have received much attention to extend the life of materials and devices.<sup>[1]</sup> One approach, which replicates the natural self-healing process, is to include microcapsules in bulk materials that deliver healing chemicals when damage to the bulk material occurs. The success of such extrinsic self-healing approaches is limited by an inability to repair macroscopic damage (e.g., large cracks) or repeatedly heal the bulk material in the same place.<sup>[2]</sup> In contrast, intrinsically self-healing materials can repair macroscopic damage and in principle can repair damage at the same place infinitely.

Materials that employ the concept of constitutional dynamic chemistry are ideally placed as intrinsically self-healing materials,<sup>[3]</sup> as they can repeatedly rebuild

C. Talodthaisong, S. Kulchat  
 Materials Chemistry Research Center  
 Department of Chemistry and Center of Excellence for Innovation in Chemistry  
 Faculty of Science  
 Khon Kaen University  
 Khon Kaen 40002, Thailand  
 E-mail: sirikul@kku.ac.th  
 R. Patramanon, S. Thammawithan  
 Department of Biochemistry  
 Faculty of Science  
 Khon Kaen University  
 Khon Kaen 40002, Thailand  
 S. Lapmanee  
 Department of Basic Medical Sciences  
 Faculty of Medicine  
 Siam University  
 Bangkok 10160, Thailand

L. Maikaeo  
 Nuclear Technology Research and Development Center  
 Thailand Institute of Nuclear Technology (Public Organization)  
 Nakhon Nayok 26120, Thailand  
 P. Sricharoen  
 Department of Premedical Science  
 Faculty of Medicine, Bangkok  
 Thonburi University  
 Thawi Watthana, Bangkok 10170, Thailand  
 M. Khongkow, K. Namdee, A. Jantimaporn  
 National Nanotechnology Centre  
 National Science and Technology Development Agency  
 Pathumthani 12120, Thailand  
 N. Kayunkid  
 College of Materials Innovation and Technology  
 King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang  
 Ladkrabang, Bangkok 10520, Thailand  
 J. A. Hutchison  
 School of Chemistry and Centre of Excellence in Exciton Science  
 The University of Melbourne  
 Parkville, Victoria 3010, Australia

 The ORCID identification number(s) for the author(s) of this article can be found under <https://doi.org/10.1002/mabi.202300250>

DOI: 10.1002/mabi.202300250



their chemical or physical connections under mild conditions in response to a specific external stimulus. Self-healing materials based on constitutional dynamic chemistry are typically polymers that self-heal via either noncovalent interactions or covalent bonds.<sup>[4–6]</sup> Self-healing polymers utilizing noncovalent interactions are thermodynamically stable polymers but feature high reversibility and tunability of polymerization.<sup>[7]</sup> They reconstruct networks through the dynamic formation of attractive noncovalent interactions between molecules, oligomers, or polymer chains, including hydrogen bonding, host-guest complex, metal-ligand complex, hydrophobic,  $\pi-\pi$ , and ionic interactions.<sup>[8,9]</sup> The self-healing polymers utilizing covalent bonds are of more interest for their elastic response to induced mechanical stresses.<sup>[10]</sup> They undergo changes through the dynamic formation of covalent bonds, including imine bonds, boronic ester bonds, disulfide bonds, Diels–Alder reaction, and acyl hydrazone bonds.

An important application of self-healing materials is injectable delivery, as materials may need to re-configure some property, for example gelation, lost during passage through a syringe. Shear-thinning hydrogels, that exhibit fluid-like flow when subjected to shear stress, are ideal for injection through a syringe. Once the shear is removed, the hydrogel returns to its gel form (a self-healing property).<sup>[11]</sup> Indeed hydrogels are particularly intriguing candidates for injectable delivery in biomedical contexts, due to their hydrophilic polymer structure which creates a biomimetic environment that can facilitate transport of physiologically relevant chemicals. Biopolymer-based self-healing hydrogels have gained increasing interest for applications of wound-dressing,<sup>[12,13]</sup> antimicrobial hydrogel,<sup>[14,15]</sup> and biosensors<sup>[16]</sup> due to their excellent biocompatibility and biodegradability.

Recently, there has been a surge in the popularity of self-healing hydrogel tissue adhesives owing to their ability to achieve quick hemostasis and wound closure.<sup>[17]</sup> Hydrogels provide a solution for surgical suturing without requiring time-consuming procedures or delicate skills, and without causing secondary tissue injury.<sup>[18]</sup> Hydrogels synthesized from gelatin (derived from collagen hydrolysis) are known for their excellent tissue adhesion abilities.<sup>[19]</sup> Gelatin hydrogels have been extensively used for biomedical applications due to their low cost, biodegradability, high biocompatibility, and minimal immunological reaction, all of which encourage cell adhesion and proliferation.<sup>[20]</sup>

With the target of gelatin-based self-healing, injectable hydrogels, this study sought to uncover bio-compatible gelatin compounds that could function via constitutional dynamic chemistry. Vanillin (4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde) has been extensively used as a flavoring agent in foods, beverages, cosmetics, and pharmaceuticals due to its nontoxic and pleasant aroma. Vanillin has recently been found to have additional beneficial applications in the food industry because of its antioxidant, antimutagenic, antifungal, and antibacterial properties.<sup>[21]</sup> Vanillin has demonstrated antimicrobial activity in apple juice and fruit purées.<sup>[22]</sup> Importantly for this study, the aldehyde group of vanillin can form a Schiff-base bond with the amino groups of gelatin molecules, leading to dynamic reconstruction during the self-healing process.<sup>[23]</sup> Additionally, the hydroxyl group of vanillin can form hydrogen bonds with the hydroxyl or amino groups in another gelatin molecule further facilitating crosslink-

ing. This work will demonstrate that vanillin is an effective additive for self-healing gelatin hydrogels, with ionic bonding with  $\text{Fe}^{3+}$  ions further aiding crosslinking and the construction of a reversible hydrogel network.

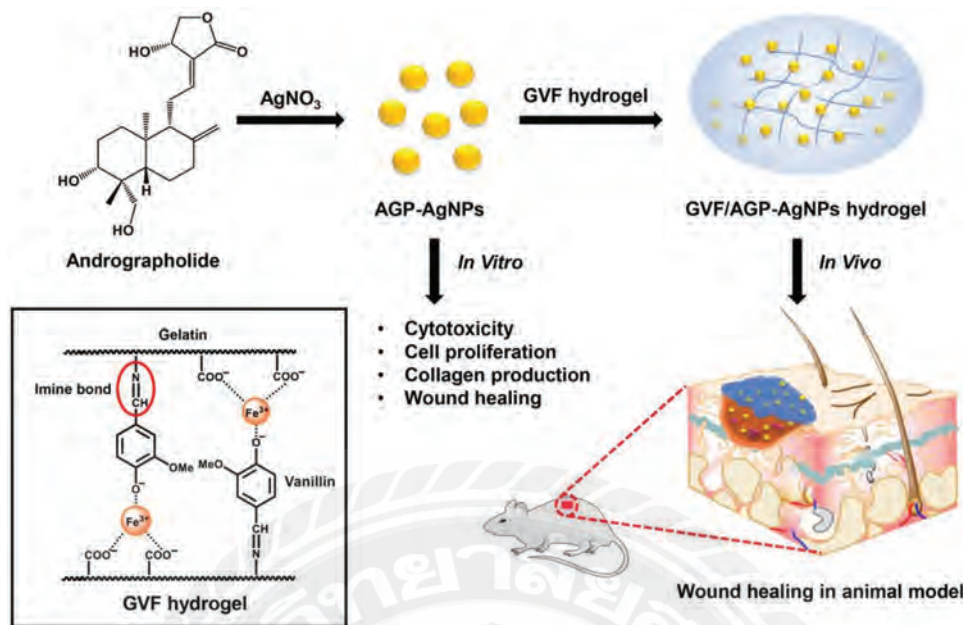
Finally, the hydrogel is made strongly antibacterial by incorporation of green-synthesized silver nanoparticles. The biosynthesis of silver nanoparticles (AgNPs) was achieved using Andrographolide molecule as both reducing and stabilizing agent. Andrographolide, an antiparasitic and antileishmanial agent, was extracted from *Andrographis paniculata* leaves.<sup>[24]</sup> The andrographolide-silver nanoparticles (AGP-AgNPs) were composited into the self-healing hydrogel, resulting in the formation of multipurpose hydrogels that are injectable, rapidly self-healing, and display antibacterial action (Scheme 1).

## 2. Results and Discussions

### 2.1. Preparation of Gelatin/Vanillin/ $\text{Fe}^{3+}$ Hydrogels (GVF Hydrogels)

A self-healing hydrogel based on gelatin was prepared using vanillin and  $\text{Fe}^{3+}$  acting as dual crosslinking agents as displayed in Scheme 1. The aldehyde group of vanillin is capable of forming Schiff-base bonds with the amino groups of gelatins, while the hydroxyl group of vanillin could form hydrogen bonding with the hydroxyl or amino groups of another gelatin molecule. The amino groups of gelatins and the hydroxyl group of vanillin also form ionic coordination with  $\text{Fe}^{3+}$ , which further drives the construction of a reversibly-bonded hybrid network. The Schiff-base reaction of vanillin and gelatin was confirmed by nuclear magnetic resonance ( $^1\text{H-NMR}$ ) spectroscopy,<sup>[25,26]</sup> with the imine bond between gelatin and vanillin showing a proton signal at 8.43 ppm (Figure S1, Supporting Information). Additionally, ATR-FTIR spectra were used to confirm the formation of Schiff-base bonds and hydrogen bonds of hybrid linkages. Gelatin is composed of polypeptide chains consisting of different amino acids arranged in a unique order. The presence of O–H stretching vibrations was indicated by the broad peak at  $3280\text{ cm}^{-1}$ , while the peak at  $1630\text{ cm}^{-1}$  was characteristic of C=O stretches, and the peaks at  $1531\text{ cm}^{-1}$  corresponded to N–H bending vibration (Figure S2, Supporting Information). The formation of Schiff-base bonds between the amino group of gelatin and the aldehyde group of vanillin was confirmed by the appearance of a new peak at  $1585\text{ cm}^{-1}$  corresponding to the C=N stretching vibration.<sup>[23,27]</sup> However, this C=N peak of the imine bond overlapped with the peak of C=O stretches in the case of the GVF hydrogel.

UV-visible diffuse reflectance spectroscopy was used to investigate the interactions of the polymer network in the hydrogels (Figure S3a, Supporting Information). One absorption band centered at 500 nm (blue line) was exhibited by gelatin/ $\text{Fe}^{3+}$ , which could indicate the formation of a complex between the gelatin and  $\text{Fe}^{3+}$  ion. An absorption band at 440 nm (red line) was exhibited by gelatin/vanillin, which may indicate the presence of an imine bond. Furthermore, the creation of the polymer network was confirmed by the characteristic peak of both vanillin and gelatin/ $\text{Fe}^{3+}$  in the GVF-9 (black line indicating as GVF hydrogel). Thermogravimetric analysis revealed that gelatin, gelatin/vanillin, and GVF hydrogel underwent decomposition in two main steps, as shown in Figure S3b, Supporting



**Scheme 1.** Schematic of andrographolide-silver nanoparticle (AGP-AgNPs) synthesis, their incorporation into gelatin/vanillin/Fe<sup>3+</sup> hydrogels, and analysis of wound healing applications of the composite materials in real animal models.

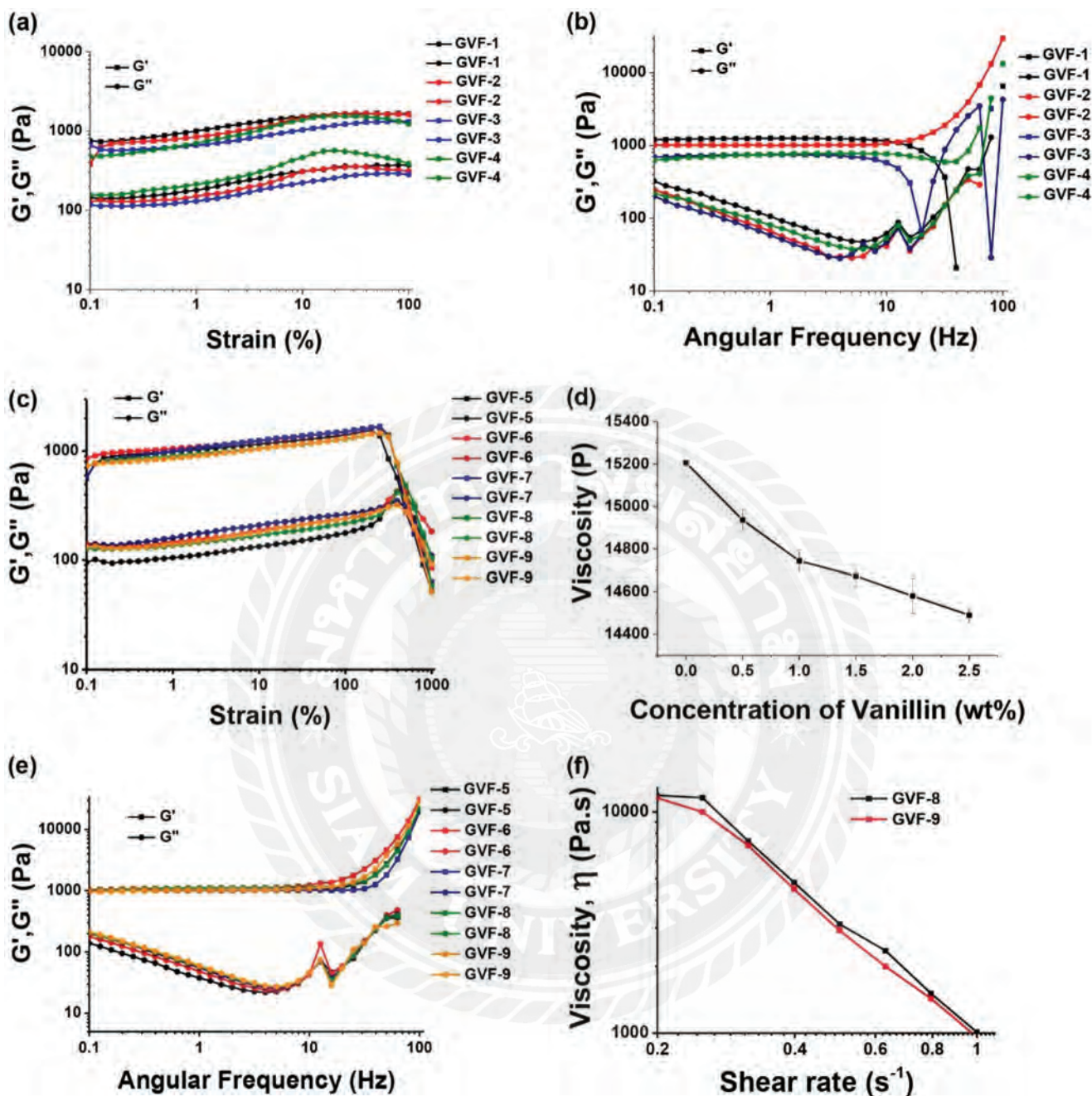
Information. The loss of residual water in the polymers was assigned to the first region of the TGA curve at 30 °C and 100 °C. The second region from 250 °C to 400 °C of the TGA curve is attributed to the degradation of cross-linked gels. In this zone, GVF shows lower weight loss than gelatin/Fe<sup>3+</sup>, indicating that GVF is more stable, presumably due to higher cross-linkage density which correlates strongly with stability.

## 2.2. Characterizing the Viscoelastic Properties: Rheological Measurements

Different concentrations of FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O were used to synthesize GVF-1 to GVF-4, as described in Section 2.2. Mechanical properties of the hydrogels were measured via rheology tests. The material's elastic properties and energy storage were reflected by the storage modulus ( $G'$ ) after perturbation, while the viscous properties and energy loss were reflected by the loss modulus ( $G''$ ) through relaxation or dissipated heat. In a gel with a strong, covalently-linked network, the  $G'$  modulus would be expected to be larger than the  $G''$  modulus, indicating that the material is able to store more energy than it loses during deformation.<sup>[28,29]</sup> The rheology technique was utilized to investigate the elastic properties of all hydrogels under the strain sweep (0.1%–100%) mode (Figure 1a). All samples demonstrated a higher storage modulus ( $G'$ ) than loss modulus ( $G''$ ), suggesting that the hydrogel networks were rigid and cross-linkage remained intact under large deformations.<sup>[30]</sup> It was observed that GVF-1 and GVF-2 exhibited a higher  $G'$  compared to the other samples, suggesting that the strength of the hydrogels at those concentrations was greater than that of the other concentrations. The  $G'$  and  $G''$  of GVF-1 to GVF-4 were measured at a fixed strain of 0.15% in a frequency range of 0.1 to 100 Hz during the frequency sweep test.

The results are presented in Figure 1b, where all samples showed a higher  $G'$  than  $G''$ , and were stable as the frequency increased from 0.1 Hz to  $\approx 30$  Hz, indicating that the hydrogels possessed strength and stability. However, GVF-2 (10 mM FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O) was chosen as the most suitable concentration for the following research as it exhibited the highest stability even at frequencies up to 100 Hz.

GVF-5 to GVF-9 hydrogels were synthesized by using different concentrations of vanillin while keeping the concentration of FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O fixed at 10 mM (Table S2, Supporting Information). Rheology was employed to measure the viscoelastic properties of these hydrogels under strain sweep (0.1%–100%) (Figure 1c). The results indicated the formation of a strong gel with a covalently-linked network, as all samples showed  $G'$  larger than  $G''$ . However, an inverse relationship was observed between the hardness of the GVF hydrogel and the vanillin content. This finding was further confirmed by using a Brookfield viscometer (Figure 1d). In the frequency sweep test,  $G'$  and  $G''$  of GVF-5 to GVF-9 were measured in a range of frequencies from 0.1 to 100 Hz at a fixed strain of 0.15% (Figure 1e). From Figure 1e, it is evident that the softness of the hydrogels increased with increasing vanillin content, as indicated by the increase in  $G''$ . This property is desirable for biomedical applications. GVF-8 and GVF-9 exhibited the highest softness among all samples. Therefore, GVF-8 and GVF-9 were used for the investigation of shear-thinning properties (Figure 1f). A shear rate sweep measurement was performed under rotation mode (from 0.1 to 1 s<sup>-1</sup>) to confirm the shear-thinning behavior of the gel for injectability. Both GVF-8 and GVF-9 exhibited shear-thinning properties, indicating injectability. However, the viscosity of GVF-9 as a function of shear rate was lower than that of GVF-8, indicating better injectability. Therefore, GVF-9 (GVF hydrogel) was selected as the most suitable condition for subsequent wound healing studies.

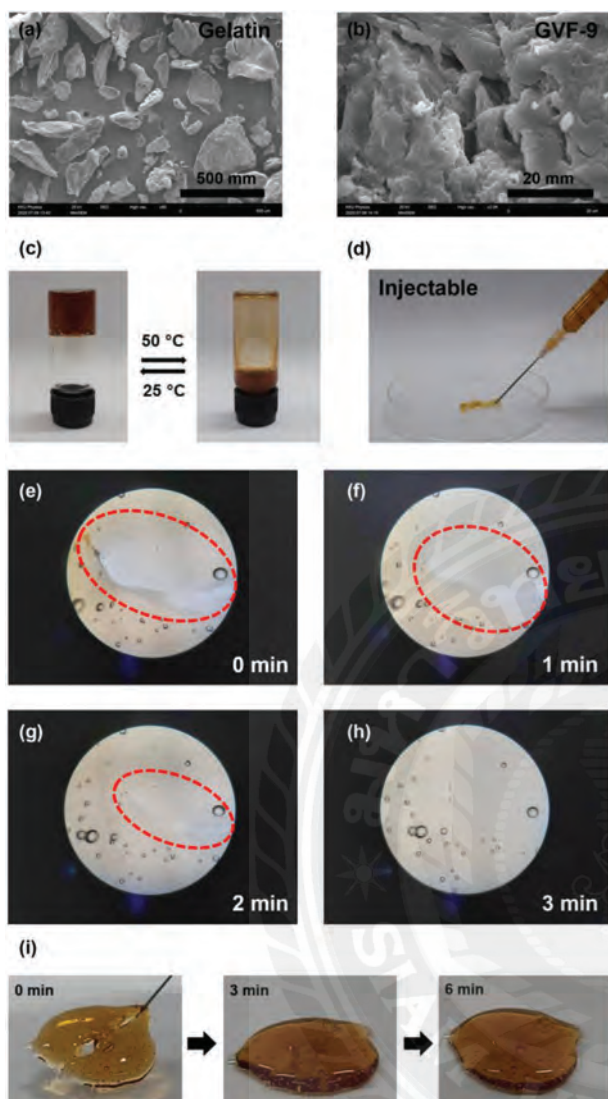


**Figure 1.** The storage and loss moduli of GVF hydrogels with varying concentrations of  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  (GVF-1 to GVF-4), measured by a) strain amplitude (structural collapse occurred above 100%) and b) frequency sweep experiments. The storage and loss moduli of GVF hydrogels with different wt.% of vanillin were measured by c) strain amplitude and d) viscosity, e) the frequency sweep experiments for GVF hydrogels with varying concentrations of vanillin (GVF-5 to GVF-9), and f) the shear-thinning property of GVF-8 and GVF-9.

### 2.3. Analyzing the Morphology of the GVF Hydrogel and its Self-Healing Properties

The SEM images of gelatin powder and GVF hydrogel were investigated as depicted in **Figure 2a,b**, respectively. The surface morphology of the gelatin powder was characterized by nodules and flakes. In contrast, the GVF hydrogel exhibited a remarkable morphology, with scaly and fragmented material

displaying vast gaps. This porous structure facilitates aqueous fluid diffusion within the polymeric network, thereby increasing the swelling capacity of the final hydrogel. Furthermore, the uniformly dispersed pore spaces on the surface of the GVF hydrogel indicate a homogeneous composition of the absorbent material.<sup>[31]</sup> Such a structure is a good candidate for wound-healing materials as large amounts of exudates or blood could be absorbed by the material, which also acts as a barrier to microor-



**Figure 2.** SEM images of a) gelatin powder and b) GVF hydrogel (under freeze-dried process), c) the reversible formation of GVF hydrogel in various temperature conditions, d) the injectability of the GVF hydrogel through a 1.2 mm internal diameter needle, e-h) digital microscope investigation of the GVF hydrogel's self-healing properties at various times and i) macroscopic investigation of the GVF hydrogel's self-healing properties at various times after being slit with a needle.

ganisms, and maintains a moist environment at the skin defect site.<sup>[32–34]</sup>

Reversible GVF hydrogel formation in different temperature conditions was observed as shown in Figure 2c. It was noted that at high temperature, the hydrogel broke down to form liquids, but it quickly returned to gel-form when cooled down. The injectable nature of the hydrogel through a 1.2 mm internal diameter needle/syringe is depicted in Figure 2d. Upon squeezing the hydrogel in the syringe, the pressure caused the cross-linkages to dissociate, causing the hydrogel to distort and “flow” like a liquid through the thin needle. The hydrogel showed fast self-healing capabilities, as the extruded hydrogel joined together to create an integrated component once more. It can be inferred

that the hydrogel may be used to encapsulate cells/drugs uniformly and implant them into tissue using a minimally invasive technique.<sup>[33]</sup> Investigation of the self-healing properties of GVF hydrogel was conducted using a digital microscope, as depicted in Figure 2e-h. Damage to the hydrogel was created by a slitting needle, as shown in Figure 2e. GVF hydrogel subsequently exhibited excellent self-healing properties, attributed to the dual, facile crosslinking via imine bond and ionic bonds as mentioned earlier. The GVF hydrogel displayed a gradual reduction in the depth of the scratch, with complete self-healing after 10 min as illustrated in Figure 2h. In addition, a macroscopic test for hydrogel self-healing was performed as shown in Figure 2i and Video S1, Supporting Information. The results show that the hydrogel was fully recovered/healed after being damaged by the needle within 6 min, as observed by the naked eye.

#### 2.4. Water Absorption by GVF Hydrogel

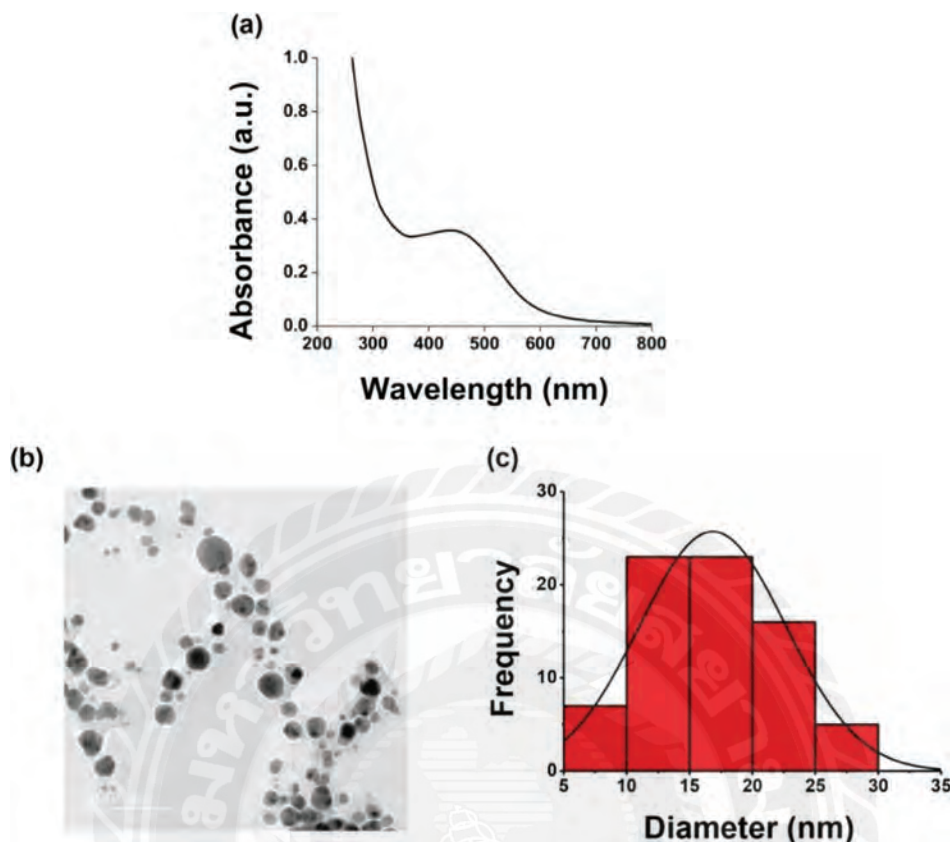
The hydrogels' water uptake was characterized by their swelling ratio. The swelling behavior of GVF hydrogel was studied by incubating it in DI water at room temperature for different curing times. The hydrogels exhibited an extremely high swelling degree, reaching equilibrium at 110 min, with a swelling degree of up to 17000%, as illustrated in Figure S4, Supporting Information. This exceptional moisture uptake makes GVF hydrogel an ideal candidate for maintaining a moist wound environment and absorbing significant amounts of wound exudate, both critical factors in promoting accelerated wound healing.<sup>[34,35]</sup>

#### 2.5. Synthesis and Characterization of Andrographolide-Silver Nanoparticles (AGP-AgNPs)

Andrographolide-silver nanoparticles (AGP-AgNPs) were synthesized by a simple routine as described in Section 2.3. AGP-AgNPs exhibited a characteristic UV-Vis spectrum at 441 nm (Figure 3a), resulting from localized surface plasmon resonances (LSPR). The transmission electron microscope (TEM) image of AGP-AgNPs (Figure 3b) showed a narrow size distribution and a spherical or pseudospherical shape with a diameter averaging  $16.85 \pm 5.81$  nm ( $n = 75$ ) (Figure 3c). In any case, these results suggest the successful synthesis of stable colloidal AGP-AgNPs which may have desirable antibacterial properties when combined with the hydrogel.<sup>[14]</sup>

#### 2.6. Cytotoxicity Studies and Protective Effect of AGP-AgNPs Towards H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Induced Oxidative Stress in Fibroblasts

In this study, it was found that AGP-AgNPs had low cytotoxicity, with over 80% of fibroblast cells remaining viable when 0.0032 nM of AGP-AgNPs were incubated. However, cell survival decreased when concentrations of AGP-AgNPs ranging from 0.0008 nM to 0.0032 nM were used (as shown in Figure S5a, Supporting Information). Therefore, AGP-AgNPs could be considered noncytotoxic at or below a concentration of 0.0032 nM. Hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) is a reactive oxygen species (ROS) that causes oxidative stress. The damage induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in



**Figure 3.** Characterization of Andrographolide-silver nanoparticles (AGP-AgNPs) exhibiting a) characteristic UV-vis spectrum at 441 nm, b) TEM image displaying a narrow size distribution with spherical and pseudospherical shape, and c) the average diameter of AGP-AgNPs;  $16.85 \pm 5.81$  nm ( $n = 75$ ).

fibroblast cells can be assessed using an MTT assay.<sup>[36]</sup> Andrographolide is a compound that has been studied for its ability to prevent oxidative stress. In previous studies, it was found that Andrographolide protected chondrocytes (a type of cartilage cell) from  $H_2O_2$ -induced injury by activating the Keap1-Nrf2-ARE pathway.<sup>[37]</sup> Additionally, it was found that Andrographolide protected liver cells from  $H_2O_2$ -induced cell death by signaling through the adenosine A2a receptor and upregulating Nrf-2 transcription.<sup>[38]</sup>

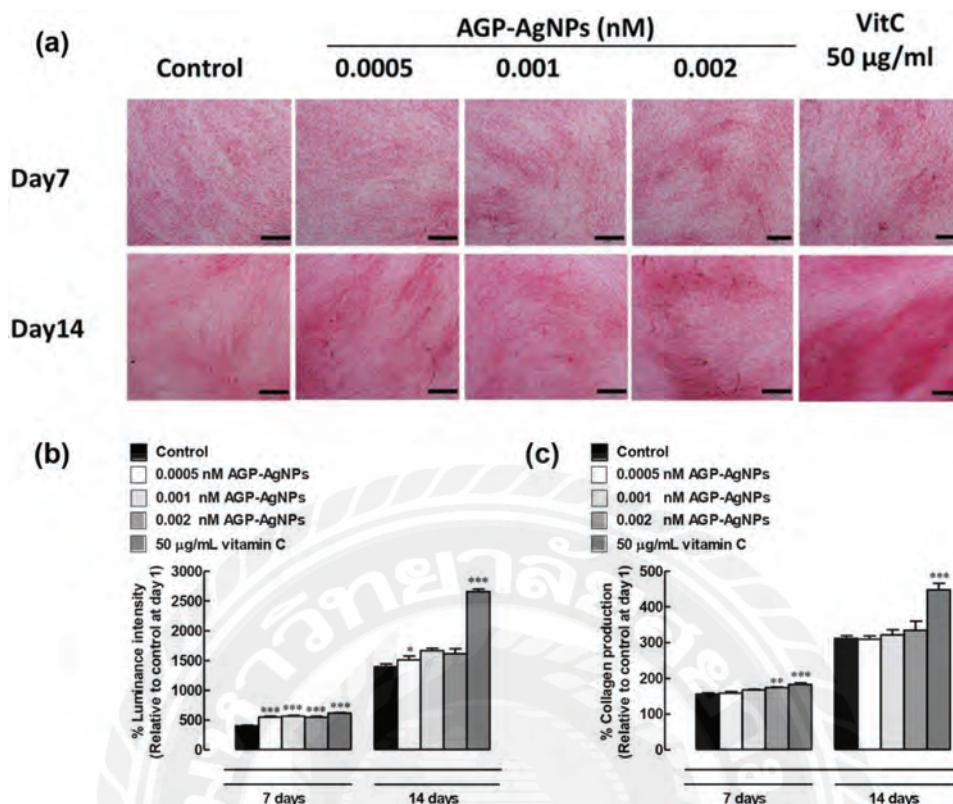
To investigate the protective effect of AGP-AgNPs against  $H_2O_2$ -induced oxidative stress, fibroblasts were pretreated with 0.001, 0.002, and 0.004 nM of AGP-AgNPs for 24 h before being exposed to  $H_2O_2$  for an additional hour. The cytotoxicity of AGP-AgNPs was first checked, as depicted in Figure S5b, Supporting Information. When treated with 50 and 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  of  $H_2O_2$ , cell viability significantly decreased by  $\approx 25\%$  and 40%, respectively. However, pretreatment with 0.001 and 0.002 nM of AGP-AgNPs followed by 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  of  $H_2O_2$  exposure significantly increased cell survival compared to  $H_2O_2$  treatment alone. In addition, at a higher concentration of AGP-AgNPs (0.004 nM), a different trend emerges when exposed to 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$   $H_2O_2$ . It is possible that at this concentration, AGP-AgNPs may start exhibiting cytotoxic effects themselves due to the high concentration of silver nanoparticles. This could result in a compromised antioxidant effect and a less favorable cellular outcome, as indicated in Figure S5b. The complicated interaction between the concentration-dependent effects of AGP-AgNPs and their spe-

cific cellular response to oxidative stress is a possible reason for the observed discrepancy.

Interestingly, at 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$   $H_2O_2$ , the best protective effect is observed at the concentration of AGP-AgNPs of 0.004 nM. This finding suggests that under a more severe oxidative stress environment, a higher concentration of AGP-AgNPs may be required to counteract the detrimental effects and maintain cellular viability. It is plausible that the antioxidant and cellular protective mechanisms induced by AGP-AgNPs become more pronounced at this higher  $H_2O_2$  concentration, leading to the observed favorable outcome. At higher concentrations of  $H_2O_2$  (100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), pretreatment with AGP-AgNPs increased the viability of fibroblast cells in a dose-dependent manner. These results suggest that AGP-AgNPs could protect fibroblasts against oxidative stress induced by  $H_2O_2$ .

### 2.7. The Effect of AGP-AgNPs on Cell Proliferation and Collagen Production in Human Dermal Fibroblast Cells

In this section, we investigate the impact of AGP-AgNPs on the proliferation of human fibroblast cells, and on the production of collagen. After being treated with 0.0005, 0.001, and 0.002 nM of AGP-AgNPs for 7 days, cell proliferation increased significantly when compared to the control group. This increase was similar to the one observed in the positive control group treated with internal control of ascorbic acid. (Figure 4a). Additionally,



**Figure 4.** a) Light transmission microscopy images of human dermal fibroblast cells which were treated with various concentrations of AGP-AgNPs (0.0005, 0.001, and 0.002 nM) and ascorbic acid (Vitamin C) at 50 µg mL<sup>-1</sup> for 7 and 14 days, cell proliferation was measured and collagens were stained red with Picrosirius dye and imaged at 200 × magnification. The scale bar located in the lower right corner represents a length of 200 µm. b) % Luminance intensity and c) % Collagen production of previously treated human dermal fibroblast cells. The results are presented as mean ± SEM ( $n = 4$  per group). Statistical significance was calculated by comparing the treatment groups with the control group within 7 or 14 days after treatment (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , and \*\*\* $P < 0.001$ ).

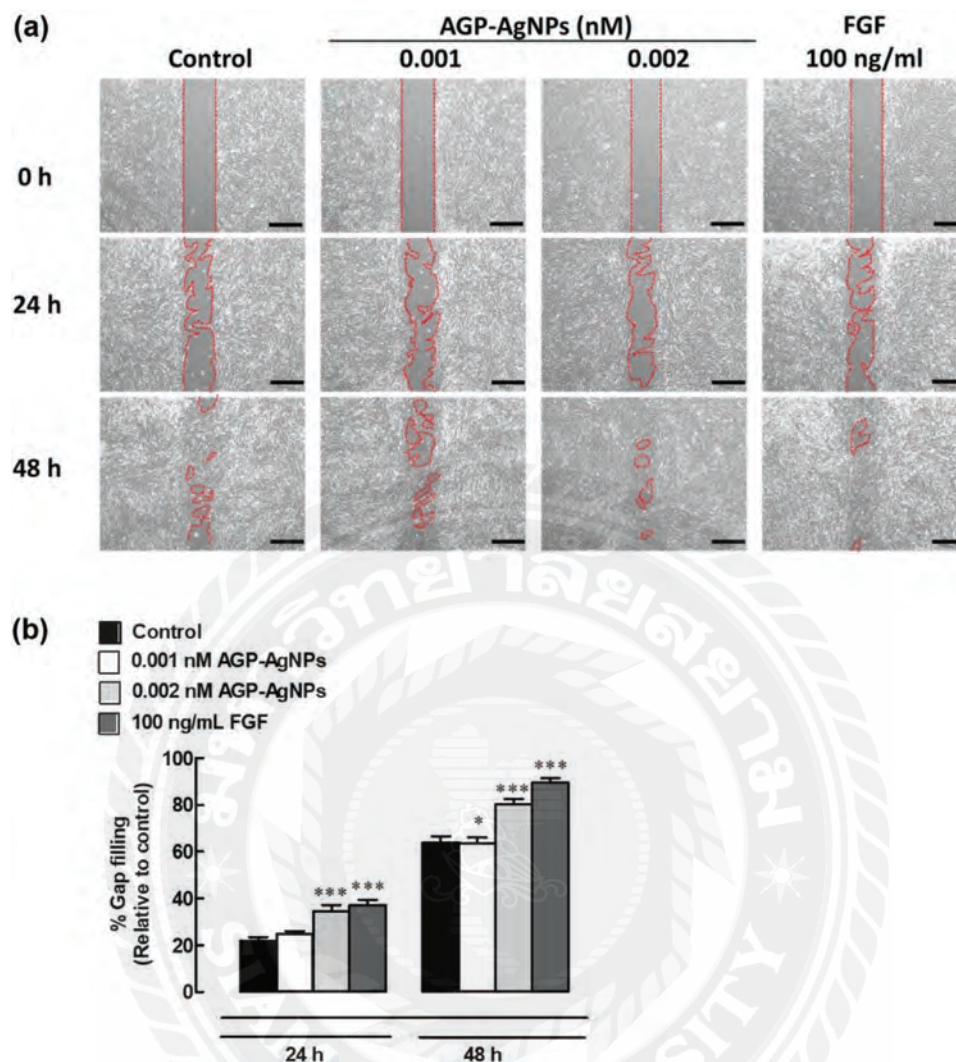
the 0.001 nM of AGP-AgNPs treatment significantly increased cell proliferation compared to the control group, while ascorbic acid notably increased cell proliferation after 14 days of incubation (Figure 4a). Therefore, AGP-AgNPs showed a greater potential in enhancing cell proliferation and collagen production in fibroblasts compared to the control group. In terms of total collagen, which was indicated by Picrosirius red staining (Figure 4b), cells treated with 0.0005, 0.001, and 0.002 nM of AGP-AgNPs and ascorbic acid showed an increase in collagen production by 2%, 11%, 18%, and 26% after 7 days compared to the control group (no AGP-AgNPs). However, after 14 days of treatment, the three tested AGP-AgNP concentrations and ascorbic acid treatment increased collagen production by 6%, 24%, 47%, and 152%, respectively, compared to the control group (Figure 4c). These findings suggest that exposure to AGP-AgNPs could enhance cell proliferation and collagen production in fibroblasts.

### 2.8. Investigating the Influence of AGP-AgNPs on In Vitro Wound Healing

The process of wound healing typically involves three overlapping phases: hemostasis/inflammation, proliferation, and remodeling.<sup>[39]</sup> Fibroblast growth factor (FGF) plays a crucial role

in in vitro wound healing. FGF stimulates the proliferation and migration of fibroblasts, which are the main cells involved in the formation of new tissue in the wound healing process by generating extracellular matrix (ECM) and collagen structures.<sup>[40,41]</sup> Moreover, several studies have shown that *Andrographolide's* antioxidant activity occurs in parallel with other wound healing drivers including regulating vascular blood flow and delaying cell necrosis.<sup>[42,43]</sup> In addition, *Andrographis paniculata* (*A. paniculata*) extracts also promoted re-epithelialization activity in wound areas in rats.<sup>[43,44]</sup> In vivo study of the effect of *A. paniculata* leaf extract on wound healing suggested that it enhanced the rate of wound closure in rats.<sup>[45]</sup>

Here, AGP-AgNPs were shown to significantly increase wound gap closure in a time-dependent manner (Figure 5a,b). Treatment with 0.001 and 0.002 nM of AGP-AgNPs and 100 ng mL<sup>-1</sup> of fibroblast growth factor (FGF) for 24 h increased cell migration by 25%, 33%, and 37% compared to the control, while 48 h treatment promoted 60%, 82%, and 90%, respectively. Treatment with 0.001 and 0.002 nM AGP-AgNPs for 24 h significantly increased wound gap filling (by 1.1 and 1.5 times, respectively), whereas only 0.002 nM AGP-AgNPs treatment induced significant wound gap filling (1.3 times better than untreated control) at 48 h. Notably, the wound gap closure induced by 0.002 nM AGP-AgNPs was similar to that of the FGF-positive control. These



**Figure 5.** Effects of AGP-AgNPs on wound gap closure. a) Human dermal fibroblast cells were treated with 0.001 and 0.002 nM of AGP-AgNPs, or 100 ng mL<sup>-1</sup> of FGF as a positive control, and a scratch wound assay was performed at 0, 24, and 48 h. The scale bar located in the lower right corner represents a length of 500  $\mu$ m. b) Percentage of wound gap filling relative to the original scratch width. Data were expressed as mean  $\pm$  SEM ( $n = 4$ ). \* $P < 0.05$  and \*\*\* $P < 0.001$  compared to control within 24 h or 48 h post-treatment.

results suggest that 0.002 nM AGP-AgNPs treatment displayed wound healing properties as potent as the FGF positive control.

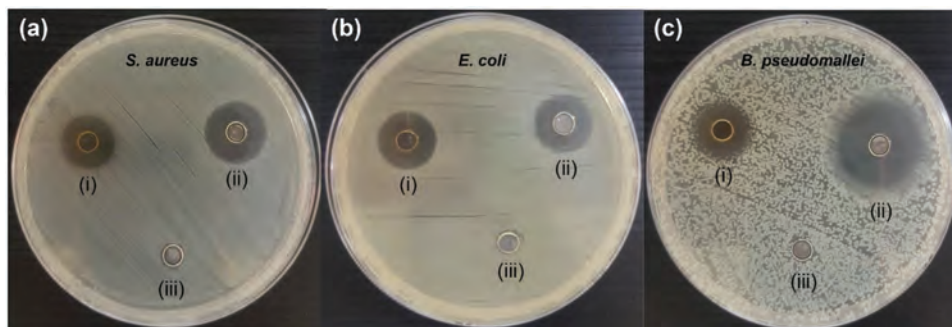
## 2.9. Enhanced Mechanical and Self-Healing Properties of GVF/AGP-AgNPs Nanocomposite

The effect of AGP-AgNPs on the mechanical properties of GVF hydrogel was investigated next by rheological measurement. The self-healing ability of the GVF/AGP-AgNPs hydrogel composite was also examined. Under strain sweep system, storage modulus ( $G'$ ) of the GVF/AGP-AgNPs hydrogels was greater than the loss modulus ( $G''$ ) (Figure S6a). It is assumed that the increased interactions between the hydrogels and AGP-AgNPs via electrostatic effects resulted in improved hydrogel stability during the angular frequency sweep, as shown in Figure S6b.<sup>[46]</sup> Upon cutting the GVF/AGP-AgNPs hydrogel into two pieces, the divided blocks

were immediately brought back into contact. After 10 min, the self-healed gel regained its full rheological properties, exhibiting similar strain-stiffening and strain-at-breakage as the uncut hydrogel (Figure S6c). All of these findings demonstrated the exceptional gelling and self-healing abilities of the double cross-linked GVF/AGP-AgNPs hydrogels.

## 2.10. Antibacterial Activity of GVF/AGP-AgNPs Hydrogels

Antimicrobial activity of GVF/AGP-AgNPs hydrogel was evaluated by diffusion test as demonstrated in Figure 6. The GVF/AGP-AgNPs hydrogel exhibited strong antimicrobial activity against both gram-positive *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) and gram-negative bacteria *Escherichia coli* (*E. coli*), forming zones of inhibition of diameters  $12.92 \pm 1.66$  mm and  $17.00 \pm 0.90$  mm, respectively (Table 1). Furthermore, the antimicro-



**Figure 6.** Antimicrobial activity of GVF/AGP-AgNPs hydrogel against a) *S. aureus* ATCC25923, b) *E. coli* O157/H7, and c) *B. pseudomallei* 1026b in which (i) GVF/AGP-AgNPs hydrogel, (ii)  $16 \mu\text{g mL}^{-1}$  gentamicin for *S. aureus* ATCC25923 and *E. coli* O157/H7, and  $64 \mu\text{g mL}^{-1}$  ceftazidime for *B. pseudomallei* 1026b, and (iii) deionized water were used.

**Table 1.** Zone of inhibition in millimeters of GVF/AGP-AgNPs hydrogel and standard drugs (gentamicin and ceftazidime) against gram-negative and gram-positive bacteria.

Bacteria	Zone of inhibition (mm)		
	GVF/AGP-AgNPs	Gentamicin	Ceftazidime
<i>S. aureus</i> ATCC25923	$12.92 \pm 1.66$	$16.42 \pm 1.01$	–
<i>E. coli</i> O157/H7	$17.00 \pm 0.90$	$16.42 \pm 0.60$	–
<i>B. pseudomallei</i> 1026b	$13.42 \pm 0.80$	–	$23.08 \pm 0.88$

Mean value  $\pm$  SD, the means for triplicate samples. Inhibition zone includes a diameter of the well. Positive controls are  $16 \mu\text{g mL}^{-1}$  gentamicin and  $64 \mu\text{g mL}^{-1}$  ceftazidime.

bial properties of GVF/AGP-AgNPs hydrogel against *Burkholderia pseudomallei* (*B. pseudomallei*) were investigated. *B. pseudomallei* is a gram-negative bacteria endemic to tropical regions, particularly Thailand and northern Australia,<sup>[47]</sup> infecting humans and animals and causing the disease melioidosis. Surprisingly, GVF/AGP-AgNPs hydrogel exhibited a strong ability to inhibit *B. pseudomallei* bacteria, with an inhibition zone of  $13.42 \pm 0.80$  mm. Previous studies revealed that the nanocomposite hydrogel possesses antimicrobial properties.<sup>[48,49]</sup> In addition, these results suggest that the GVF/AGP-AgNPs hydrogels have potential as antimicrobial agents for combating this human pathogen.

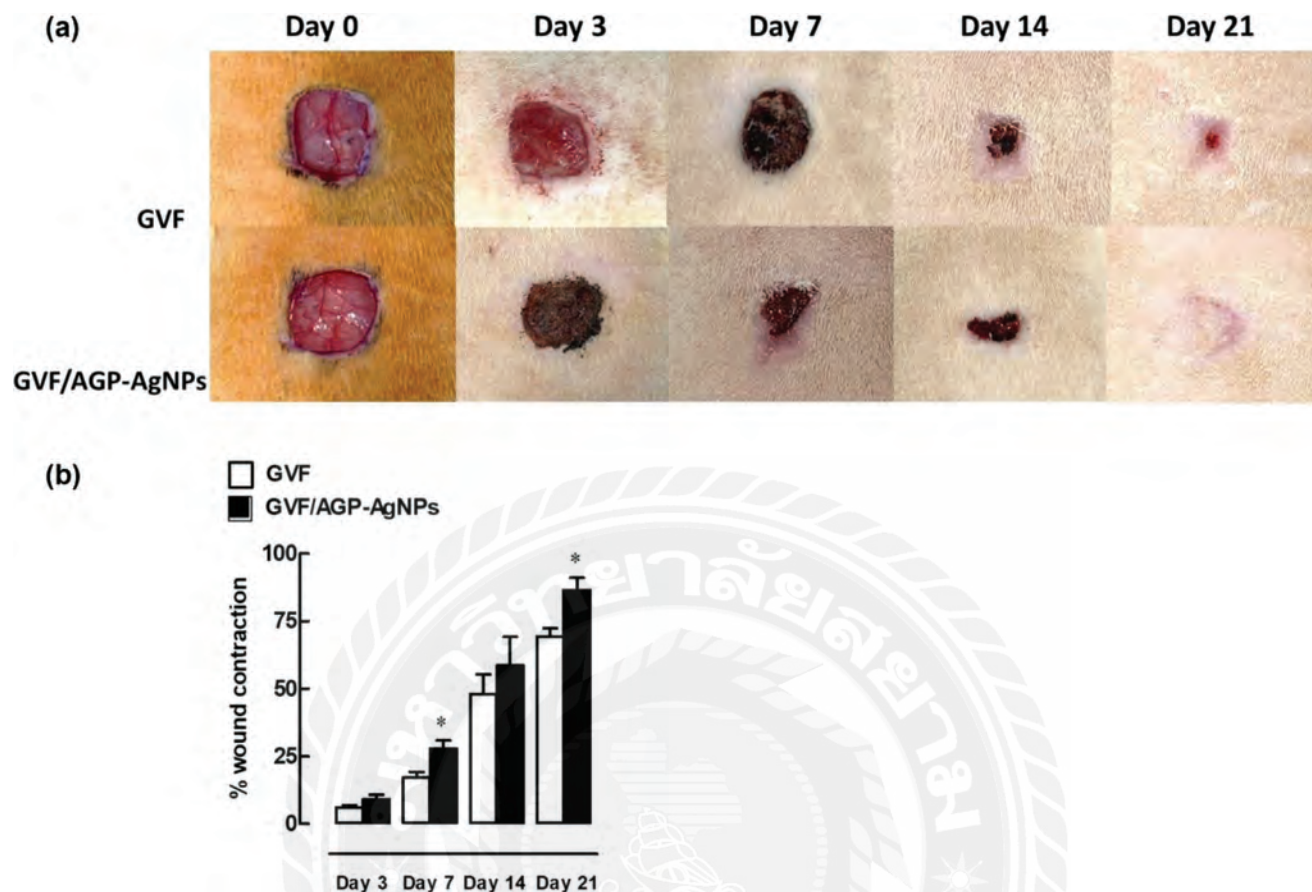
### 2.11. The Effect of GVF/AGP-AgNPs Hydrogel on Wound Healing and Tissue Regeneration in Rats

Wound healing experiments were undertaken in the presence of the GVF/AGP-AgNPs, and a GVF hydrogel control, as described in Section 2.11. Wound contraction and re-epithelialization developed continuously, as evidenced by **Figure 7** and **Figure S7**, Supporting Information. The GVF/AGP-AgNPs hydrogel however induced faster wound contraction than the GVF hydrogel (**Figure 7a**). The percent wound contraction was significantly higher in the GVF/AGP-AgNPs hydrogel-treated group compared to the GVF hydrogel group on both the 7<sup>th</sup> and 21<sup>st</sup> days after wounding incisions. The tissue showed an enhanced contraction of 20% and 17% on the 7<sup>th</sup> and 21<sup>st</sup>-day post-treatment, respectively, for the GVF/AGP-AgNPs hydrogel as shown in **Figure 7b**.

We next evaluated the percent re-epithelialization of rat skin after a wound was created, by histopathological examination, again for the GVF/AGP-AgNP and GVF hydrogel control treatment. The examination was done on days 7, 14, and 21 after the wound was created, and the samples were stained using Hematoxylin & Eosin. The results are shown in **Figure S7a**, Supporting Information. During the process of re-epithelialization, new epithelial cells migrate from the edges of the wound and grow over the wound bed to form a continuous layer of epithelial tissue.<sup>[50]</sup> In the H&E-stained tissue slide (as shown in **Figure S7a**, Supporting Information), re-epithelialization can be identified by the presence of a stratified squamous epithelium covering the wound bed. The effectiveness of GVF/AGP-AgNPs hydrogel treatment on re-epithelialization can be evaluated by examining the tissue slides on day 14 and day 21 after treatment. The percentage of wound re-epithelialization was higher in the GVF/AGP-AgNPs hydrogel-treated group on days 14 and 21 after wound incisions, with 23.27% and 13.34% higher re-epithelialization observed at 7- and 21-days post-treatment, respectively, compared to the percentage of re-epithelialization in the GVF hydrogel group (as shown in **Figure S7b**, Supporting Information). The faster wound contraction and re-epithelialization by the GVF/AGP-AgNPs hydrogel might be due to the stimulation of interleukin 6, transforming growth factor (TGF)- $\beta$ 1, epidermal growth factor (EGF), and fibroblast growth factor (FGF2) that affect the function of various inflammatory cells and fibroblasts.<sup>[51]</sup> These growth factors have been linked to the underlying mechanism of fibroblast-derived intracellular communication and the induction of rapid granulation of the proliferative phase in wound healing.<sup>[51,52–53]</sup>

Additionally, the micrographs of rat skin wounds demonstrated clear differences in cell populations between treatment with GVF/AGP-AgNPs hydrogel and the GVF gel control (**Figure 8a**, Supporting Information). The number of mononuclear and polymorphonuclear leukocytes significantly decreased in the wound area at 14- and 21-days post-treatment with GVF/AGP-AgNPs compared to GVF, indicating a faster transition from the inflammatory phase of healing to the proliferation phase (**Figure 8b–c**). The number of blood vessels also increased on day 14, indicating faster wound healing by providing the necessary nutrients and oxygen to the healing tissue (**Figure 8d**). Furthermore, the number of fibroblast cells greatly increased on day 21 relative to GVF, indicating that the proliferative phase also commenced faster (**Figure 8e**).





**Figure 7.** Effects of GVF/AGP-AgNPs on wound healing in rats. a) Time-dependent evolution of rat skin wound closure observed after treatment with the hydrogels (GVF control, and the GVF/AGP-AgNPs hydrogel composite). b) Percentage of wound area contraction calculated on days 3, 7, 14, and 21 post-wound incisions for treatment with GVF or GVF/AGP-AgNPs hydrogel composite. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM ( $n = 3$  per time point). \* $P < 0.05$  compared to the control on the day of the experiment.

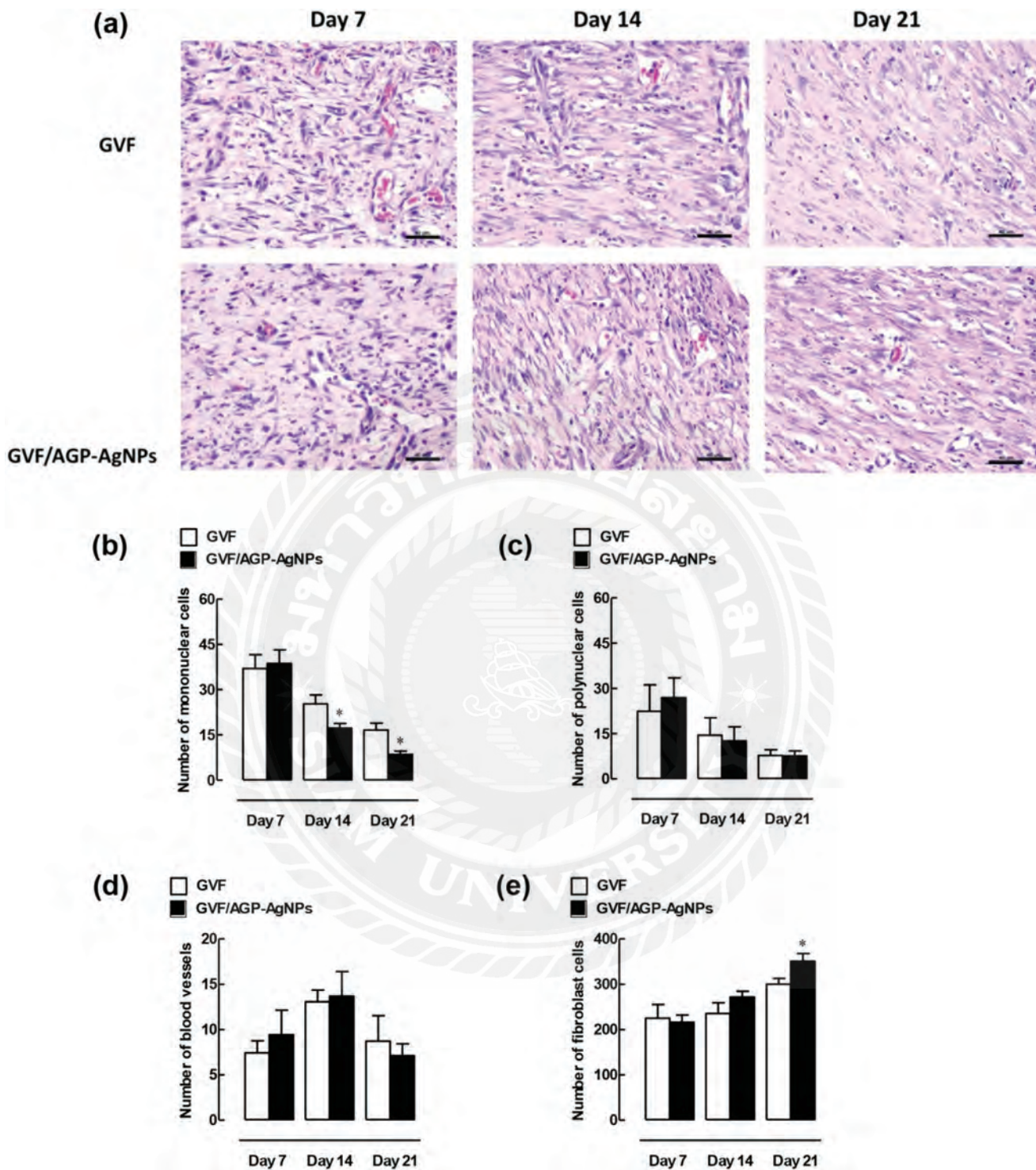
Formation of collagen fibers was examined for the rat skin tissues treated with GVF/AGP-AgNPs, and GVF hydrogel only, by Masson's trichrome stain as shown in Figure S8a. Collagen is a vital protein in tissues that supports their structure and plays an essential role in wound healing. It facilitates cell migration, proliferation, and differentiation necessary for the process.<sup>[54]</sup> Masson's trichrome stain is used to quantify collagen fibers in wound healing studies by coloring them blue, while muscle fibers are colored red and cell nuclei are black or brown. The synthesis and deposition of collagen are essential for the resurfacing of a wound with new epithelium. While collagen deposition naturally decreases over the course of wound healing, the application of GVF/AGP-AgNPs hydrogels significantly increased collagen synthesis at the wound site on day 14 after surgical incision, as shown in Figure S8b. Specifically, the hydrogels increased collagen synthesis by 76%, compared to 60% in the control group. These results suggest that GVF/AGP-AgNPs hydrogels effectively promote tissue proliferation during wound healing.

Generally, new collagen fibers and capillaries restore structure and circulation during the proliferative phase. Moreover, fibroblasts promote the production of matrix proteins, such as collagen, elastin, and proteoglycans, which lead to granulation and epithelialization.<sup>[55]</sup> The findings here are consistent with

those of a previous study that showed that guar gum (GG) and curcumin-stabilized silver nanoparticles (GG/Cur-AgNPs) reduced inflammation by decreasing monocytes and polymorphonuclear leukocytes, and by increasing collagen deposition and re-epithelialization during rat skin wound healing.<sup>[51]</sup> Furthermore, fibroblasts and monocytes respond to immune-related processes for tissue regeneration.<sup>[56]</sup> Our results suggest that the GVF/AGP-AgNPs hydrogel enhances the transition to the proliferative phase by recruiting monocytes, fibroblasts, and collagen deposition, which subsequently facilitate epithelialization (wound healing).

### 3. Conclusions

This study focused on the preparation and characterization of self-healing, cross-linked gelatin/vanillin/ $\text{Fe}^{3+}$  hydrogels by spectroscopy, rheology, and microscopy. The GVF-9 hydrogel (GVF hydrogel) was found to be more stable to deformation and more suitable as an injectable material. The GVF hydrogel showed a high swelling degree, indicating its ability to absorb fluid from a wound, which can lead to faster healing. In addition, Andrographolide-silver nanoparticles (AGP-AgNPs) were synthesized and their cytotoxicity and protective effect against



**Figure 8.** Histopathology of rat skin was assessed on days 7, 14, and 21 following wound incision, stained with Hematoxylin & Eosin. a) Micrographs show sections of wound incision in rat skin treated with hydrogels (GVF control and GVF/AGP-AgNPs). The number of b) mononuclear leukocytes, c) polymorphonuclear leukocytes, d) blood vessels, and e) fibroblasts, counted in 10 high-power fields (HPFs) at 400× magnification. The scale bar located in the lower right corner represents a length of 40 μm. The data are expressed as mean ± SEM ( $n = 3$  per time point). \* $P < 0.05$  indicates a significant difference compared to the control on the day of experiments.

oxidative stress in fibroblasts were studied. The impact of AGP-AgNPs on the proliferation of human fibroblast cells and their production of collagen was also investigated. The results showed that a 0.002 nM AGP-AgNPs treatment had wound-healing properties as potent as the fibroblast growth factor (FGF) positive control. Furthermore, the enhanced mechanical and self-healing properties of the GVF/AGP-AgNPs nanocomposite were investigated. Moreover, GVF/AGP-AgNPs nanocomposite have shown excellent antimicrobial activity against both gram-positive and gram-negative bacteria, including against the bacterial pathogen that causes melioidosis. The effect of the GVF/AGP-AgNPs hydrogel on wound healing and tissue regeneration in rats was studied, and the functionalized GVF/AGP-AgNPs hydrogel exhibited an excellent wound healing process. In conclusion, this work shows clear potential for the development of anti-microbial, self-healing, and injectable formulations for biomedical and other industrial applications. The GVF/AGP-AgNPs hydrogel is also clearly a promising candidate for enhanced wound healing and tissue regeneration.

## 4. Experimental Section

**Materials:** Gelatin from porcine skin was purchased from Sigma-Aldrich, Germany. Vanillin was purchased from Sigma-Aldrich, France. Iron (III) chloride hexahydrate (97%) was purchased from Loba Chemie. Silver nitrate (99.9%) was purchased from POCH. Andrographolide (9 mg per capsule) was purchased from Khaolao. Deionized water (DI) with specific resistivity of 18.2 M $\Omega$ . cm was obtained from a RiO<sub>5</sub> Type I Simplicity 185 (Millipore water purification system). Dimethylsulfoxide (DMSO) was purchased from Riedel-deHaën, Germany. Antimicrobial activity assays used *E. coli* O157/H7, *S. aureus* ATCC25923, and *Bp. 1026b*. They were obtained from the Biochemistry Laboratory, Biochemistry Department, Faculty of Science, Khon Kaen University, Thailand. 3–4,5-Dimethylthiazol-2-yl)–2,5-diphenyltetrazolium bromide 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  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>) 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. Ascorbic acid, direct red 80, and picric acid were purchased from Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, and absolute ethanol, hydrochloric acid 37% (HCl), and sodium hydroxide (NaOH) were purchased from Carlo erba. Paraformaldehyde, hematoxylin, and eosin reagents were purchased from Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, and slide mounting solution was purchased from Fisher Permout Mounting Medium, UK. The <sup>1</sup>H-NMR spectra were recorded using a Bruker Avance 400 MHz spectrometer (Bruker, Germany) using D<sub>2</sub>O as a solvent.

**Preparation of Vanillin/Fe<sup>3+</sup> Cross-Linked Gelatin Hydrogels (GVF) and Gelatin Film (GVF Film):** The dual cross-linked hydrogels were prepared via a modification of a previous report.<sup>[18]</sup> The preparation of gelatin solution involved dissolving 0.48 g of gelatin in 8 mL of DI water, stirring, and heating it to 60 °C until it was completely dissolved. Subsequently, a vanillin solution of 1 mL was added to the gelatin solution, followed by the addition of 1 mL of FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O to form gelatin/vanillin/Fe<sup>3+</sup> hydrogels (GVF). The hydrogels were formed by preparing a series of Fe<sup>3+</sup> crosslinking agent solutions with different final concentrations of 0, 5, 10, 15, and 20 mM (Table S1, Supporting Information), corresponding to GVF-0, GVF-1, GVF-2, GVF-3, and GVF-4, respectively. Hydrogels with different final concentrations of vanillin were prepared by adding 0, 0.5, 1.0, 1.5, and 2.0% (w/v) of as-prepared vanillin solutions (Table S2, Supporting Information), designated as GVF-5, GVF-6, GVF-7, GVF-8, and GVF-9, respectively. GVF-9 (GVF hydrogel) will be selected as the suitable hydrogel for

further studies as described below. The prepared hydrogel was freeze-dried for solid-state UV-vis Spectra (diffuse reflectance spectra) measurement. In addition, the hydrogel was also prepared in a film form for swelling study by pouring hydrogel into a petri dish and drying in an oven at 40 °C for 24 h to prepare the GVF film which was later removed from the oven and dried at room temperature.

**Synthesis of Andrographolide-Stabilized Silver Nanoparticles (AGP-AgNPs):** The AGP-AgNPs were synthesized by a modification of a previously published method.<sup>[57]</sup> Briefly, the solution of andrographolide was prepared in 60 mL DI water using 20 capsules containing andrographolide leaf (9 mg of andrographolide/capsules) and stirred at room temperature for an hour. The solution was filtered through a microfilter to obtain a yellow solution. Silver nanoparticles were synthesized by dissolving 3 mL of the andrographolide solution in an Erlenmeyer flask containing 24 mL of DI water. Then, 3 mL of AgNO<sub>3</sub> (20 mM) was added to the mixture and stirred for 3 h at room temperature. As a result of the reduction of silver salt, the color of the solution changed from colorless to red-brown, indicating the presence of silver nanoparticles. The formation of silver nanoparticles was confirmed by UV-vis spectroscopy. Based on an extinction coefficient of 31.3  $\times 10^8$  M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> at 399.7 nm for 18 nm diameter citrate-silver nanoparticles, the concentration of andrographolide-silver nanoparticles (AGP-AgNPs) was estimated to be 0.44 nM.<sup>[58]</sup>

**Synthesis of Hydrogel Composite Containing AGP-AgNPs:** To prepare AGP-AgNPs composited in GVF hydrogels, 0.48 g of gelatin powder was added to 8 mL of AGP-AgNPs solution and heated to 60 °C until completely dissolved. Then, 1 mL of 20 wt.% vanillin in ethanol was added, followed by the addition of 1 mL of 0.1 M FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O, and the solution was mixed.

**Characterization of the Hydrogels:** The hydrogels were characterized using several analytical techniques. Attenuated Total Reflection Fourier Transform infrared (ATR-FTIR) spectra were recorded in the solid state using an ATR-FTIR spectrophotometer, and NMR spectra were obtained using D<sub>2</sub>O as solvents. UV-Vis absorption spectra were measured using an Agilent Technologies Cary 60 UV-Vis spectrophotometer, with 1.0 cm pathlength quartz cells in the range of 200–800 nm. The thermal stability of the cross-linked hydrogels was investigated by thermogravimetric analysis (TGA, Rigaku TG-8120) under a nitrogen atmosphere with a heating rate of 10 °C min<sup>-1</sup> from 25 °C to 800 °C. Solid-state UV-Vis diffuse reflectance spectra (DRS) were recorded using barium sulfate as a standard. The surface morphology of gelatin powder and freeze-dried gelatin/vanillin/Fe<sup>3+</sup> hydrogels were analyzed using Scanning Electron Microscopes (Mini SEM, SEC SNE-4500 M). Viscoelastic properties of the hydrogels were analyzed using a Brookfield viscometer Model RVDV-II+, and rheological properties were investigated using a parallel-plate rheometer (Physica MCR500, Germany) with a smooth stainless-steel plate of 25 mm diameter. The storage modulus (G') and loss modulus (G'') of the hydrogels were monitored by strain amplitude ( $\gamma_0$ ) under a strain from 0.1% to 1000% at a constant temperature (25 °C) and frequency (1 rad s<sup>-1</sup>). For angular frequency sweep experiments, G' and G'' were measured under an angular frequency range from 0.1 to 100 Hz with a fixed strain of 0.15%. Shear thinning behavior of the hydrogels was measured as a function of shear rate from 0.1 to 1 s<sup>-1</sup> using a rotation model.

**Explosive Swelling Measurements:** The swelling behavior of the hydrogels was investigated in DI water at room temperature, wherein 0.25 g of GVF hydrogel film was submerged in 20 mL water for a specified duration, and subsequently extracted while eliminating excess water using filter paper. The gels were weighed until a constant weight was achieved. The degree of swelling was calculated using:

$$\text{Swelling degree (\%)} = ((W_s - W_o) / W_o) \times 100 \quad (1)$$

where  $W_s$  is the swollen weight of the soaked hydrogel and  $W_o$  is the original weight of the dry hydrogel. All experiments were done in triplicate.

**Proliferation of Cells and Collagen Synthesis:** The CellTiter-Glo Luminescent cell viability assay kit was used to determine the cell proliferation. In brief, cells were seeded at  $2.5 \times 10^4$  cells per well in 48 well-plates and incubated for 24 h. Subsequently, cells were subjected to treatment with AGP-AgNPs (0.0005, 0.001, and 0.002 nM) and Vit C (50  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>,

indicated as a positive control) for 7 and 14 days, with the culture medium being refreshed every 2 days. After the treatment period, the culture medium was removed, and 100  $\mu\text{L}$  of lysis buffer reagent (1X) was introduced into each well. Following a 10 min incubation, 50  $\mu\text{L}$  of cell lysates were mixed with CellTiter-Glo reagent for another 10 min. Finally, the luminescence was measured using a microplate luminometer (SpectraMax L, Molecular Devices).

The Picrosirius red staining assay was utilized as a method to detect insoluble collagen fibers. Cells were initially seeded at  $2.5 \times 10^4$  cells per well in 48 well-plates and incubated for 24 h. Following this, the cells were treated with AGP-AgNPs (0.0005, 0.001, and 0.002 nM) and Vit C (50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) for 7 and 14 days. After the treatment period, the culture medium was discarded, and the cells were thoroughly washed with phosphate-buffered saline (PBS) before being fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) for 10 min. Upon fixation, the cells were washed with PBS twice and then stained with 0.1% direct red 80 (in saturated picric acid). After staining for 10 min, the dye was removed, and any excess dye was washed away by 0.01 M HCl (in 70% ethanol) twice. The stained collagen was visualized under a microscope (CKX41, Olympus, Japan), while the insoluble collagen was dissolved with 0.5 M NaOH. The content of collagen was quantified by measuring the absorbance at 540 nm using a microplate reader.

**In Vitro Wound Healing Assay:** The silicon culture-insert 4 well in dish 35 mm (Ibidi, Munchen, Germany) was used in wound healing assays. Cells were seeded at  $3 \times 10^4$  cells per well and incubated for 24 h. After incubation, the culture-insert was removed, and the cells were washed with PBS. AGP-AgNPs (0.001 and 0.002 nM) and fibroblast growth factor FGF (100 ng  $\text{mL}^{-1}$ , indicated as positive control) were added to the cells, and the culture medium was changed daily. The wound closure of migrating cells after treatment was photographed at 0, 24, and 48 h, and gap filling was investigated using the ImageJ program. Percentage gap-filling was calculated using methods from a previous study.<sup>[51]</sup>

**Evaluation of Antibacterial Activity of GVF/AGP-AgNPs Hydrogel:** The good diffusion method was employed to perform antimicrobial tests. Initially, a single colony was allowed to grow in Mueller Hinton Broth (MHB) at 37 °C for 24 h. Subsequently, after inoculation for 3 h, the bacteria were diluted in the same media to obtain an inoculum of  $1 \times 10^7$  CFU  $\text{mL}^{-1}$ . The bacteria were then swabbed onto a three-dimensional MH agar plate, which was cut to generate wells of 6 mm diameter. Next, 0.05 g of GVF/AGP-AgNPs hydrogel or 20  $\mu\text{L}$  of standard drug was introduced into the wells, followed by incubation at 37 °C for 24 h. The positive control comprised of Gentamicin and Ceftazidime, whereas deionized water was used as the negative control. After 24 h of incubation, the inhibition zone was measured using a millimeter (mm) scale ruler.

**Cell Culture Preparation and Cell Viability Assay:** Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 1% penicillin/streptomycin was used to cultivate human dermal fibroblast cells (ATCC, Manassas, VA, USA) in a humidified atmosphere (5%  $\text{CO}_2$ ) at 37 °C. To assess the impact of AGP-AgNPs on cell viability, MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay was employed. For this, cells were seeded at  $2 \times 10^4$  cells per well in a 96-well plate and incubated for 24 h. Subsequently, cells were exposed to various concentrations of AGP-AgNPs for 24 h. After treatment, the culture medium was eliminated, and MTT (1 mg  $\text{mL}^{-1}$ ) was introduced into each well. Following a 4 h incubation period, the MTT solution was replaced with dimethyl sulfoxide (DMSO), and the absorbance was measured at 570 nm using a microplate reader (Synergy H1, BioTeK).

**Animals and Incisions Made for Wound Study:** Twelve male Wistar rats, weighing 180–200 g and aged 8 weeks, were procured from Nomura Siam International Co., Ltd., Bangkok, Thailand. The rats were kept in groups under standard animal laboratory conditions, which included a light/dark cycle (12/12 h),  $21 \pm 2$  °C temperature, and 50%–55% relative humidity. They were provided with standard rat chow (CP Co., Ltd., Bangkok, Thailand) and sterile reverse osmosis water ad libitum. The Institution's Animal Care Committee, Thammasat University, Thailand, approved all the animal procedures, which were conducted according to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, National Research Council (protocol number: 01/2023). After an acclimation period of 1 week, two full-thickness skin incisions were made on the back of each isoflurane-anesthetized rat, fol-

lowing sterilization procedures. The skin wounds, which were 1 cm in diameter, were treated with GVF/AGP-AgNPs hydrogels or GVF gels, while the rats were given 12.5 mg  $\text{kg}^{-1}$  tramadol injection to reduce pain. The skin wounds were cleaned daily and treated with GVF/AGP-AgNPs hydrogels or GVF gels, after which they were photographed on days 3, 7, 14, and 21 post-wounding. The percentage of wound contraction was calculated using the method described previously.

**Histopathology Analysis:** The full-thickness skin samples were collected on days 7, 14, and 21 post-wounding, for which cross-sectional specimens were obtained. The skin specimens were then fixed in 10% formaldehyde, dehydrated using graded ethanol and xylene, and subsequently embedded in paraffin. Using a Leica microtome (Microsystems, Wetzlar, Germany), the paraffin blocks were sectioned into 5  $\mu\text{m}$  sections, which were then stained with hematoxylin and eosin or Masson's Trichrome (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). The number of mononuclear leukocytes, polymorphonuclear leukocytes, and fibroblasts, as well as the degree of vascularization, were all qualitatively evaluated in three parallel sections taken from each specimen. Collagen density was measured in the wound area and compared to rat skin treated with the GVF hydrogel (nonwound control). The collagen density under the wound area was expressed as a percentage of the collagen density of the control group for each post-wounding day. The morphological evaluations were photographed by a Nikon DXM 1200 digital camera (Tokyo, Japan). The interpretation of histological slides was carried out as a blind analysis by two independent pathobiologists from the Pathology Information and Learning Center, Department of Pathobiology, Faculty of Science, Mahidol University.

**Statistical Analysis:** Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 7.0 (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  $\alpha$  of 0.05 ( $P < 0.05$ ).

## Supporting Information

Supporting Information is available from the Wiley Online Library or from the author.

## Acknowledgements

C.T. received grant support from The Science Achievement Scholarship of Thailand (SAST) and Materials Chemistry Research Center, Department of Chemistry, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand. S.K. also received support from the Outbound Visiting Scholar program (Khon Kaen University, 2021), Thailand Institute of Nuclear Technology (Public Organization), and the Faculty of Science, Khon Kaen University, which provided financial and laboratory support. The research was further supported by Thailand Science Research and Innovation and Siam University (grant number 01/2566 to S.L.), and the Target Development Group grant (Cosmeceuticals) P1952244 from the National Science and Technology Development Agency (NSTDA, Thailand) to M.K. and K.N. Additionally, J. A. H. was supported by the Australian Research Council (ARC) Future Fellowship (FT180100295) and the Centre of Excellence in Exciton Science (CE170100026). The authors would also like to thank Dr. Sayan Saengsuwan and Ubon Ratchathani University for providing viscosities and fruitful discussion.

## Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

## Author Contributions

S.K., C.T., S.L., and J.A.H. performed the conceptualization; C.T., S.T., S.L., M.K., and N.K. performed the methodology; S.K. and S.L. performed the

validation; S.K., C.T., S.T., S.L., M.K., N.K., R.P., A.J., J.A.H., and K.N. performed the formal analysis; S.K., C.T., S.T., S.L., M.K., N.K., R.P., A.J., J.A.H., and K.N. performed investigations; S.K., C.T., S.L., M.K., and J.A.H. wrote and prepared the original draft; S.K. wrote, reviewed, and edited the final manuscript., performed the visualization, supervised the study, acquired project administration. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

## Data Availability Statement

The data that support the findings of this study are available on request from the corresponding author. The data are not publicly available due to privacy or ethical restrictions.

## Keywords

androgapholide, antibacterial, gelatin, self-healing hydrogel, silver nanoparticles, vanillin

Received: May 31, 2023  
Revised: July 12, 2023  
Published online:

- [1] B. Aïssa, D. Therriault, E. Haddad, W. Jamroz, *Adv. Mater. Sci. Eng.* **2012**, *1*, 854203.
- [2] J. P. Joseph, A. Singh, A. Pal, *Smart Polym. Nanocompos.* **2017**, 181.
- [3] Y. Yang, M. W. Urban, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 7446.
- [4] J.-M. Lehn, *Const. Dyn. Chem.* **2012**, *322*, 22169958.
- [5] H. Huang, Z. Dong, X. Ren, B. Jia, G. Li, S. Zhou, X. Zhao, W. Wang, *Nano Res.* **2023**, *16*, 3475.
- [6] D. Zhao, J. Huang, Y. Zhong, K. Li, L. Zhang, J. Cai, *Adv. Funct. Mater.* **2016**, *26*, 6279.
- [7] J. Chen, F. Li, Y. Luo, Y. Shi, X. Ma, M. Zhang, D. W. Boukhvalov, Z. Luo, *J. Mater. Chem.* **2019**, *7*, 15207.
- [8] Z. Wei, J. H. Yang, J. Zhou, F. Xu, M. Zrínyi, P. H. Dussault, Y. Osada, Y. M. Chen, *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 8114.
- [9] B. Marco-Dufort, M. W. Tibbitt, *Mater. Today Chem.* **2019**, *12*, 16.
- [10] S. Bian, Z. Zheng, Y. Liu, C. Ruan, H. Pan, X. Zhao, *J. Mater. Chem. B* **2019**, *7*, 6488.
- [11] S. Lü, C. Gao, X. Xu, X. Bai, H. Duan, N. Gao, C. Feng, Y. Xiong, M. Liu, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2015**, *7*, 13029.
- [12] T.-C. Tseng, L. Tao, F.-Y. Hsieh, Y. Wei, I.-M. Chiu, S.-H. Hsu, *Adv. Mater.* **2015**, *27*, 3518.
- [13] D. Huber, G. Tegl, A. Mensah, B. Beer, M. Baumann, N. Borth, C. Sygmond, R. Ludwig, G. M. Guebitz, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2017**, *9*, 15307.
- [14] C. Talodthaisong, W. Boonta, S. Thammawithan, R. Patramanon, N. Kamonsutthipajit, J. A. Hutchison, S. Kulchat, *Mater. Today Commun.* **2020**, *24*, 100992.
- [15] G. Cai, J. Wang, K. Qian, J. Chen, S. Li, P. S. Lee, *Adv. Sci.* **2017**, *4*, 1600190.
- [16] N. D. Sanandiyaa, S. Lee, S. Rho, H. Lee, I. S. Kim, D. S. Hwang, *Carbohydr. Polym.* **2019**, *208*, 77.
- [17] B. Jia, G. Li, E. Cao, J. Luo, X. Zhao, H. Huang, *Mater. Today Bio.* **2023**, *19*, 100582.
- [18] N. Han, Z. Xu, C. Cui, Y. Li, D. Zhang, M. Xiao, C. Fan, T. Wu, J. Yang, W. Liu, *Biomater. Sci.* **2020**, *8*, 3164.
- [19] M. Yao, F. Gao, R. Xu, J. Zhang, Y. Chen, F. Guan, *Biomater. Sci.* **2019**, *7*, 4088.
- [20] R. M. Cava-Roda, A. Taboada-Rodríguez, M. T. Valverde-Franco, F. Marín-Iniesta, *Food Bioprocess Technol.* **2012**, *5*, 2120.
- [21] P. Cerrutti, S. M. Alzamora, S. L. Vidales, *J. Food Sci.* **1997**, *62*, 608.
- [22] D. J. Fitzgerald, M. Stratford, M. J. Gasson, A. Narbad, *J. Food Prot.* **2004**, *67*, 391.
- [23] C. Xu, W. Zhan, X. Tang, F. Mo, L. Fu, B. Lin, *Polym. Test.* **2018**, *66*, 155.
- [24] P. Roy, S. Das, T. Bera, S. Mondol, A. Mukherjee, *Int. J. Nanomedicine* **2010**, 1113.
- [25] E. Pretsch, P. Bühlmann, M. Badertscher, E. Pretsch, P. Bühlmann, M. Badertscher, *Struct. Determ. Org. Compd.* **2020**, 167.
- [26] G. L. Hoatson, *Solid-State NMR III Org. Matter* **1994**, *32*, 97764052.
- [27] S. K. Konavarapu, K. Biradha, *Cryst. Growth Des.* **2018**, *19*, 104341253.
- [28] Y. Guo, Y.-H. Bao, K.-F. Sun, C. Chang, W.-F. Liu, *Food Hydrocoll* **2021**, *112*, 106293.
- [29] S.-N. Li, B. Li, Z.-R. Yu, Y. Li, K.-Y. Guo, L.-X. Gong, Y. Feng, D. Jia, Y. Zhou, L.-C. Tang, *Composite, Part B Eng.* **2020**, *194*, 108046.
- [30] X. Zhang, J. Xu, C. Lang, S. Qiao, G. An, X. Fan, L. Zhao, C. Hou, J. Liu, *Biomacromolecules* **2017**, *18*, 1885.
- [31] N. Thombare, U. Jha, S. Mishra, M. Z. Siddiqui, *Carbohydr. Polym.* **2017**, *168*, 274.
- [32] J. Su, J. Li, J. Liang, K. Zhang, J. Li, *Life* **2021**, *11*, 1016.
- [33] W. Huang, Y. Wang, Y. Chen, Y. Zhao, Q. Zhang, X. Zheng, L. Chen, L. Zhang, *Adv. Healthcare Mater.* **2016**, *5*, 2813.
- [34] Z. Xu, S. Han, Z. Gu, J. Wu, *Adv. Healthcare Mater.* **2020**, *9*, 1901502.
- [35] H. Liu, C. Wang, C. Li, Y. Qin, Z. Wang, F. Yang, Z. Li, J. Wang, *RSC Adv.* **2018**, *8*, 7533.
- [36] V. Buranasudja, C. Muangnoi, K. Sanookpan, H. Halim, B. Sritularak, P. Rojsitthisak, *Nutrients* **2022**, *14*, 2553.
- [37] B. Li, T. Jiang, H. Liu, Z. Miao, D. Fang, L. Zheng, J. Zhao, *J. Cell. Physiol.* **2018**, *234*, 561.
- [38] S. P. K. Mittal, S. Khole, N. Jagadish, D. Ghosh, V. Gadgil, V. Sinkar, S. S. Ghaskadbi, *Biochim. Biophys. Acta BBA – Gen. Sub.* **2016**, *1860*, 2377.
- [39] A. C. D. O. Gonzalez, T. F. Costa, Z. D. A. Andrade, A. R. A. P. Medrado, *An Bras Dermatol.* **2016**, *91*, 614.
- [40] D. M. Ornitz, N. Itoh, *Genome Biol.* **2001**, *2*, reviews3005.
- [41] J. Li, Y.-P. Zhang, R. S. Kirsner, *Microsc Res Tech* **2003**, *60*, 107.
- [42] E. Mussard, A. Cesaro, E. Lespessailles, B. Legrain, S. Berteina-Raboin, H. Toumi, *Antioxidants* **2019**, *8*, 571.
- [43] S. Hossain, Z. Urbi, H. Karuniawati, R. B. Mohiuddin, A. Moh Qrimida, A. M. M. Allzag, L. C. Ming, E. Pagano, R. Capasso, *Life* **2021**, *11*, 348.
- [44] R. Jamaludin, N. Mohd Daud, R. S. Raja Sulong, H. Yaakob, A. Abdul Aziz, S. Khamis, L. Md Salleh, *J. Drug Delivery Sci. Technol.* **2021**, *63*, 102427.
- [45] F. H. Al-Bayaty, M. A. Abdulla, M. I. A. Hassan, H. M. Ali, *Nat. Prod. Res.* **2012**, *26*, 423.
- [46] M. Shin, K. H. Song, J. C. Burrell, D. K. Cullen, J. A. Burdick, *Adv. Sci.* **2019**, *6*, 1901229.
- [47] D. Limmathurotsakul, N. Golding, D. A. B. Dance, J. P. Messina, D. M. Pigott, C. L. Moyes, D. B. Rolim, E. Bertherat, N. P. J. Day, S. J. Peacock, S. I. Hay, *Nat. Microbiol.* **2016**, *1*, 15008.
- [48] M. T. S. Alcântara, N. Lincopan, P. M. Santos, P. A. Ramirez, A. J. C. Brant, H. G. Riella, A. B. Lugão, *Radiat. Phys. Chem.* **2020**, *169*, 108777.
- [49] J. Yang, Y. Chen, L. Zhao, Z. Feng, K. Peng, A. Wei, Y. Wang, Z. Tong, B. Cheng, *Composite, Part B Eng.* **2020**, *197*, 108139.
- [50] I. Pastar, O. Stojadinovic, N. C. Yin, H. Ramirez, A. G. Nusbaum, A. Sawaya, S. B. Patel, L. Khalid, R. R. Isseroff, M. Tomic-Canic, *Adv Wound Care* **2014**, *3*, 445.
- [51] S. Bhubhanil, C. Talodthaisong, M. Khongkow, K. Namdee, P. Wongchitrat, W. Yingmema, J. A. Hutchison, S. Lapmanee, S. Kulchat, *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 21836.

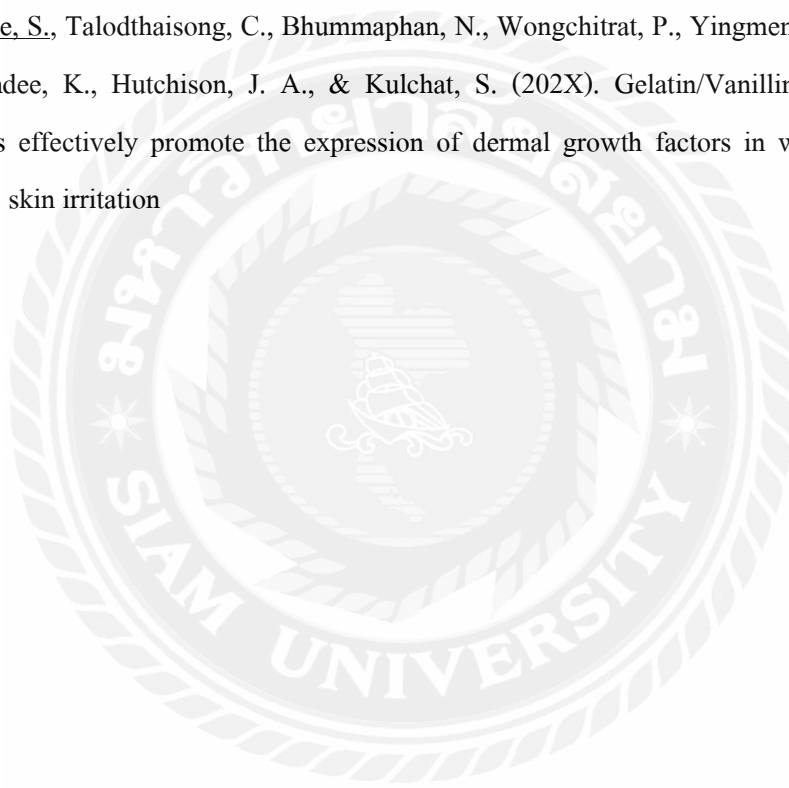
- [52] A. G. Barschak, F. M. Stefanello, C. L. Lencina, F. De Simone, W. J. Cunico Filho, *Biomed Res. Int.* **2013**, 2013, 989604.
- [53] H. El Gzaerly, D. M. Elbardisey, H. M. Eltokhy, D. Teaama, *Int J Health Sci* **2013**, 7, 160.
- [54] T. F. Linsenmayer, *Cell Biol. Extracell. Matrix* **1991**, 7.
- [55] R. Kenagy, *Ch7 Mechanisms of Vascular Disease*, University of Adelaide Press, Woodville, Australia **2011**.
- [56] C. Wang, C. Chu, X. Zhao, Y. Yang, C. Hu, L. Liu, J. Li, Y. Qu, Y. Man, *Bioact Mater* **2022**, 11, 206.
- [57] S. Thammawithan, C. Talodthaisong, O. Srichaiyapol, R. Patramanon, J. A. Hutchison, S. Kulchat, *Sci. Rep.* **2022**, 12, 10701.
- [58] D. Paramelle, A. Sadovoy, S. Gorelik, P. Free, J. Hobley, D. G. Fernig, *Analyst* **2014**, 139, 4855.



## ภาคผนวก จ

### นิพนธ์ต้นฉบับบทความวิจัย

Lapmanee, S., Talodthaisong, C., Bhummaphan, N., Wongchitrat, P., Yingmema W., Khongkow, M., Namdee, K., Hutchison, J. A., & Kulchat, S. (202X). Gelatin/Vanillin/Fe<sup>3+</sup>/AGP-AgNPs hydrogels effectively promote the expression of dermal growth factors in wound healing and minimize skin irritation



1 **Gelatin/Vanillin/Fe<sup>3+</sup>/AGP-AgNPs hydrogels effectively promote the**  
2 **expression of dermal growth factors in wound healing and minimize skin**  
3 **irritation**

4 **Sarawut Lapmanee<sup>a</sup>, Chanon Talodthaisong<sup>b</sup>, Narumol Bhumaphan<sup>c</sup>, Prapimpun**  
5 **Wongchitrat<sup>d</sup>, Werayut Yingmema<sup>e</sup>, Mattaka Khongkow<sup>f</sup>, Katawut Namdee<sup>f</sup>, James A.**  
6 **Hutchison<sup>g</sup>, Sirinan Kulchat<sup>b\*</sup>**

7 <sup>a</sup> Department of Basic Medical Sciences, Faculty of Medicine, Siam University, Bangkok,  
8 10160, Thailand.

9 <sup>b</sup> Department of Chemistry and Center of Excellence for Innovation in Chemistry, Faculty of  
10 Science, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002, Thailand.

11 <sup>c</sup> College of Public Health Sciences, Chulalongkorn University, Bangkok, 10330, Thailand.

12 <sup>d</sup> Center for Research Innovation and Biomedical Informatics, Faculty of Medical Technology  
13 Mahidol University, Nakhon Pathom 73170, Thailand.

14 <sup>e</sup> Laboratory Animal Center, Thammasat University, Pathumthani, 12120, Thailand.

15 <sup>f</sup> National Nanotechnology Centre, National Science and Technology Development Agency,  
16 Pathumthani, 12120, Thailand.

17 <sup>g</sup> School of Chemistry and Centre of Excellence in Exciton Science, The University of  
18 Melbourne, Parkville, Victoria, 3010, Australia.

19  
20 \* Corresponding author, e-mail: sirikul@kku.ac.th

21  
22 **ABSTRACT:** This study explores the potential of gelatin-vanillin-ferric ion (GVF) hydrogels  
23 incorporating andrographolide-silver nanoparticles (AGP-AgNPs) to enhance wound healing  
24 and minimize skin irritation. Specifically, mRNA expression profiling of dermal growth  
25 factors in skin-wound specimens from male Wistar rats, and skin irritation tests in female  
26 New Zealand rabbits, were undertaken. Significant gene upregulation was observed for  
27 collagen 1 and 3, epidermal growth factor, transforming growth factor-beta, fibroblast growth  
28 factor, fibronectin, and vascular endothelial growth factor in a time-dependent manner over  
29 21 days, suggesting that enhanced cellular proliferation, extracellular matrix synthesis, and  
30 angiogenesis promote wound healing and tissue regeneration. Rabbit skin treated with  
31 GVF/AGP-AgNP hydrogels consistently displayed reduced levels of erythema and edema  
32 compared to controls, while a standardized scoring system yielded notably low primary  
33 dermal irritation indices for GVF/AGP-AgNP hydrogels. Collectively, these findings suggest



34 that GVF/AGP-AgNP hydrogels could be developed into safe topical formulations for skin  
35 and wound care, requiring comprehensive human studies and clinical trials in the future.

36

37 **KEYWORDS:** andrographolide, growth factors, hydrogel, silver nanoparticle, skin irritation,  
38 wound dressing

39

## 40 **INTRODUCTION**

41 Wound healing therapies and skincare have long been subjects of intense research and  
42 development, with the aim of improving outcomes and minimizing adverse effects. Scarring,  
43 whether resulting from injuries, surgeries, or medical conditions, can exert enduring physical  
44 and psychological effects on individuals. These effects can vary, influenced by factors such as  
45 the size and location of the scar [1]. Scar tissue, often less flexible than the surrounding skin,  
46 may induce discomfort or pain [2].

47 Wound dressing assumes a pivotal role in alleviating the physical and psychological  
48 impacts associated with the formation of myofibroblasts and keloid fibroblasts [3]. Innovative  
49 materials such as hydrogels offer significant potential benefits in this regard. Hydrogels have  
50 emerged as promising carriers for bioactive compounds due to their unique properties,  
51 including high water content, biocompatibility, and controlled release capabilities [4, 5]  
52 Consequently, hydrogel biomaterials have attracted considerable attention in the  
53 pharmaceutical field. Among the functional bionanomaterials, gelatin or guar gum-based  
54 hydrogels have been successfully synthesized and employed as drug delivery systems,  
55 particularly for promoting wound healing [6] Additionally, gelatin, a natural biopolymer  
56 derived from collagen, is commonly utilized in hydrogel formulations due to its  
57 biodegradability, biocompatibility, and gel-forming properties [7, 8]. These gelatin-based  
58 hydrogels have demonstrated significant potential in various biomedical applications,  
59 including wound healing, drug delivery, and tissue engineering.

60 To further enhance the properties and functionalities of hydrogels, additional  
61 components can be incorporated. One such component is vanillin, a well-known flavoring  
62 agent that possesses antioxidant and anti-inflammatory properties [9]. These properties have  
63 been investigated for their potential in promoting wound healing, as vanillin has the ability to  
64 inhibit pro-inflammatory cytokines and enzymes, thereby reducing inflammation in  
65 experimental models [10, 11]. Consequently, the incorporation of vanillin into hydrogel  
66 formulations may present an effective strategy for alleviating skin irritation and improving

67 user comfort. Interestingly, ferric metal ions, renowned for their involvement in numerous  
68 biological processes, have also garnered attention in cross-linked hydrogel study. These ions  
69 can interact with gelatin molecules, promoting gelation and enhancing the mechanical  
70 properties of hydrogels [12]. The inclusion of ferric ions in hydrogel formulations can  
71 improve stability and mechanical strength, consequently enhancing the performance and  
72 durability of the hydrogel as a topical formulation [13]. The potential applications of this  
73 hydrogel extend to the biomedical field, including wound healing and biosensors.

74 Furthermore, silver nanoparticles (AgNPs) are a vital nanomaterial extensively  
75 employed in biomedical applications [14]. In addition, AgNPs-embedded hydrogels can play  
76 a crucial role in infection prevention and wound healing, often accomplished through their  
77 interaction with antibiotics or bioactive molecules, resulting in antibacterial action by  
78 deposition on the cell membrane [6, 14-17].

79 Besides antibiotics, herbal antibacterial andrographolide (AGP) from *Andrographis*  
80 *paniculata* has been proven to possess anti-inflammatory and anti-infection effects on wounds  
81 and traumatic lesions [18, 19]. Moreover, AGP demonstrates diverse biological activities,  
82 such as anti-inflammatory and antioxidant properties [20, 21]. Recently we introduced a novel  
83 gelatin-based hydrogel crosslinked with vanillin and ferric ion (GVF) that possesses unique  
84 characteristics, including shear-thinning behavior, rapid self-healing, and high swelling  
85 capacity, making it suitable for wound dressing applications. By incorporating silver  
86 nanoparticles (AGP-AgNPs), these GVF/AGP-AgNP hydrogels gain antimicrobial properties,  
87 with enhanced action against bacterial pathogens, (i.e., *Escherichia coli*, *Staphylococcus*  
88 *aureus*, and *Burkholderia pseudomallei*), and wound healing [22, 23].

89 In wound healing, it is crucial to facilitate the formation of new granulation tissue and  
90 expedite the migration of epithelial cells [24]. Generally, the process of wound healing begins  
91 with coagulation and hemostasis, which stop the bleeding. Within the clot, platelets become  
92 activated and release growth factors and cytokines. These molecules act as signals, prompting  
93 resident cells to initiate re-epithelialization, angiogenesis and the repair of connective tissue  
94 [25]. While GVF/AGP-AgNP hydrogels have shown remarkable promotion of wound  
95 healing, the elucidation of the causative molecular mechanisms remains elusive. Moreover,  
96 skin irritation represents a prominent concern in the formulation of topical products utilized  
97 within the realms of cosmetics, pharmaceuticals, and personal care. To address this concern,  
98 rabbit skin models are employed in accordance with the Organization for Economic Co-  
99 operation and Development (OECD) test guideline 404 to evaluate the potential for skin

100 irritation induced by commonly employed medical and cosmetic products [26]. Skin irritation  
101 can lead to discomfort, inflammation, and undesirable reactions, thereby jeopardizing the  
102 effectiveness and consumer acceptance of these products [27]. Consequently, the assessment  
103 of the impact of the GVF/AGP-AgNP hydrogel on skin irritation assumes paramount  
104 importance, given its potential to elicit adverse effects in the fields of skin and wound care.

105 The primary aim of this study was to elucidate the molecular mechanisms underlying  
106 the enhanced wound healing effects of GVF/AGP-AgNP hydrogels. This investigation  
107 involves determining the mRNA expression profiles of dermal growth factors, shedding light  
108 on the genetic processes driving improved wound closure and tissue remodeling.  
109 Additionally, this study assessed the skin irritation potential of these hydrogels through  
110 standardized skin irritation tests (Fig. 1). The results further emphasize the promising  
111 therapeutic potential of GVF/AGP-AgNP hydrogels in skin and wound care, including their  
112 safe use in medical applications.

113

## 114 **MATERIALS AND METHODS**

### 115 **Chemicals and reagents**

116 The gelatin used in this study was sourced from porcine skin and was obtained from  
117 Sigma-Aldrich in Germany. The vanillin used in the experiment was acquired from Sigma-  
118 Aldrich in France. The iron (III) chloride hexahydrate (97%) was purchased from Loba  
119 Chemie. The silver nitrate (99.9%) was obtained from POCH<sup>TM</sup>. Andrographolide (9  
120 mg/capsule) was sourced from Khaolaor Laboratories Co., Ltd (Samutprakarn, Thailand). For  
121 the experiments, deionized water (DI) with a specific resistivity of 18.2 MΩ•cm was obtained  
122 from a RiOs<sup>TM</sup> Type I Simplicity 185 water purification system by Millipore. Additionally,  
123 dimethylsulfoxide (DMSO) was purchased from Riedel-deHaën in Germany. Silver nitrate  
124 (AgNO<sub>3</sub>, 99.9%) was purchased from POCH<sup>TM</sup>, Poland. Curcumin synthetic grade (C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>6</sub>,  
125 pure > 97%) was purchased from TCI, Japan. Dimethylsulfoxide (DMSO, C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>OS) was  
126 purchased from Fisher Scientific, UK. Potassium carbonate (K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, ≥99.0%) was purchased  
127 from Merck, Germany.

### 128 **Synthesis of Andrographolide-stabilized silver nanoparticles (AGP-AgNPs) and the** 129 **preparation of AGP-AgNPs composite into hydrogel (GVF/AGP-AgNPs)**

130 The AGP-AgNPs was synthesized following a method based on previous studies [22,  
131 23]. First, 3 mL of Andrographolide broth was dissolved in 24 mL of DI water in Erlenmeyer  
132 flask. Then, 3 mL of silver nitrate solution (20 mM) was added in Andrographolide solution.

133 The mixture solution was stirred at room temperature for 3 hours. After that, the color of  
134 solution change from yellow to reddish brown to obtain the AGP-AgNPs. It was characterized  
135 by UV-vis spectroscopy and estimated the concentration of 0.44 nM based on an extinction  
136 coefficient of  $31.3 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  at 399.7 nm for 18 nm diameter citrate-silver  
137 nanoparticles. AGP-AgNPs composite into hydrogel (GVF/AGP-AgNPs) was prepared using  
138 gelatin as a starting material. The gelatin powder (0.48 g) was dissolved in 8 mL of AGP-  
139 AgNPs solution and stirred until completely dissolved. Then, 1 mL of 20 wt% vanillin in  
140 ethanol was added in mixture solution. Next step, 1 mL of 0.1 M  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  was added to  
141 mixture solution to formation of GVF/AGP-AgNPs hydrogels.

#### 142 **Animals**

143 Twenty adult male Wistar rats, weighing between 190 and 210 g and aged 8 weeks,  
144 were procured from Nomura Siam International Co., Ltd., Bangkok, Thailand. Three female  
145 New Zealand rabbits age 15-week-olds, weighing between 2.5 and 3.0 kg, were procured  
146 from the National Laboratory Animal Center, Mahidol University, Nakhon Pathom, Thailand.  
147 These animals were housed in a controlled laboratory environment, maintaining a 12-hour  
148 light/12-hour dark cycle, a temperature of  $22 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ , and a relative humidity of 52%–54%.  
149 The animals were provided *ad libitum* access to standard rodent chow (CP Co., Ltd.,  
150 Bangkok, Thailand) and sterile reverse osmosis water. Animal care adhered to the standards  
151 outlined in the eighth edition of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals by the  
152 National Research Council. Ethical clearance for all experimental procedures was obtained  
153 from the Animal Care Committee at Thammasat University, Thailand, certified by the  
154 International Laboratory Accreditation Cooperation (protocol number: 01/2023).

#### 155 **Surgical wound induction and sample collection**

156 Following a 7-day acclimation period, each rat underwent the surgical creation of two  
157 full-thickness skin incisions, each measuring 1 cm in diameter, on the dorsal region. This  
158 procedure was carried out under isoflurane anesthesia and strict sterilization protocols.  
159 Subsequently, the resultant skin wounds were subjected to treatment with either GVF/AGP-  
160 AgNPs hydrogels or GVF gels. Daily wound cleaning and maintenance were performed, and  
161 at specified intervals (on days 7, 14, and 21 post-wounding), dermal tissue specimens were  
162 photographed and collected for detailed mRNA expression analysis of key dermal growth  
163 factors. Wound contraction percentages were carefully calculated to assess healing progress  
164 [6, 23].

#### 165 **RNA isolation and quantification assay**

166 RNA was meticulously extracted from skin tissue within the healing wound area using  
167 TRIzol reagent (Invitrogen Life Technologies, USA) in strict accordance with the  
168 manufacturer's protocols. To ensure the purity of the RNA sample, DNase I treatment  
169 (Thermo Fisher Scientific Inc, USA) was performed to eliminate any potential genomic DNA  
170 contamination. Subsequently, cDNA synthesis was undertaken utilizing the High-Capacity  
171 cDNA Reverse Transcriptase Kit (Applied Biosystems, USA) following the manufacturer's  
172 guidelines. The expression of genes closely associated with wound healing, specifically  
173 collagen 1, collagen 3, epidermal growth factor (EGF), fibroblast growth factor 2 (FGF-2),  
174 fibronectin, matrix metalloproteinase-1 (MMP-1), transforming growth factor-beta 1 (TGF-  
175  $\beta$ 1), and vascular endothelial growth factor (VEGF), was evaluated using SYBR Green-based  
176 quantitative polymerase chain reaction (qPCR). Prior to this analysis, the primer sets had  
177 undergone thorough validation for specificity and efficiency via conventional qPCR, as  
178 detailed in previous work [6, 28]. A comprehensive list of the primers employed in this study  
179 is provided in Table 1. Then, the diluted cDNA and primers were combined with  
180 SsoAdvanced™ Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA,  
181 USA) in a total reaction volume of 20  $\mu$ l for PCR amplification. Each PCR reaction, including  
182 both sample and nontemplate control reactions, was performed in duplicate and conducted in  
183 the CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories). The  
184 thermocycling program comprised 40 cycles, followed by an additional step for generating  
185 dissociation curves. For normalization and compensating for inter-PCR variability across  
186 experiments, beta ( $\beta$ )-actin was included as the reference gene. In each independent  
187 experiment, both target and reference gene cDNAs were derived from equivalent RNA  
188 extractions and analyzed concurrently in the qPCR analysis. The relative mRNA expression  
189 was determined using the comparative Ct method, facilitated by CFX Manager™ software  
190 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). The expression levels of the studied genes are  
191 presented as *x*-fold changes relative to the untreated control group.

### 192 **Skin irritation test**

193 Acute dermal irritation testing of the GVF/AGP-AgNP hydrogels was performed  
194 following the methods from Wang et al., 2017 [29]. To prepare for the test, the fur on the  
195 dorsal area of the rabbits was shaved along the trunk (5 cm  $\times$  5 cm) approximately 24 hours  
196 prior to the initiation of the experiment. For each rabbit, a 0.4 g sample of the test GVF/AGP-  
197 AgNP hydrogel was moistened with 0.5 mL of 0.9% normal saline and applied to a cotton  
198 gauze patch, securely positioned in place. A separate untreated site was designated as the

199 control. The treated sites were observed at 3 minutes, 1 hour, 4 hours, and 24 hours after  
200 application, with subsequent evaluations conducted at 48 hours, 72 hours, and on the 14<sup>th</sup> day  
201 thereafter. The observed reactions, including erythema, eschar formation, and edema, were  
202 assessed using a standardized scoring system for skin reactions. Each reaction was assigned a  
203 score on a scale of 0 to 4, with 0 indicating no effect and 4 indicating severe symptoms, as  
204 determined by the Draize scoring system for dermal reactions [30]. The scores for erythema,  
205 eschar formation, and edema were summed for each time point and divided by three to obtain  
206 the mean irritation score per time point. The mean scores were then compared to those of the  
207 control sites, where sterile distilled water was applied to the animals. To determine the hazard  
208 classification based on the PDII, a rating scale of 0 to 5 was used, with 0 indicating non-  
209 irritation and values exceeding 5.0 indicating severe irritation [31]. The PDII is calculated  
210 based on the erythema and edema scores, as follows:

$$\text{PDII} = \frac{\text{Total erythema (all time points)} + \text{Total edema (all time points)}}{\text{Number of intervals} \times \text{Number of animals}}$$

211  
212  
213

214 This standardized testing approach and scoring system allowed for the objective  
215 assessment of dermal reactions caused by the GVF/AGP-AgNP hydrogels. The PDII values  
216 obtained provide valuable information for classifying the irritant potential of these hydrogels,  
217 facilitating hazard classification and risk assessment.

### 218 **Statistical analysis**

219 The data were expressed as means  $\pm$  SE. The significance of the differences between  
220 groups was analyzed by using unpaired T test. The level of significance was  $p < 0.05$ . All  
221 statistical tests and graph were analyzed and plotted using GraphPad Prism 8.0 (GraphPad  
222 Software Inc., San Diego, CA, USA).

223  
224

## **RESULTS**

### 225 **Effect of GVF/AGP-AgNP hydrogels on dermal growth factors mRNA expression in** 226 **rats**

227 The mRNA expression levels of collagen 1, collagen 3, EGF, FGF-2, fibronectin,  
228 MMP1, TGF- $\beta$ 1, and VEGF in the rat skin specimens were assessed using qRT-PCR, for  
229 treatment with the GVF/AGP-AgNPs hydrogel and the GVF gel alone. The dermal growth  
230 factor gene expression levels were normalized to the internal control gene (i.e.,  $\beta$ -actin) and  
231 the level of each studied gene was compared to the levels in GVF gel alone group. The

232 GVF/AGP-AgNP hydrogels demonstrated a significant upregulation of the mRNA expression  
233 of the targeted dermal growth factors, namely collagen 1 (by 77%), fibronectin (by 61%),  
234 MMP-1 (by 50%), and VEGF (by 41%), at day 7 compared to GVF alone. Furthermore, an  
235 increased mRNA expression of all targeted dermal growth factor, i.e., collagen 1 (by 49%),  
236 collagen 3 (by 48%), EGF (by 61%), fibronectin (by 31%), MMP-1 (by 57%), TGF- $\beta$  (by  
237 61%), and VEGF (by 43%) was observed at day 14. Additionally, the gene for fibronectin  
238 exhibited upregulation (by 54%) at day 21. Conversely, the pattern of downregulation of  
239 collagen 1 and MMP-1 mRNA expression was observed at day 14 compared to the GVF-  
240 treated group at day 7, suggesting dynamic changes in ECM remodeling and cellular  
241 responses over time (Fig. 2). These findings suggest that GVF/AGP-AgNP hydrogels have the  
242 potential to enhance the expression of key genes involved in skin regeneration.

243

#### 244 **Effect of GVF/AGP-AgNP hydrogels on skin irritation test in rabbits**

245 Table 2 presents dermal reactions following the application of GVF/AGP-AgNP  
246 hydrogel. Skin erythema was observed at 3 minutes, 1 hour, and 4 hours after patch removal  
247 in all rabbits. Additionally, irritation signs, including skin erythema, were observed at 24  
248 hours and 48 hours in rabbit's number 1 and 2. No dermal reactions were observed at 48  
249 hours, 72 hours, and 14 days after applying the GVF/AGP-AgNP hydrogel patch. Notably, no  
250 edema was observed throughout the experimental time courses (Figure 3). Consequently, the  
251 PDII score was determined as 0.62, indicating mild irritability to rabbit skin according to the  
252 Draize classification. These results demonstrate that the GVF/AGP-AgNP hydrogel caused  
253 mild irritability to rabbit skin, as indicated by the presence of skin erythema at various time  
254 points. Overall, the dermal reactions observed in GVF/AGP-AgNP hydrogels were mild and  
255 temporary, and no significant edema was noted. These findings provide valuable insights into  
256 the potential irritant effects of the tested hydrogels on rabbit skin.

257

#### 258 **DISCUSSION**

259 Advancing and optimizing wound healing strategies while minimizing adverse side  
260 effects requires the application of contemporary wound closure techniques. Hydrogels, with  
261 favorable physicochemical properties, biocompatibility, and the pharmacological effects of  
262 AGP, have emerged as promising biomaterials for wound healing [23].

263 AGP's anti-inflammatory and antibacterial properties make it particularly appealing  
264 for enhancing wound healing [18-21]. Additionally, AGP-AgNPs exhibit antibacterial  
265 activities through membrane neutralization, Ag<sup>+</sup> release, induction of reactive oxygen species,

266 maintenance of membrane integrity, and alteration of cell morphology [22, 32]. Moreover, the  
267 incorporation of bioactive compounds like vanillin gelatin and guar gum into hydrogel  
268 formulations alongside AgNP has shown potential in reducing skin lesions [23]. Furthermore,  
269 AgNPs have been shown to induce the differentiation of fibroblasts into myofibroblasts, a  
270 process that can significantly accelerate the rate of wound healing. Consequently, the  
271 innovative combination of AGP/AgNP within vanillin gelatin hydrogel (i.e., GVF) represents  
272 a promising alternative for wound dressing with superior wound healing effects [23].

273 Based on a recent study by Talodthaisong et al. in 2023, GVF/AGP-AgNP hydrogels  
274 have demonstrated biocompatibility and an absence of toxicity. These hydrogels have also  
275 been shown to enhance wound healing by stimulating collagen production, reducing oxidative  
276 stress in cultured human dermal cells, and displaying antibacterial activity. Additionally, in rat  
277 skin wounds, GVF/AGP-AgNP hydrogels have enhanced wound contraction ratios and  
278 percentages of re-epithelialization. Histologically, these hydrogels recruit inflammatory cell  
279 markers to enhance wound dressing transition phases and promote collagen deposition [23].

280 Generally, the wound healing process comprises distinct phases, each involving  
281 various growth factors and cytokines [24, 25]. It starts with the exudative inflammation phase,  
282 characterized by the release of inflammatory mediators such as cytokines and immune cell  
283 recruitment in response to injury. Subsequently, the proliferation phase involves granulation  
284 tissue formation, driven by growth factors like TGF- $\beta$ , FGF, VEGF, and various cytokines.  
285 Finally, the collagen-synthesis phase leads to scar tissue development and tissue remodeling,  
286 with the involvement of growth factors like platelet-derived growth factor, EGF, and  
287 additional cytokines crucial for tissue repair and regeneration [24, 25].

288 Here our findings demonstrate a significant upregulation of collagen 1, fibronectin,  
289 MMP-1, and VEGF mRNA expression at day 7, indicating that GVF/AGP-AgNP hydrogels  
290 have a rapid and positive impact on the expression of dermal growth factors critical for  
291 modifying the extracellular matrix in skin healing [33-37]. Furthermore, the sustained  
292 upregulation of collagen 1, collagen 3, EGF, fibronectin, TGF- $\beta$ , and VEGF at day 14  
293 indicates a lasting effect on gene expression related to tissue repair and regeneration [33,34,  
294 37]. This demonstrates the potential therapeutic application of GVF/AGP-AgNP hydrogels in  
295 promoting skin healing. At day 21, the continued upregulation of the fibronectin genes further  
296 supports their enduring impact on extracellular matrix formation and re-epithelialization.  
297 Additionally, fibronectin maintains increased expression levels at day 28 (Unpublished data),  
298 signifying a persistent positive influence on extracellular matrix components crucial for tissue  
299 integrity [24, 25, 34]. Collagen I and MMP-1 mRNA expression were observed to be



300 downregulated compared to the GVF-treated group at day 7, suggesting a potential regulatory  
301 effect of GVF/AGP-AgNP hydrogels on MMP-1, warranting further investigation into its  
302 implications for wound remodeling [24, 25, 36]

303 Generally, T-cells play a pivotal role in influencing the quantity and functionality of  
304 EGF and FGF. The observed increase in collagen levels during the inflammatory phase (day  
305 7) can be attributed to monocyte induction, while neutrophils induce TGF- $\beta$ , promoting the  
306 conversion of fibroblasts into myofibroblasts, ultimately contributing to collagen synthesis.  
307 Interestingly, the application of GVF/AGP-AgNP hydrogels resulted in a significant increase  
308 in collagen content, as demonstrated by Masson trichrome staining at day 14 [23]  
309 Additionally, findings from H&E staining indicated a pro-angiogenic tendency induced by the  
310 GVF/AGP-AgNP hydrogels. This angiogenic response is likely due to the increased VEGF  
311 gene expression at days 7 and 14 [33]. Furthermore, the upregulation of the fibronectin and  
312 TGF- $\beta$  genes may further contribute to angiogenesis during the proliferation and vascular  
313 remodeling phases [24, 25, 34]. In addition to dermal growth factor expression, understanding  
314 the potential for skin sensitization is crucial for hazard and risk assessment in wound care  
315 [38].

316 It has been known that skin irritation evaluation included the assessment of redness  
317 caused by capillary hyperemia and observation of fluid swelling in the test skin tissue [26, 29,  
318 30] However, it's worth considering that the skin irritation scoring system, assessing erythema  
319 and edema in rabbit skin irritation tests, may be affected or inaccurate due to the presence of  
320 thicker and more pigmented skin associated with hair growth [26, 30]. This study's findings  
321 displayed dermal reactions and irritability caused by GVF/AGP-AgNP hydrogels on rabbit  
322 skin. Upon the application of GVF/AGP-AgNP hydrogel, skin erythema was observed in all  
323 rabbits at various time points after patch removal, suggesting a potential inflammatory  
324 response to the hydrogel. However, it's worth noting that these irritant effects were not long-  
325 lasting, as indicated by the absence of dermal reactions at 48 hours, 72 hours, and 14 days.  
326 Importantly, no edema was observed throughout the experimental period, indicating that this  
327 hydrogel composite did not cause significant swelling in the treated area. This suggests that  
328 the formulation of the hydrogel, incorporating andrographolide with silver nanoparticles, may  
329 have mitigated potential irritant effects [39, 40].

330

331 **CONCLUSION**

332 This study explores the potential of gelatin-vanillin-ferric ion (GVF) hydrogels  
333 incorporating andrographolide-silver nanoparticles (AGP-AgNPs) to enhance wound healing  
334 and minimize skin irritation. GVF/AGP-AgNP hydrogels have demonstrated significant  
335 promise in wound healing previously [23]; however, the underlying molecular mechanisms  
336 and their effects on skin irritation remained incompletely understood. Here mRNA expression  
337 profiling of dermal growth factors in skin-wound specimens from male Wistar rats was  
338 conducted using RT-qPCR analysis. Additionally, a skin irritation test was performed  
339 following OECD guidelines, employing female New Zealand rabbits. Following treatment  
340 with GVF/AGP-AgNPs, acceleration in the healing process occurred. At the 7-day mark,  
341 significant gene upregulation was observed for collagen 3, FGF, fibronectin, and VEGF,  
342 signifying enhanced wound closure and tissue remodeling. Subsequently, at days 14 and 21,  
343 there was upregulation in collagen 1, collagen 3, EGF, TGF- $\beta$ , fibronectin, and VEGF.  
344 Meanwhile MMP-1 was downregulated at days 7 and 14. These findings suggested enhanced  
345 cellular proliferation, extracellular matrix synthesis, and angiogenesis, further promoting  
346 continuous wound healing and tissue regeneration. Throughout the observation period, the  
347 areas treated with GVF/AGP-AgNP hydrogels consistently displayed reduced levels of  
348 erythema and edema compared to control sites. Furthermore, the implementation of a  
349 standardized scoring system yielded notably low primary dermal irritation indices for  
350 GVF/AGP-AgNP hydrogels. Collectively, these findings provide evidence supporting the  
351 feasibility of developing safer topical formulations for wound care. The promising results  
352 obtained warrant further exploration, including comprehensive human studies and clinical  
353 trials to advance wound healing therapies and skincare.

354  
355 *Acknowledgements:* This work was supported by research grant support received from the  
356 Fundamental Fund 2566 of Thailand Science Research and Innovation through Siam  
357 University (Grant Number 01/2566). Additional thanks go to the Research Top-up Grant for  
358 the Academic Year 2023 from the Faculty of Medicine, Siam University to S.L. Financial  
359 support received from The Science Achievement Scholarship of Thailand (SAST) and Faculty  
360 of Science, Khon Kaen University to C.T. S.K. thanks The Outbound Visiting Scholar  
361 program, Khon Kaen University, which provided both financial assistance and access to  
362 laboratory resources. Furthermore, we express our gratitude to the National Science and  
363 Technology Development Agency (NSTDA, Thailand) for the Target Development Group  
364 grant (Cosmeceuticals) P1952244 awarded to M.K. and K.N. In addition, J. A. H. received

365 funding from the Australian Research Council (ARC) Future Fellowship (FT180100295) and  
366 the Centre of Excellence in Exciton Science (CE170100026).

367

## 368 REFERENCES

- 369 1. Ziolkowski N, Kitto SC, Jeong D, Zuccaro J, Adams-Webber T, Miroshnychenko A,  
370 Fish JS (2019) Psychosocial and quality of life impact of scars in the surgical,  
371 traumatic and burn populations: a scoping review protocol. *BMJ Open* **9**, e021289.
- 372 2. Abd-Elsayed A, Pope J, Munday DA, Slavin KV, Falowski S, Chitneni A, Popielarski  
373 SR, John J, et al (2022) Diagnosis, treatment, and management of painful scar: A  
374 narrative review. *J Pain Res* **15**, 925–937.
- 375 3. Zhang L, Tai Y, Liu X, Liu Y, Dong Y, Liu Y, Yang C, Kong D, et al. (2021) Natural  
376 polymeric and peptide-loaded composite wound dressings for scar prevention. *Appl*  
377 *Mater Today* **25**, 101186.
- 378 4. Bhattarai N, Gunn J, Zhang M (2010) Chitosan-based hydrogels for controlled,  
379 localized drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* **62**, 83–99.
- 380 5. Buenger D, Topuz F, Groll J (2012) Hydrogels in sensing applications. *Prog Polym*  
381 *Sci* **37**, 1678–719.
- 382 6. Bhubhanil S, Talodthaisong C, Khongkow M, Namdee K, Wongchitrat P, Yingmema  
383 W, Hutchison JA, Lapmanee S, et al. (2021) Enhanced wound healing properties of  
384 guar gum/curcumin-stabilized silver nanoparticle hydrogels. *Sci Rep* **11**, 21836.
- 385 7. Andrezza R, Morales A, Pieniz S, Labidi J (2023) Gelatin-based hydrogels: Potential  
386 biomaterials for remediation. *Polymers* **15**, 1026.
- 387 8. Piao Y, You H, Xu T, Bei HP, Piwko IZ, Kwan YY, Zhao X (2021) Biomedical  
388 applications of gelatin methacryloyl hydrogels. *Eng Regen* **2**, 47–56.
- 389 9. Lee Y, Kwon J, Khang G, Lee D (2012) Reduction of inflammatory responses and  
390 enhancement of extracellular matrix formation by vanillin-incorporated poly (lactic-  
391 co-glycolic acid) scaffolds. *Tissue Eng Part A* **18**, 1967–1978.
- 392 10. Costantini E, Sinjari B, Falasca K, Reale M, Caputi S, Jagarlapodii S, Murmura G  
393 (2021) Assessment of the vanillin anti-inflammatory and regenerative potentials in  
394 inflamed primary human gingival fibroblast. *Mediators Inflamm* 2021.
- 395 11. Arya SS, Rookes JE, Cahill DM, Lenka SK (2021) Vanillin: A review on the  
396 therapeutic prospects of a popular flavouring molecule. *Adv Trad Med*.

- 397 12. Xing Q, Yates K, Vogt C, Qian Z, Frost MC, Zhao F (2014) Increasing mechanical  
398 strength of gelatin hydrogels by divalent metal ion removal. *Sci Rep* **4**, 4706.
- 399 13. Huang Y, Liu J, Wang J, Hu M, Mo F, Liang G, Zhi C (2018) An intrinsically  
400 self-healing NiCo|| Zn rechargeable battery with a self-healable ferric-ion-crosslinking  
401 sodium polyacrylate hydrogel electrolyte. *Angew Chem Int Ed* **57**, 9810–9813.
- 402 14. Burduşel AC, Gherasim O, Grumezescu AM, Mogoantă L, Ficaï A, Andronescu E  
403 (2018) Biomedical applications of silver nanoparticles: An up-to-date overview.  
404 *Nanomaterials (Basel)* **8**, 681.
- 405 15. Qing Y, Cheng L, Li R, Liu G, Zhang Y, Tang X, Wang J, Liu H et al. (2018)  
406 Potential antibacterial mechanism of silver nanoparticles and the optimization of  
407 orthopedic implants by advanced modification technologies. *Int J Nanomedicine* **13**,  
408 3311–3327.
- 409 16. Martínez-Higuera A, Rodríguez-Beas C, Villalobos-Noriega JMA, Arizmendi-  
410 Grijalva A, Ochoa-Sánchez C, Larios-Rodríguez E, Martínez-Soto JM, Rodríguez-  
411 León E, et al. (2021) Hydrogel with silver nanoparticles synthesized by *Mimosa*  
412 *tenuiflora* for second-degree burns treatment. *Sci Rep* **11**, 11312.
- 413 17. Saenchoopa A, Boonta W, Talodthaisong C, Srichaiyapol O, Patramanon R, Kulchat S  
414 (2021) Colorimetric detection of Hg(II) by  $\gamma$ -aminobutyric acid-silver nanoparticles in  
415 water and the assessment of antibacterial activities. *Spectrochim Acta A Mol Biomol*  
416 *Spectrosc* **251**:119433.
- 417 18. Okhwarobo A, Falodun JE, Erharuyi O, Imieje V, Falodun A, Langer P (2014)  
418 Harnessing the medicinal properties of *Andrographis paniculata* for diseases and  
419 beyond: A review of its phytochemistry and pharmacology. *Asian Pac J Trop Dis* **4**,  
420 213–222.
- 421 19. Arifullah M, Namsa ND, Mandal M, Chiruvella KK, Vikrama P, Gopal GR (2013)  
422 Evaluation of anti-bacterial and anti-oxidant potential of andrographolide and  
423 echiodinin isolated from callus culture of *Andrographis paniculata* Nees. *Asian Pac J*  
424 *Trop Biomed* **3**, 604–610.
- 425 20. Low M, Khoo CS, Münch G, Govindaraghavan S, Sucher NJ (2015) An in vitro study  
426 of anti-inflammatory activity of standardised *Andrographis paniculata* extracts and  
427 pure andrographolide. *BMC Complement. Altern Med* **15**:18.
- 428 21. Mussard E, Cesaro A, Lespessailles E, Legrain B, Berteina-Raboin S, Toumi H (2019)  
429 Andrographolide, a natural antioxidant: An update. *Antioxidants (Basel)* **8**, 571.

- 430 22. Thammawithan S, Talodthaisong C, Srichaiyapol O, Patramanon R, Hutchison JA,  
431 Kulchat S (2022) Andrographolide stabilized-silver nanoparticles overcome  
432 ceftazidime-resistant *Burkholderia pseudomallei*: Study of antimicrobial activity and  
433 mode of action. *Sci Rep* **12**, 10701.
- 434 23. Talodthaisong C, Patramanon R, Thammawithan S, Lapmanee S, Maikaeo L,  
435 Sricharoen P, Khongkow M, Namdee K, et al. (2023) A shear-thinning, self-healing,  
436 dual-cross linked hydrogel based on Gelatin/Vanillin/Fe<sup>3+</sup>/AGP-AgNPs: Synthesis,  
437 antibacterial, and wound-healing assessment. *Macromol Biosci*, e2300250.
- 438 24. Ganapathy N, Venkataraman SS, Daniel R, Aravind RJ, Kumarakrishnan VB (2012)  
439 Molecular biology of wound healing. *J Pharm Bioallied Sci* **4**, S334–S337.
- 440 25. Wilkinson HN, Hardman MJ (2020) Wound healing: cellular mechanisms and  
441 pathological outcomes. *Open Biol* **10**, 200223.
- 442 26. OECD. (2002) Acute dermal irritation/corrosion. OECD Guidelines for the testing of  
443 chemicals 404, OECD, Paris, France.
- 444 27. Kaushik M, Farooq U, Ali MS, Ansari MJ, Iqbal Z, Mirza MA (2023) Safety concern  
445 and regulatory status of chemicals used in cosmetics and personal care products.  
446 *Dermato* **3**, 131–157.
- 447 28. Pakpian N, Phopin K, Kitidee K, Govitrapong P, Wongchitrat P (2020) Alterations in  
448 mitochondrial dynamic-related genes in the peripheral blood of Alzheimer's disease  
449 patients. *Curr Alzheimer Res* **17**, 616–625.
- 450 29. Wang J, Li Z, Sun F, Tang S, Zhang S, Lv P, Li J, Cao X. (2017) Evaluation of dermal  
451 irritation and skin sensitization due to vitacoxib. *Toxicol Rep* **4**, 287–290.
- 452 30. Draize JH, Woodward G, Calvery HO (1994) Methods for the study of irritation and  
453 toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. *J*  
454 *Pharmacol Exp Ther* **82**, 377–390.
- 455 31. Sreejayan N, Marone PA, Lau FC, Yasmin T, Bagchi M, Bagchi D. (2010) Safety and  
456 toxicological evaluation of a novel chromium (III) dinicocysteinatate complex. *Toxicol*  
457 *Mech Methods* **20**, 321–330.
- 458 32. Paladini F, Pollini M (2019) Antimicrobial silver nanoparticles for wound healing  
459 application: Progress and future trends. *Materials (Basel)* **12**, 2540.
- 460 33. Goggins E, Mironchik Y, Kakkad S, Jacob D, Wildes F, Bhujwala ZM,  
461 Krishnamachary B (2023) Reprogramming of VEGF-mediated extracellular matrix  
462 changes through autocrine signaling. *Cancer Biol Ther* **24**, 2184145.

- 463 34. Sawicka KM, Seeliger M, Musaev T, Macri LK, Clark RA (2015) Fibronectin  
464 interaction and enhancement of growth factors: Importance for wound healing. *Adv*  
465 *Wound Care (New Rochelle)* **4**, 469–478.
- 466 35. Farooq M, Khan AW, Kim MS, Choi S (2021) The role of fibroblast growth factor  
467 (FGF) signaling in tissue repair and regeneration. *Cells* **10**, 3242.
- 468 36. Caley MP, Martins VL, O'Toole EA (2015) Metalloproteinases and wound healing.  
469 *Adv Wound Care (New Rochelle)* **4**, 225–234.
- 470 37. Singh D, Rai V, Agrawal DK (2023) Regulation of collagen I and collagen III in  
471 tissue injury and regeneration. *Cardiol Cardiovasc Med* **7**, 5–16.
- 472 38. Rooney JP, Choksi NY, Ceger P, Daniel AB, Truax J, Allen D, Kleinstreuer N (2021)  
473 Analysis of variability in the rabbit skin irritation assay. *Regul Toxicol Pharmacol*  
474 **122**, 104920.
- 475 39. Krishnan PD, Banas D, Durai RD, Kabanov D, Hosnedlova B, Kepinska M,  
476 Fernandez C, Ruttkay-Nedecky B, et al. (2020) Silver nanomaterials for wound  
477 dressing applications. *Pharmaceutics* **12**, 821.
- 478 40. So-In C, Sunthamala N (2022) Treatment efficacy of *Thunbergia laurifolia*, *Curcuma*  
479 *longa*, *Garcinia mangostana*, and *Andrographis paniculata* extracts in *Staphylococcus*  
480 *aureus*-induced rabbit dermatitis model. *Vet World* **15**, 188–197.

481

## 482 **FIGURE LEGENDS**

483 **Fig. 1** Schematic illustration of GVF/AGP-AgNP hydrogel with the experimental designs in  
484 animal studies for reverse transcription quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR)  
485 analysis in rat skin and the rabbit skin irritation test.

486 **Fig. 2** Effect of GVF/AGP-AgNP hydrogels on mRNA expression of dermal growth factors  
487 in wound specimen in rats. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM for five rats in each group. \* $p$   
488  $< 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , and \*\*\* $p < 0.001$  significantly different from control (GVF).

489 **Fig. 3** The study of skin irritation and dermal reactions in rabbits after exposure to GVF/AGP-  
490 AgNP hydrogels.

491

## 492 **Table legend**

493 **Table 1** Primer sequences for candidate dermal growth factors in wound healing

494 **Table 2** Dermal reactions following application of GVF/AGP-AgNP hydrogels

## ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ	อาจารย์ ดร.ศราวุธ ลากมณีชัย
วัน เดือน ปีเกิด	7 มิถุนายน 2528
สถานที่เกิด	นครศรีธรรมราช
ตำแหน่ง	อาจารย์ประจำ สาขาสรีรวิทยา
สถานที่ทำงาน	คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสยาม แขวงบางหว้า เขตภาษีเจริญ กรุงเทพมหานคร
ประวัติการศึกษา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (กายภาพบำบัด) มหาวิทยาลัยมหิดล พ.ศ. 2551 วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (สรีรวิทยาการออกกำลังกาย) มหาวิทยาลัยมหิดล พ.ศ. 2554 ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (สรีรวิทยา-ประสาทวิทยาศาสตร์) มหาวิทยาลัยมหิดล-มหาวิทยาลัยสตาร์บวร์ก พ.ศ. 2560
สาขาวิชาการที่มีความชำนาญ	สรีรวิทยา ประสาทวิทยา และการทดลองในสัตว์

## ประวัติการได้รับทุนวิจัย

1. ทุนอุดหนุนการวิจัย สำนักส่งเสริมและพัฒนางานวิจัยมหาวิทยาลัยสยาม พ.ศ. 2561-2562
2. ทุนวิจัยโครงการปริญญาเอกกาญจนาภิเษก (คปก.) ต่อยอด รุ่นที่ 3 ประจำปีงบประมาณ 2561
3. ทุนสมทบการวิจัยเพิ่มเติม คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสยาม พ.ศ. 2562
4. ทุนอุดหนุนการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสยาม พ.ศ. 2563-2564
5. ทุนส่งเสริมการวิจัยโรคอุบัติใหม่ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสยาม พ.ศ. 2564-2565
6. ทุนพัฒนาศักยภาพในการทำงานวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่ สำนักงานปลัดกระทรวงการอุดมศึกษา วิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม ประจำปีงบประมาณ 2564-2566
7. ทุนสนับสนุนงานวิจัยมูลฐาน กองทุนส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2566

ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ ( 5 ปีย้อนหลัง)

1. **Lapmanee S**, Bhubhanil S, Sriwong S, Yuajit C, Wongchitrat P, Teerapornpantakit J, Suntornsaratoon P, Charoenphandhu J, Charoenphandhu N. Oral calcium and vitamin D supplements differentially alter exploratory, anxiety-like behaviors and memory in male rats. *PLOS ONE*. 2023.
2. Songphaeng T, **Lapmanee S**, Bhubhanil S, Momdee K, Rojviriyaya C, Kitsahawong K, Chailertvanitkul P, Welbat JU, Morkmued S. Atomoxetine and Escitalopram migrate the derangement of the temporomandibular joint morphologic and histologic changes in rats exposed to stress-induced depression. *J Oral Sci*. 2023.
3. Lektip C, Chaovalit S, Wattanapisit A, **Lapmanee S**, Nawarat J, Yaemrattanukul W. Home hazard modification programs for reducing falls in older adults: a systematic review and meta-analysis. *PeerJ*. 2023;11:e15699.
- 4 Wittayapun Y, Nawarat J, **Lapmanee S**, Mackenzie L, Lektip C. Reliability of the 44-question Home Fall Hazard Assessment Tool and personal characteristics associated with home hazards among the Thai elderly. *F1000Res*. 2023;12:8.
5. **Lapmanee S**, Bhubhanil S, Sriwong S, Khongkow M, Namdee K, Wongchitrat P, Pongkorsakol P. Venlafaxine and synbiotic attenuate learned fear-like behavior and recognition memory impairment in immobilized-stressed rats. *Physiol Pharmacol*. 2023; 27(2):171–181.
6. Suntornsaratoon P, Thongklam T, Saetae T, Kodmit B, **Lapmanee S**, Malaivijitnond S, Charoenphandhu N, Krishnamra N. Running exercise with and without calcium supplementation from tuna bone reduced bone impairment caused by low calcium intake in young adult rats. *Sci Rep*. 2023;13(1):9568.
7. Benjaponpitak A, Sawaengtham T, Thaneerat T, Wanaratna K, Chotsiri P, Rungsawang C, Bhubhanil S, Charoensuk S, Benjaponpitak S, **Lapmanee S**, Sirinavin S. Effect of *Andrographis paniculata* treatment for nonimmune patients with early-stage COVID-19 on the prevention of pneumonia: A retrospective cohort study. *Arch Intern Med Res*. 2023;6:35–43.
8. Thongchote K, Sangchuchuenjit C, Vichaichotikul W, Choosaranon N, Kulsiri N, Lopansri P, Jaysrichai T, **Lapmanee S**. The functional correction of forward shoulder posture with kinesiotape improves chest mobility and inspiratory muscle strength: A randomized controlled trial. *Ann Appl Sport Sci*. 2023;11(2):e1138.
9. Thongchote K, Threetepchanchai K, Chuwijit A, **Lapmanee S**. Pilot study on improvement in respiratory function in sedentary young female adults with forward shoulder posture following scapulothoracic exercises: a randomized controlled trial. *Advances in Rehabilitation/Postępy Rehabilitacji*. 2023;37(1):23–32.
10. Lektip C, **Lapmanee S**, Petsirasan R, Chaipinyo K, Lektip S, Nawarat J. Construction of the short-form Thai-home fall hazard assessment tool (Thai-HFHAT-SF) and testing its validity and reliability in the elderly. *Int J Environ Res Public Health*. 2022;19(9):5187.



11. Bhubhanil S, Talodthaisong C, Khongkow M, Namdee K, Wongchitrat P, Yingmema W, Hutchison JA, **Lapmanee S**, Kulchat S. Enhanced wound healing properties of guar gum/curcumin-stabilized silver nanoparticle hydrogels. *Sci Rep*. 2021;11(1):21836.
12. Reamtong O, **Lapmanee S**, Tummatom J, Palavong N, Thongsornkleeb C, Ruchirawat S. Synthesis of Benzoazepine Derivatives via Azide Rearrangement and Evaluation of Their Antianxiety Activities. *ACS Med Chem Lett*. 2021.
13. Lektip C, **Lapmanee S**, Rattananupong T, Lohsoonthorn V, Vorayingyong A, Woratanarat T, Sirisuk KO, Suttanon P, Petsirasan R, Kitidumrongsuk P, Jiamjarasrangi W. Predictive validity of three home fall hazard assessment tools for older adults in Thailand. *PLoS One*. 2020;15(12):e0244729.
14. Klosen P, **Lapmanee S**, Schuster C, Guardiola B, Hicks D, Pevet P, Felder-Schmittbuhl MP. MT1 and MT2 melatonin receptors are expressed in nonoverlapping neuronal populations. *J Pineal Res*. 2019:e12575.

#### ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับชาติ ( 5 ปีย้อนหลัง)

1. Thongchote K, Angnanon K, Surpaitoon C, Saikam P, **Lapmanee S**. Efficacy of muscle energy technique of pectoral muscles on forward shoulder posture, chest expansion, respiratory muscle strength, and lung capacity in sedentary students: A preliminary study. *Journal of Safety and Health*. 15(2):2022:211–225. (In Thai)
2. Danviboon K, Sripradite S, Tangbumrungskul P, Sangkanjanavanich C, Pruksaseat C, Jeamanukoolkit P, Sajjai K, Pongputcharapun K, Bhubhanil S, **Lapmanee S**. The effect of heat on sperm quality and male infertility. *Journal of Medicine and Health Sciences*. 2021. (In Thai)
3. Pongpidet S, Surawattavisetpa T, Thanakijborisut K, Seenprachawong B, Srisuwan N, Chatkittikunwong M, Saengkrajang P, Promkaew W, Phaocharoen C, Thodthankhun T, **Lapmanee S**. Risk factors and effective treatments of postpartum depression in young adult mothers. *Vajira Medical Journal: Journal of Urban Medicine*. 2021;65(3):211–220. (In Thai)
4. Sriwong S, Kotsaouppara N, Chawmuangkhong K, Tingpej P, Bhubhanil S, **Lapmanee S**. The assessment and improvement of microbiological environmental quality in the laboratory animal center, Thammasat University, Thailand. *Journal of Safety and Health*. 13(2):2020:176–191. (In Thai)
5. Sukcharoen W, Tangaromsuk P, Sontiatchara M, Waithayakul K, Savedkairop C, Pooongpet J, Kengkoom R, Bhubhanil S, **Lapmanee S**. 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*. 2020;64(5):345–56. (In Thai)
6. Lecktip C, Woratanarat T, Bhubhanil S, **Lapmanee S**. Risk factors for falls in elderly. *Journal of Medicine and Health Sciences*. 2019;26(1):85–103. (In Thai)