

EFFECT OF PLANT-PRODUCED FIBROBLAST GROWTH FACTOR-2 (FGF-2) ON L929 FIBROBLAST CELLS AND HUMAN PERIODONTAL LIGAMENT FIBROBLAST CELLS (HPdLF): A PILOT STUDY

Ployrung DANAIDUSSADEEKUL¹, Nirada DHANESUAN¹, Jittima LUCKANAGUL² and Sorasun RUNGSIYANONTE^{1*}

1 Faculty of Dentistry, Srinakharinwirot University, Thailand; sorasun@g.swu.ac.th (Corresponding Author)

2 Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, Thailand

ARTICLE HISTORY

Received: 3 February 2025

Revised: 24 February 2025

Published: 4 March 2025

ABSTRACT

The application of tissue engineering in dentistry to address post-extraction bone resorption has become a promising strategy, with growth factors playing a key role in enhancing bone regeneration. However, the high cost of growth factors remains a significant limitation, prompting the exploration of Plant-produced growth factors as a more affordable alternative. This study aimed to evaluate the effects of Plant-produced fibroblast growth factor 2 at various concentrations (1.56, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, and 200 ng/mL) on L929 fibroblast cells and human periodontal ligament fibroblasts (HPdLF). Cell viability was assessed using the MTT assay at 48 hours. The results demonstrated no significant differences in cell viability in the L929 fibroblast cell line across all tested concentrations of Plant-Produced FGF-2. In contrast, for HPdLF cells, concentrations of 25, 50, 100, and 200 ng/mL showed statistically significant increases in cell viability compared to the positive control ($p < 0.05$). These findings suggest that Plant-Produced FGF-2 can effectively promote the viability of HPdLF cells, while having no significant effect on L929 fibroblasts cells. These findings suggest that the response to Plant-produced FGF-2 varies between different cell types, highlighting the importance of cell-specific responses in therapeutic applications.

Keywords: Fibroblast Growth Factor 2 (FGF-2), L929 Fibroblast Cell, Human Periodontal Ligament Fibroblast Cells, Tissue Engineering

CITATION INFORMATION: Danaidussadeekul, P., Dhanesuan, N., Luckanagul, J., & Rungsiyanonte, S. (2025). Effect of Plant-Produced Fibroblast Growth Factor-2 (FGF-2) on L929 Fibroblast Cells and Human Periodontal Ligament Fibroblast Cells (HPdLF) : A Pilot Study. *Procedia of Multidisciplinary Research*, 3(3), 25

ผลของไฟโบรบลาสต์โกรทแฟคเตอร์ 2 จากพืชต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์แอล 929 และเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเอ็นอีดปริทันต์ในมนุษย์: การศึกษานำร่อง

พลอยรุ่ง ดนัยดุษฎีกุล¹, นีรดา ธเนศวร¹, จิตติมา ลัคนากุล² และ สรสิทธิ์ รังสิยานนท์^{1*}

1 คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ; Sorasun@g.swu.ac.th (ผู้ประพันธ์บรรณกิจ)

2 คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

การนำงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อมาประยุกต์ใช้ทางทันตกรรมเพื่อแก้ไขปัญหากระดูกละลายตัวหลังการถอนฟัน โดยมีการใช้โกรทแฟคเตอร์เพื่อส่งเสริมการสร้างกระดูกทางคลินิก แต่ยังมีข้อจำกัดด้านราคา ส่งผลให้มีการผลิตโกรทแฟคเตอร์จากพืชเพื่อลดค่าใช้จ่าย งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของไฟโบรบลาสต์โกรทแฟคเตอร์ 2 จากพืช (Plant-produced FGF-2) ในความเข้มข้นที่แตกต่างกัน (1.56, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 และ 200 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) ต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์แอล 929 (L929) และเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเอ็นอีดปริทันต์มนุษย์ (HPdLF) ทดสอบความมีชีวิตของเซลล์ (Cell Viability) ด้วยวิธีเอ็มทีที (MTT) ในเวลา 48 ชั่วโมง ผลการทดลองพบว่าในกลุ่มเซลล์ไฟโบรบลาสต์แอล 929 ไม่มีความแตกต่างทางสถิติในทุกความเข้มข้นของ Plant-Produced FGF-2 รวมถึงกลุ่มควบคุม แต่กลุ่มเซลล์ HPdLF พบว่า ความเข้มข้นที่ทำให้ความมีชีวิตของเซลล์แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) คือ 25, 50, 100 และ 200 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าเซลล์ทั้งสองชนิดมีการตอบสนองต่อ Plant-produced FGF-2 ที่แตกต่างกัน ซึ่งการตอบสนองนั้นขึ้นอยู่กับเซลล์แต่ละชนิด

คำสำคัญ: ไฟโบรบลาสต์โกรทแฟคเตอร์ 2, เซลล์ไฟโบรบลาสต์แอล 929, เซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเอ็นอีดปริทันต์ในมนุษย์, วิศวกรรมเนื้อเยื่อ

ข้อมูลการอ้างอิง: พลอยรุ่ง ดนัยดุษฎีกุล, นีรดา ธเนศวร, จิตติมา ลัคนากุล และ สรสิทธิ์ รังสิยานนท์. (2568). ผลของไฟโบรบลาสต์โกรทแฟคเตอร์ 2 จากพืชต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์แอล 929 และเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเอ็นอีดปริทันต์ในมนุษย์ : การศึกษานำร่อง. *Procedia of Multidisciplinary Research*, 3(3), 25

บทนำ

ปัจจุบันมนุษย์เราพบกับปัญหาการสูญเสียเนื้อเยื่อและอวัยวะจากการเป็นโรค การบาดเจ็บ หรือความผิดปกติตั้งแต่กำเนิด จึงได้มีความพยายามในการนำเทคโนโลยีและความรู้ทางด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อมาใช้ในการพัฒนาสารทดแทนทางชีวภาพ (Biomaterial) เพื่อแก้ไขปัญหาข้างต้น (Langer & Vacanti, 1993; Caddeo, Boffito, & Sartori, 2017) โดยส่วนประกอบหลักของงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อ ได้แก่ 1) เซลล์ 2) สารส่งสัญญาณ ได้แก่ โกรทแฟคเตอร์ 3) โครงร่างชีวภาพหรือสเคฟโฟลด์ (Scaffold) ด้านพันธุกรรมพบว่า ปัญหาเกี่ยวกับการสูญเสียฟัน ส่งผลให้เกิดการละลายตัวของกระดูกหลังการถอนฟัน จึงได้นำงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อเข้ามาประยุกต์ใช้ในการรักษาการสูญเสียเนื้อเยื่อของกระดูกหลังถอนฟัน โดยนำกระดูกของผู้ป่วยเอง (Autograft) หรือการนำกระดูกมนุษย์จากผู้บริจาค (Allograft) หรือกระดูกจากสิ่งมีชีวิตต่างสายพันธุ์ (Xenograft) หรือสารสังเคราะห์ (Alloplastic material) (Rogers & Greene, 2012; Kowalczewski & Saul, 2018) มาใช้ในการปลูกกระดูกเพื่อให้มีปริมาณกระดูกเพียงพอสำหรับการฝังรากเทียม โดยมีการนำโกรทแฟคเตอร์มาทดลองเพื่อให้เกิดประสิทธิภาพในการสร้างกระดูกมากยิ่งขึ้น แต่มีข้อจำกัดในเรื่องราคาที่ค่อนข้างสูง ด้านของสารสื่อสัญญาณนั้น มีการศึกษาและทดลองโกรทแฟคเตอร์กับระบบขนส่งต่าง ๆ ซึ่งโกรทแฟคเตอร์นั้นมีหลายชนิดที่เกี่ยวข้องกับการฟื้นฟูของเนื้อเยื่อกระดูก เช่น มีการศึกษานำไฟโบรบลาสต์โกรทแฟคเตอร์ 2 หรือ basic Fibroblast Growth Factor มาทดสอบกระตุ้นการหายของแผลของสัตว์ทดลองพบว่า FGF-2 สามารถกระตุ้นให้เกิดการปิดของแผลได้ดีที่สุด (Nakamizo et al., 2013) นอกจากนี้ไฟโบรบลาสต์โกรทแฟคเตอร์ 2 (FGF-2) ได้รับความสนใจและศึกษาในงานฟื้นฟูของเนื้อเยื่อกระดูกและเนื้อเยื่ออ่อนเนื่องจากเป็นตัวกระตุ้นทำให้เกิดการหายของแผล การแบ่งตัวและการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์จำเพาะ เช่นเซลล์ไฟโบรบลาสต์ เซลล์เยื่อบุผิว เป็นต้น โดยออกฤทธิ์ส่งเสริมในกระบวนการสร้างหลอดเลือดและการสร้างกระดูก (Novais et al., 2021; Yun et al., 2010) โกรทแฟคเตอร์ที่นำมาใช้ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อ มีการพัฒนาด้วยเทคนิคต่าง ๆ โดยมีการผลิตจากทั้งแบคทีเรีย แมลงและพืช ออกมาเป็นรีคอมบิแนนท์โปรตีน การที่นำพืชมาผลิตโกรทแฟคเตอร์มีข้อดี คือ มีราคาที่ถูกลง สามารถผลิตได้จำนวนมาก นำมาทำให้บริสุทธิ์ได้ง่าย ปราศจากความเสี่ยงในการติดเชื้อจากแบคทีเรียและไวรัส (Corbin et al., 2020) ดังนั้น โกรทแฟคเตอร์จากพืชจึงเป็นตัวเลือกที่น่าสนใจ โดยสารที่เรานำมาใช้ คือ ไฟโบรบลาสต์โกรทแฟคเตอร์ 2 จากพืชซึ่งทำการพัฒนามาจาก บริษัท ไบยา ไฟโตฟาม จำกัด ทางผู้วิจัยจึงมีความต้องการที่จะศึกษาหาผลของไฟโบรบลาสต์โกรทแฟคเตอร์ 2 จากพืช เมื่อนำมาทดสอบกับเซลล์ไฟโบรบลาสต์แอล 929 และเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเอ็นยีดปริทันต์ในมนุษย์เพื่อนำโกรทแฟคเตอร์ชนิดนี้เป็นตัวแทนนำมาประยุกต์ใช้ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อต่อไปได้

การทบทวนวรรณกรรม

การหายของแผลถอนฟัน กระบวนการนี้ใช้เวลาตั้งแต่ถอนฟันเสร็จทันทีจนแผลหายประมาณ 6 เดือน แต่ในบางการศึกษาพบว่าใช้เวลานานกว่า 1 ปี หลังถอนฟัน การหายของแผลถอนฟันจะแบ่งเป็น 4 ระยะ ได้แก่ 1) ระยะการแข็งตัวของเลือด (hemostasis and coagulation stage) หลังจากที่มีการถอนฟันจะมีเลือดมาปกคลุมแผลและเกิดลิ่มเลือด (blood clot) ซึ่งประกอบด้วยเม็ดเลือดขาว เม็ดเลือดแดงและเกล็ดเลือดรวมตัวกันในร่างแหไฟบริน เพื่อช่วยห้ามเลือดนอกจากนี้ยังทำหน้าที่เป็นโครงร่างชีวภาพ (scaffold) ให้เซลล์ต่าง ๆ มายึดเกาะอีกด้วย เกิดในช่วง 24 ชั่วโมงแรก 2) ระยะการอักเสบ (inflammatory stage) เกิดในระยะ 48 ถึง 72 ชั่วโมงหลังถอนฟัน มีการเคลื่อนที่ การเปลี่ยนเป็นเซลล์จำเพาะ การแบ่งตัวของเซลล์อักเสบ มีการตอบสนองของปลดปล่อยไซโตไคน์ (cytokine) และโกรทแฟคเตอร์ อาทิ เช่น platelet-derived growth factor (PDGF), transforming growth factors (TGFs- β) และ fibroblast growth factor (FGF) เป็นต้น นิวโทรฟิลล์ (Neutrophils) จะค่อนข้างเยอะในช่วงแรก ตามมาด้วยแมคโครฟาจ (macrophages) และต่อมาคือ ลิมโฟไซต์ (lymphocytes) โดยที่ macrophage นอกจากจะกำจัดลิ่มเลือดและเนื้อเยื่อที่ตายแล้ว ยังปล่อยโกรทแฟคเตอร์ อาทิเช่น TGFs- β , FGF, epidermal growth factor (EGF) เป็นต้น ซึ่งคอยกระตุ้นให้ไฟโบรบลาสต์และออสติโอบลาสต์ทำให้เกิดกระบวนการหายของแผลต่อไป 3) ระยะการแบ่งตัว (proliferative stage) เป็นช่วงหลังจาก

ถอนฟัน 2 อาทิตย์ โดยจะเกิดกระบวนการที่เซลล์ไฟโบรบลาสต์สร้างเส้นใยคอลลาเจน (fibroplasia) และเกิดการสร้างกระดูกแข็งที่เจริญไม่เต็มที่ (woven bone) 4) ระยะการปรับสภาพ (remodeling stage) ในระยะนี้จะมีการแทนกระดูกแข็งที่เจริญไม่เต็มที่ด้วยกระดูกที่เจริญเต็มที่ (mature bone) ได้แก่ lamellar bone และไขกระดูก กระบวนการนี้จะมีการปรับเปลี่ยนไปอย่างต่อเนื่อง และอาจใช้เวลาหลายเดือนหรือหลายปี (de Sousa Gomes et al., 2019; Araújo et al., 2015) โดยอัตราการหายของแผลขึ้นกับหลายปัจจัยและส่วนใหญ่หลังแผลถอนฟันหายจะมีสันเหงือกที่สั้นและแคบลงเนื่องจากการละลายตัวของกระดูกในตำแหน่งแก้มและริมฝีปาก ซึ่งส่งผลให้ไม่สามารถบักกรากเทียมได้จึงเกิดการพยายามคงสภาพหลังถอนฟัน (socket preservation) เพื่อลดการละลายตัวของกระดูก (Avila-Ortiz et al., 2014)

มีการนำประยุกต์ใช้งานวิศวกรรมเนื้อเยื่อกับทางทันตกรรมนำโกรทแฟกเตอร์มาใช้ทางคลินิก โดยนำสารเกล็ดเลือดมาใช้ครั้งแรกในปี ค.ศ.1974 (Ross et al., 1974) เพราะในเกล็ดเลือดมีโกรทแฟกเตอร์หลากหลายชนิดในการช่วยกระตุ้นการแบ่งเซลล์ การสร้างหลอดเลือด ส่งผลให้แผลหายเร็วมากขึ้น ในปัจจุบันได้มีการนำเพลทเลทริชไฟบริน (Platelet rich fibrin, PRF) ที่ได้จากการปั่นเลือดของผู้ป่วยมาใช้ร่วมกับการถอนฟันและการผ่าตัดทางทันตกรรม เนื่องจากได้มีการทดลองพบว่า แผลถอนฟันในกลุ่มที่ใช้ PRF หายดีกว่า รวมถึงมีความหนาแน่นของกระดูกมากกว่าในกลุ่มที่ไม่ใช้ PRF (Srinivas et al., 2018) มีการนำ recombinant human BMP-2 (rhBMP-2) ที่ผ่านการรับรองขององค์การอาหารและยาของประเทศสหรัฐอเมริกา มาใช้ร่วมกับการปลูกกระดูก (Kelly et al., 2022) หรือใช้ rhFGF-2 ร่วมกับการฟื้นฟูเนื้อเยื่อปริทันต์ (Kitamura et al., 2011)

ไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์ 2 (FGF 2) หรือเบสิคไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์ (Basic fibroblast growth factor) มีโครงสร้างลำดับที่ 3 แบบ β barrel มีแกนตรงกลางเป็นส่วนที่ไม่ชอบน้ำ และมีประจุบริเวณพื้นผิวของโปรตีนมีกลุ่มประจุบวกรวมตัวกันด้านหนึ่งซึ่งเป็นด้านที่เฮพารินมาจับ (Benington et al., 2020) หน้าที่ของ ไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์ชนิดนี้มีผลต่อการเพิ่มจำนวนการเคลื่อนที่ การเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์จำเพาะของเซลล์ออสติโอเบลาสต์ และการสร้างหลอดเลือดที่เป็นหน้าที่หลัก จึงเป็นเหตุผลที่ไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์ 2 นิยมถูกนำไปใช้ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูก (Novais et al., 2021) โกรทแฟกเตอร์ที่นำมาใช้ในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อ มีการพัฒนาด้วยเทคนิคต่างๆ โดยมีการผลิตจากทั้งแบคทีเรีย แมลงและพืช ออกมาเป็นรีคอมบิแนนท์โปรตีน การที่นำพืชมาผลิตโกรทแฟกเตอร์มีข้อดี คือ มีราคาที่ถูก สามารถผลิตได้จำนวนมาก นำมาทำให้บริสุทธิ์ได้ง่าย ปราศจากความเสี่ยงในการติดเชื้อจากแบคทีเรียและไวรัส (Corbin et al., 2020) โดยมีการศึกษานำโกรทแฟกเตอร์ 2 ที่ผลิตจากพืช และแบคทีเรีย E. coli มาทำการทดสอบการแบ่งตัวและเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์จำเพาะของเซลล์เอ็มซีสามที่สามอีหนึ่ง (MC3T3-E1 cell) พบว่า ทั้งสองชนิดสามารถทำให้เซลล์สามารถแบ่งตัว ผลพบว่า ปริมาณโกรทแฟกเตอร์ที่ความเข้มข้น 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรของโกรทแฟกเตอร์ทั้งสองชนิดไม่ได้กระตุ้นให้เกิดการแบ่งตัวของเซลล์แต่เป็นการยับยั้งการแบ่งตัว ส่วนของเข้มข้น 25 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า มีการเพิ่มการสะสมแร่ธาตุของเซลล์ แม้ว่าพบว่า จำนวนเซลล์ที่ติดสีจากการทดสอบด้วย Alizarin red จะน้อยกว่ากลุ่มควบคุมบวก (Poudel et al., 2019) และมีการนำเบสิคไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์ที่สกัดจากพืชมาทดสอบกับเซลล์เพื่อขยายจำนวนของเซลล์ โดยที่ใส่เซลล์ข้างต้นมีลักษณะรูปร่างและการแสดงออกของโปรตีนที่จำเพาะคงเดิม (Jia et al., 2024)

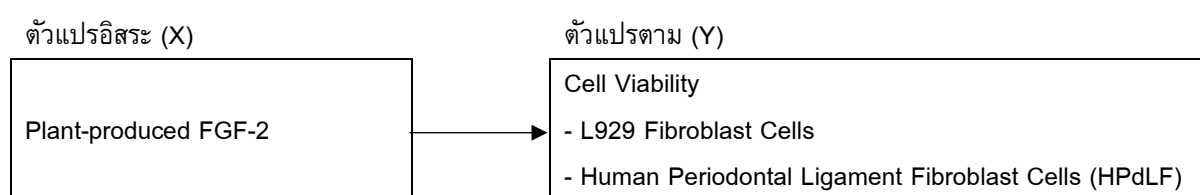
เซลล์ไฟโบรบลาสต์แอล 929 เป็นเซลล์ที่ได้มาจากเนื้อเยื่อเกี่ยวพันบริเวณเนื้อเยื่อไขมันและใต้ผิวหนังของหนูเพศผู้ที่มีอายุ 100 วัน สปีชีส์ Mus musculus C3H/An โดย NCTC clone 929 (L-929) เป็นหนึ่งในสายพันธุ์กลุ่มแรกที่มาจากสายพันธุ์แอล (L strain) เซลล์ชนิดนี้นิยมถูกนำมาใช้ในห้องปฏิบัติการเพื่อทดสอบความเข้ากันได้หรือความเป็นพิษต่อเซลล์ตามคู่มือของระบบมาตรฐาน 10993 Part 5 Cytotoxic test (ISO 10993-5:2009) ซึ่งเป็นการให้เซลล์สัมผัสกับสารสกัดหรือสารละลายต่างๆ มีการนำไปทดสอบความเข้ากันได้ของวัสดุทางทันตกรรมต่อเซลล์ด้วย ในงานวิจัยมักมีการนำมาทดสอบกับเซลล์ข้างต้นก่อนจะนำไปทดสอบกับสัตว์ทดลองต่อไป ข้อดีของเซลล์ชนิดนี้คือมีการเจริญเติบโตที่เร็วและเลี้ยงได้ง่าย

เซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเอ็นยึดปริทันต์ (Periodontal ligament fibroblasts cell: PDLFs) มีลักษณะเป็นทรงกระสวยยาว (spindle-shaped) เป็นเซลล์ที่ได้จากเนื้อเยื่อเอ็นยึดปริทันต์ (periodontal ligament) มีบทบาทสำคัญต่อสาเหตุของโรคปริทันต์และการฟื้นฟูเนื้อเยื่อปริทันต์ ในเนื้อเยื่อปริทันต์ที่มีสุขภาพดีเซลล์ชนิดนี้จะช่วยรักษาสมดุลของเนื้อเยื่ออ่อนและเนื้อเยื่อแข็ง นอกจากนี้ยังสามารถหลั่งไซโตไคน์หรือโกรทแฟกเตอร์ที่มีผลต่อการทำงานของเซลล์ออสติโอคลาส (osteoclast) และเซลล์ออสติโอเบลาสต์ (osteoblast) ที่ทำให้กระดูกงอกขึ้นได้อย่างแข็งแรง (Huang et al., 2024) ในการทดลองมักมีการนำเซลล์ชนิดนี้ไปใช้ทดสอบกับการฟื้นฟูของเนื้อเยื่อ การติดเชืหรือการอักเสบ

สมมติฐานการวิจัย

- 1) ไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์ 2 จากพืชที่มีความเข้มข้นแตกต่างกันส่งผลต่อการมีชีวิตของเซลล์ไฟโบรบลาสต์แอล 929 แตกต่างกัน
- 2) ไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์ 2 จากพืชที่มีความเข้มข้นแตกต่างกันส่งผลต่อการมีชีวิตของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเอ็นยึดปริทันต์ในมนุษย์แตกต่างกัน

กรอบแนวคิดการวิจัย



ภาพที่ 1 กรอบแนวคิด

วิธีดำเนินการวิจัย

เซลล์ที่ใช้ในการศึกษา ได้แก่ เซลล์ไฟโบรบลาสต์แอล 929 จากบริษัทไบโอมีเดียไทยแลนด์ และเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเอ็นยึดปริทันต์ในมนุษย์จากบริษัทลอนซาประเทศไทยจำกัด โดยการศึกษาได้รับการรับรองจริยธรรมการวิจัยจากคณะกรรมการจริยธรรมสำหรับพิจารณาโครงการวิจัยที่ทำในมนุษย์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ หมายเลขรับรอง SWUEC-661020 และ โกรทแฟกเตอร์ที่ใช้ในการศึกษา คือ ไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์ 2 จากพืช *Nicotiana benthamiana* ที่จัดจำหน่ายโดยบริษัท บีจีเอฟแพลนท์ทริกซ์ จำกัด

ขั้นตอนที่ 1 เพาะเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์แอล 929 และเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเอ็นยึดปริทันต์ในมนุษย์ โดยใช้เซลล์ไฟโบรบลาสต์แอล 929 และเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเอ็นยึดปริทันต์ในมนุษย์ลงเพาะเลี้ยงในจานเลี้ยงเซลล์ เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดดีเอ็มอีเอ็ม (DMEM; Dulbecco's Modified Eagle Medium, Sigma-Aldrich, USA) กับ 10% FBS (Fetal Bovine Serum, Gibco, USA) และ 1% Penicillin-Streptomycin (10,000 U/mL, Gibco, USA) นำจานเลี้ยงเซลล์เข้าตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 2-3 วัน เมื่อเซลล์มีความหนาแน่นประมาณร้อยละ 70-80 จึงทำการ subculture ด้วยการใส่ 0.25% trypsin-EDTA 500 ไมโครลิตร (Gibco, USA) ในภาชนะเลี้ยงเซลล์ขนาด 25 (T25) เข้าตู้บ่ม 3 นาที จากนั้นแบ่งไปในภาชนะเลี้ยงเซลล์อันใหม่แล้วใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ โดยเซลล์มาใช้ในการทดลองโดยเซลล์ไฟโบรบลาสต์แอล 929 ใช้เซลล์ลำดับที่ 151-152 และเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเอ็นยึดปริทันต์ในมนุษย์ ใช้เซลล์ลำดับที่ 13-14

ขั้นตอนที่ 2 ใส่เซลล์ไฟโบรบลาสต์แอล 929 ในจานเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม จำนวน 8,000 เซลล์ต่อหลุม จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ลงไป 100 ไมโครลิตร ในวันถัดมาให้ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เดิมออก เตรียมสารละลายโกรทแฟกเตอร์โดยนำไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์ 2 จากพืชลักษณะเป็นผงแห้งแข็ง (Freeze Dried) ในบรรจุภัณฑ์มาละลายในน้ำบริสุทธิ์ (DI water) 1 มิลลิตร จะได้ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร และนำมาเจือจางในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดดีเอ็มอีเอ็มที่มีส่วนผสม 2% FBS (Fetal Bovine Serum), 1% penicillin/streptomycin จนได้ความเข้มข้นที่ 1.56, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 และ 200 นาโนกรัมต่อมิลลิตร เติมสารละลายปริมาตร 100 ไมโครลิตร ในแต่ละหลุม

ขั้นตอนที่ 3 ตรวจความมีชีวิตของเซลล์ไฟโบรบลาสต์แอล 929 ด้วยวิธีวิเคราะห์เอ็มทีที ใน 48 ชั่วโมงของการศึกษา โดยเตรียมนำสาร MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, USA) 5 มิลลิกรัมมาละลายในสารละลายฟีนีเอส ปริมาตร 1 มิลลิตร จนได้สารละลาย MTT 5 มิลลิกรัมต่อ มิลลิตร และผสมกับอาหารเลี้ยงเซลล์ในสัดส่วน 1:10 จากนั้นนำจานเลี้ยงเซลล์ชนิดหลุมที่เลี้ยงไว้มาดูดอาหารเลี้ยง เซลล์เดิมออก ใส่สารละลาย MTT ปริมาตร 100 ไมโครลิตรในแต่ละหลุม จากนั้นนำเข้าตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศา เซลเซียส ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง ต่อมา นำสารละลาย MTT ออกเติมสารละลาย ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO; Dimethyl Sulfoxide, Loba Chemie Pvt. Ltd., India) 100 มิลลิตร ในแต่ละหลุม จากนั้นวางบนเครื่องเขย่าสาร (Biosan, Latvia) เป็นเวลา 10 นาที และนำไปวัดปริมาณการดูดกลืนแสงที่ความยาว 570 นาโนเมตร ด้วยเครื่องอ่านไมโครเพลท (CALIOstar, BMG Labtech, Germany)

การเก็บข้อมูลและการแปลผล ทำโดยประเมินความมีชีวิตของเซลล์ไฟโบรบลาสต์แอล 929 จากปริมาณการดูดกลืนของ แสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ในวิธีวิเคราะห์เอ็มทีที และคำนวณค่าร้อยละความมีชีวิตของเซลล์โดยสูตร

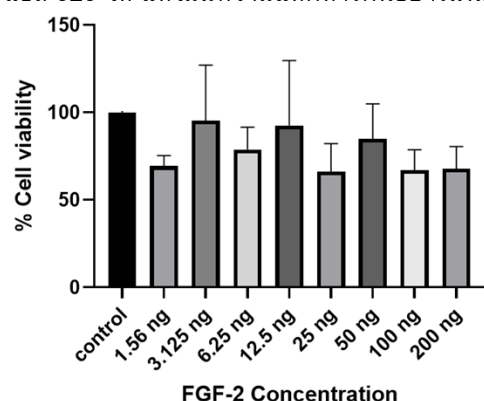
ค่าร้อยละความมีชีวิตของเซลล์ = $100 \times \text{ค่าการดูดกลืนแสง(ตัวอย่าง)} / \text{ค่าการดูดกลืนแสง (กลุ่มควบคุม)}$

ส่วนการวิเคราะห์ทางสถิติ การทดลองจะทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง (triplicate) (Jiang et al., 2021) ต่อเซลล์ไฟโบร บลาสต์แอล 929 และเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเอ็นอีดีปริทันต์ในมนุษย์ ในแต่ละความเข้มข้น ใช้โปรแกรม GraphPad Prism 10 ในการวิเคราะห์ข้อมูล โดยใช้การทดสอบ Shapiro-Wilk test เพื่อดูการกระจายตัวของข้อมูล และใช้การ ทดสอบ One-Way ANOVA วิเคราะห์หาความแตกต่างในกลุ่มทดลอง สถิติทั้งหมดคำนวณที่ระดับความเชื่อมั่น $p < 0.05$

ผลการวิจัย

ผลการทดสอบความมีชีวิตของเซลล์ไฟโบรบลาสต์แอล 929 ด้วยวิธีเอ็มทีที (MTT assay)

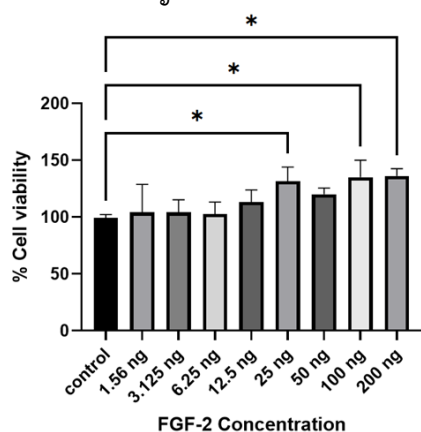
การทดสอบเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์แอล 929 บนจานเลี้ยงเซลล์ขนาด 96 หลุม โดยเติมไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์ 2 จากพีชในความเข้มข้น 1.56, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 และ 200 นาโนกรัมต่อมิลลิตร ลงไป แล้วนำมาทดสอบ ความมีชีวิตของเซลล์ไฟโบรบลาสต์แอล 929 ด้วยวิธีวิเคราะห์เอ็มทีทีใน 48 ชั่วโมง จากผลการทดสอบ เมื่อนำค่าเฉลี่ย ร้อยละความมีชีวิตของเซลล์โดยมีกลุ่มควบคุมบวก คือ กลุ่มที่ไม่เติมไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์ 2 พบว่า ค่าร้อยละ ความมีชีวิตของเซลล์เป็น 100% และกลุ่มที่เติมไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์ 2 ในความเข้มข้น 1.56, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 และ 200 นาโนกรัมต่อมิลลิตร พบว่า ค่าร้อยละความมีชีวิตของเซลล์ ได้แก่ $69.32 \pm 6.02\%$, $95.34 \pm 31.77\%$, $78.86 \pm 12.75\%$, $95.6 \pm 37.09\%$, $66.14 \pm 16.07\%$, $84.88 \pm 20.05\%$, $67.06 \pm 11.61\%$ และ $67.77 \pm 12.83\%$ ตามลำดับ พบว่า ในทุกความเข้มข้นของไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์สามารถพบความมีชีวิตของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ แอล 929 ได้ แต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในแต่ละความเข้มข้น (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 แผนภูมิแสดงค่าดูดกลืนแสงของเซลล์ไฟโบรบลาสต์แอล 929 ที่มีความเข้มข้นของไฟโบรบลาสต์โกรทแฟกเตอร์ 2 ที่แตกต่างกันใน 48 ชั่วโมง

ผลการทดสอบความมีชีวิตของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเอ็นยิดปริทันต์ในมนุษย์ด้วยวิธีเอ็มทีที (MTT assay)

การทดสอบเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเอ็นยิดปริทันต์ในมนุษย์บนจานเลี้ยงเซลล์ขนาด 96 หลุม โดยเติมไฟโบรบลาสต์โกรทแฟคเตอร์ 2 จากพืชในความเข้มข้น 1.56, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 และ 200 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ลงไป แล้วนำมาทดสอบความมีชีวิตของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเอ็นยิดปริทันต์ในมนุษย์ ด้วยวิธีวิเคราะห์เอ็มทีทีใน 48 ชั่วโมง จากผลการทดสอบ เมื่อนำค่าเฉลี่ยร้อยละความมีชีวิตของเซลล์โดยมีกลุ่มควบคุมบวก คือ กลุ่มที่ไม่เติมไฟโบรบลาสต์โกรทแฟคเตอร์ 2 พบว่า ค่าร้อยละความมีชีวิตของเซลล์เป็น 100% และกลุ่มที่เติมไฟโบรบลาสต์โกรทแฟคเตอร์ 2 ในความเข้มข้น 1.56, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 และ 200 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า ค่าร้อยละความมีชีวิตของเซลล์ได้แก่ $104.19 \pm 24.53\%$, $104.25 \pm 10.93\%$, $102.75 \pm 10.54\%$, $113.19 \pm 10.73\%$, $131.56 \pm 12.47\%$, $120.06 \pm 5.46\%$, $135.06 \pm 15.09\%$ และ $136.19 \pm 6.41\%$ ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 3 พบว่า ในทุกความเข้มข้นของไฟโบรบลาสต์โกรทแฟคเตอร์สามารถพบความมีชีวิตของเซลล์ไฟโบรบลาสต์แอล 929 ได้ แต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในแต่ละความเข้มข้น (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 แผนภูมิแสดงค่าดูดกลืนแสงของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเอ็นยิดปริทันต์ในมนุษย์ ที่มีความเข้มข้นของไฟโบรบลาสต์โกรทแฟคเตอร์ 2 ที่แตกต่างกันใน 48 ชั่วโมง เมื่อ * หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

สรุปและอภิปรายผลการวิจัย

จากการทดสอบความมีชีวิตของเซลล์ทั้งสองชนิดกับความเข้มข้นที่แตกต่างกันของ plant-produced FGF-2 ด้วยวิธีเอ็มทีที เป็นการศึกษาที่นิยมใช้กัน ซึ่งจะเกิดกระบวนการดังกล่าวกับเซลล์ที่มีชีวิตอยู่โดยการวัดปริมาณการเปลี่ยนแปลงของสีจากสีเหลืองของ MTT เป็นผลึกสีม่วงของฟอร์มาซาน (formazan) ที่ไม่ละลายน้ำแต่สามารถละลายได้ใน dimethyl sulfoxide (DMSO) สารละลายสีที่ได้จะถูกวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร (López-García et al., 2014) ซึ่งจะบ่งชี้ถึงความสามารถในการแบ่งตัวและการเจริญเติบโตของเซลล์ และตามข้อกำหนดของ ISO 10993-5 ถ้าค่าร้อยละความมีชีวิตของเซลล์มากกว่า 80% จะถือว่าสารทดสอบไม่เป็นพิษต่อเซลล์ ถ้าอยู่ในช่วง 60-80% แปลได้ว่าสารนั้นเป็นพิษอ่อน อยู่ในช่วง 40-60% แปลได้ว่าเป็นพิษปานกลาง และหากอยู่ในช่วงต่ำกว่า 40% แปลได้ว่าเป็นพิษรุนแรง (ISO 10993-5:2009) ผลในการศึกษาครั้งนี้พบว่า ค่าร้อยละความมีชีวิตของเซลล์ของไฟโบรบลาสต์แอล 929 มีค่าเฉลี่ยในกลุ่มที่เติมไฟโบรบลาสต์โกรทแฟคเตอร์ 2 จากพืชอยู่ในช่วงประมาณ 60-90% ซึ่งมีค่าต่ำกว่ากลุ่มควบคุมบวก อาจแปลผลได้ว่าไฟโบรบลาสต์โกรทแฟคเตอร์ 2 จากพืช เป็นพิษอ่อนต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์แอล 929 แม้ว่าในทางสถิติพบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในทุกกลุ่ม และผลการศึกษาค่าร้อยละความมีชีวิตของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเอ็นยิดปริทันต์ในมนุษย์ มีค่าเฉลี่ยในกลุ่มที่เติมไฟโบรบลาสต์โกรทแฟคเตอร์ 2 จากพืชที่มากกว่า 100% ซึ่งในความเข้มข้นที่ 25, 100 และ 200 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร มีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นั้นหมายถึงความเข้มข้นที่กล่าวมาอาจส่งผลให้เซลล์มีการเจริญเติบโตหรือมีชีวิตที่เพิ่มขึ้น คล้ายการศึกษาอื่นที่พบว่า FGF-2 สามารถกระตุ้นให้เกิดการเจริญเติบโตในเซลล์เอ็น

ยัติปริทันต์ในมนุษย์ (An, Huang, Gao, Ling, Huang, & Xiao, 2015) นอกจากนี้ยังได้มีการทดลองนำไฟโบรบลาสต์ โกรทแฟคเตอร์ 2 จากพืชที่ความเข้มข้น 2 นาโนกรัมต่อมิลลิเมตร มาทดสอบกับเซลล์ต้นกำเนิดจากเส้นเอ็นปริทันต์ของมนุษย์ (human periodontal ligament stem cells: hPDLSCs) มีค่าความมีชีวิตของเซลล์มากกว่ากลุ่มที่ไม่ใส่ โกรทแฟคเตอร์ (Rattanapisit et al., 2020) จากผลการทดลองที่ความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น ไม่ส่งผลต่อค่าความมีชีวิตของ เซลล์ที่เพิ่มขึ้น คล้ายคลึงกับการทดลองในปี 2018 เพื่อศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ bFGF และ EGF ต่อเซลล์ ไฟโบรบลาสต์ในการฟื้นฟูเนื้อเยื่อฟันผุเชิงกราน โดยใช้ความเข้มข้นที่ 1, 10 และ 100 นาโนกรัมต่อมิลลิเมตร ทดสอบวันที่ 1 ถึง 7 ผลการศึกษาพบช่วงวันที่ 6 และ 7 ในกลุ่มความเข้มข้นที่เหมาะสมของ bFGF และ EGF คือ 10 นาโนกรัมต่อมิลลิเมตร เนื่องจากค่าความมีชีวิตของเซลล์เพิ่มขึ้นสูงสุด แม้ว่าความเข้มข้นที่ 100 นาโนกรัมต่อมิลลิเมตร จะมีความเข้มข้นมากกว่าแต่ไม่ได้ส่งผลให้ค่าความมีชีวิตสูงกว่ากลุ่ม 10 นาโนกรัมต่อมิลลิเมตร (Jia et al., 2018). และ การศึกษาในปี 2019 มีการนำ bFGF ที่ความเข้มข้น 10, 25, 50 และ 100 นาโนกรัมต่อมิลลิเมตร มาทดสอบกับ hPDLSCs ในวันที่ 3 และวัดค่าความดูดกลืนแสงพบว่า ที่ความเข้มข้น 50 นาโนกรัมต่อมิลลิเมตร มีการกระตุ้นให้เกิด การเจริญเติบโตได้อย่างมีนัยสำคัญกับกลุ่มควบคุม ส่วนในกลุ่มความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อมิลลิเมตร ไม่แตกต่างจากกับควบคุม (Kang et al., 2019) แต่บางการศึกษาแสดงให้เห็นว่าปริมาณของโกรทแฟคเตอร์ส่งผลต่อ ความมีชีวิตของเซลล์ด้วย โดยนำ FGF-2 ที่ความเข้มข้น 0.1, 1, 20 และ 50 นาโนกรัมต่อมิลลิเมตร มาทดสอบกับเซลล์ MC3T3-E1 เพื่อดูค่าความมีชีวิตในวันที่ 2 ของการทดลองพบว่า กลุ่มความเข้มข้นที่ 50 นาโนกรัมต่อมิลลิเมตร แตกต่างกับกลุ่มที่ไม่ใส่อย่างมีนัยสำคัญ (Park, 2011)

จากการทบทวนวรรณกรรมแสดงให้เห็นว่า ค่าความเข้มข้นของโกรทแฟคเตอร์ที่เคยนำมาทดสอบมีหลากหลายมาก ดังนั้นทางผู้วิจัยจึงได้อ้างอิงจากคำแนะนำของบริษัท คือ ความเข้มข้นที่ 1-100 นาโนกรัมต่อมิลลิเมตร การศึกษาครั้งนี้พบว่า เมื่อโกรทแฟคเตอร์ชนิดเดียวกันถูกนำมาทดสอบในเซลล์ที่แตกต่างกัน กลับให้ผลลัพธ์ที่แตกต่าง กัน ซึ่งสามารถสรุปได้ว่า ชนิดของโกรทแฟคเตอร์และชนิดของเซลล์ที่ใช้ทดสอบอาจมีผลต่อผลลัพธ์ที่ได้รับ เซลล์ทั้งสองชนิดเป็นเซลล์ไลน์แต่เซลล์ไฟโบรบลาสต์แอล 929 นั้นเป็นเซลล์ที่มาจากหนูอาจให้ผลการตอบสนองที่แตกต่างจาก เซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเอนยัตปริทันต์ในมนุษย์ซึ่งเป็นเซลล์ของมนุษย์ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาความเป็นพิษของผง สแกนไทเทเนียมไดออกไซด์ต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์แอล 929 และเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเอนยัตปริทันต์ในมนุษย์ พบว่า เซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเอนยัตปริทันต์ในมนุษย์มีความทนทานต่อความเป็นพิษของผงสแกนไทเทเนียมมากกว่าเซลล์ไฟโบร บลาสต์แอล 929 (Oberoi et al., 2020) ดังนั้น เมื่อมีการเลือกใช้โกรทแฟคเตอร์ชนิดใด ควรดำเนินการทดสอบ ประสิทธิภาพและผลกระทบของโกรทแฟคเตอร์นั้นๆ ในเซลล์ที่เกี่ยวข้องอย่างรอบคอบรวมถึงความเข้มข้นที่เหมาะสม ของโกรทแฟคเตอร์ก่อนนำมาใช้ในทางปฏิบัติ เนื่องจากในการศึกษานี้เป็นระยะเริ่มต้นของการทดลองใน ห้องปฏิบัติการของ plant-produced FGF-2 จึงควรมีการทดสอบลำดับถัดไปในเซลล์ชนิดอื่นๆ รวมถึงการทดลองใน สัตว์ทดลองก่อนนำไปใช้ในทางคลินิกต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- Araújo, M. G., Silva, C. O., Misawa, M., & Sukekava, F. (2015). Alveolar socket healing: What can we learn?. *Periodontol 2000*, 68(1), 122-134.
- Avila-Ortiz, G., Elangovan, S., Kramer, K. W., Blanchette, D., & Dawson, D. V. (2014). Effect of alveolar ridge preservation after tooth extraction: A systematic review and meta-analysis. *J Dent Res*, 93(10), 950-958.
- Benington, L., Rajan, G., Locher, C., & Lim, L. Y. (2020). Fibroblast growth factor 2—A review of stabilisation approaches for clinical applications. *Pharmaceutics*, 12(6).

- Caddeo, S., Boffito, M., & Sartori, S. (2017). Tissue engineering approaches in the design of healthy and pathological in vitro tissue models. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 5, 40.
- Corbin, J., McNulty, M., Macharoen, K., McDonald, K., & Nandi, S. (2020). Technoeconomic analysis of semicontinuous bioreactor production of biopharmaceuticals in transgenic rice cell suspension cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, 117, 148-157.
- de Sousa Gomes, P., Daugela, P., Poskevicius, L., Mariano, L., & Fernandes, M. H. (2019). Molecular and cellular aspects of socket healing in the absence and presence of graft materials and autologous platelet concentrates: A focused review. *J Oral Maxillofac Res*, 10(3), e2.
- Huang, Y., Tang, Y., Zhang, R., Wu, X., Yan, L., Chen, X., Wu, Q., Chen, Y., Lv, Y., & Su, Y. (2024). Role of periodontal ligament fibroblasts in periodontitis: Pathological mechanisms and therapeutic potential. *J Transl Med*, 22(1), 1136.
- Jia, J., Wilson, W., Karmaker, A., Nishimura, A., Otsuka, H., Ohara, K., Okawa, H., McDonald, K., Nandi, S., Albeck, J. G., Rodriguez, R., Zhou, P., & Nolte, J. A. (2024). Applications of plant-made fibroblast growth factor for human pluripotent stem cells. *Stem Cells Development*, 33(3-4), 57-66.
- Jia, Y. Y., Zhou, J. Y., Chang, Y., An, F., Li, X. W., Xu, X. Y., Sun, X. L., Xiong, C. Y., & Wang, J. L. (2018). Effect of optimized concentrations of basic fibroblast growth factor and epidermal growth factor on proliferation of fibroblasts and expression of collagen: Related to pelvic floor tissue regeneration. *Chinese Medical Journal (English)*, 131(17), 2089-2096.
- Jiang, L., Qi, Y., Kong, X., Wang, R., Qi, J., Lin, F., Cui, X., & Liu, Z. (2021). Activin A as a novel chemokine induces migration of L929 fibroblasts by ERK signaling in microfluidic devices. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 660316.
- Kang, W., Liang, Q., Du, L., Shang, L., Wang, T., & Ge, S. (2019). Sequential application of bFGF and BMP-2 facilitates osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells. *Journal of Periodontal Research*, 54(4), 424-434.
- Kelly, M. P., et al. (2022). Systematic review and meta-analysis of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in localized alveolar ridge and maxillary sinus augmentation. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 74(5), 928-939.
- Kitamura, M., Akamatsu, M., Machigashira, M., et al. (2011). FGF-2 stimulates periodontal regeneration: Results of a multi-center randomized clinical trial. *Journal of Dental Research*, 90(1), 35-40.
- Kowalczewski, C. J., & Saul, J. M. (2018). Biomaterials for the delivery of growth factors and other therapeutic agents in tissue engineering approaches to bone regeneration. *Frontiers in Pharmacology*, 9, 513.
- Langer, R., & Vacanti, J. P. (1993). Tissue engineering. *Science*, 260(5110), 920-926.
- López-García, J., Lehocký, M., Humpolíček, P., & Sába, P. (2014). HaCaT keratinocytes response on antimicrobial atelocollagen substrates: Extent of cytotoxicity, cell viability and proliferation. *Journal of Functional Biomaterials*, 5(2), 43-57.
- Nakamizo, S., Egawa, G., Doi, H., Natsuaki, Y., Miyachi, Y., & Kabashima, K. (2013). Topical treatment with basic fibroblast growth factor promotes wound healing and barrier recovery induced by skin abrasion. *Skin Pharmacology and Physiology*, 26, 22-29.

- Novais, A., Chatzopoulou, E., Chaussain, C., & Gorin, C. (2021). The potential of FGF-2 in craniofacial bone tissue engineering: A review. *Cells*, 10(4), 932.
- Park, J.-B. (2011). Effects of fibroblast growth factor 2 on osteoblastic proliferation and differentiation by regulating bone morphogenetic protein receptor expression. *Journal of Craniofacial Surgery*, 22(5), 1880-1882.
- Poudel, S. B., Min, C. K., Lee, J. H., Shin, Y. J., Kwon, T. H., Jeon, Y. M., & Lee, J. C. (2019). Local supplementation with plant-derived recombinant human FGF2 protein enhances bone formation in critical-sized calvarial defects. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, 37(5), 900-912.
- Oberoi, G., Müller, A., Moritz, A., Shokoohi-Tabrizi, H. A., Kurzmann, C., & Agis, H. (2020). Titanium dioxide-based scanning powder can modulate cell activity of oral soft tissue-Insights from in vitro studies with L929 cells and periodontal fibroblasts. *Journal of Prosthodontic Research*, 64(1), 34-42.
- Rattanasit, K., Jantimarn, A., Kaewpungsup, P., Shanmugaraj, B., Pavasant, P., Namdee, K., & Phoolcharoen, W. (2020). Plant-produced basic fibroblast growth factor (bFGF) promotes cell proliferation and collagen production. *Planta Medica International Open*, 7, e150-e157.
- Srinivas, B., Das, P., Rana, M. M., et al. (2018). Wound healing and bone regeneration in postextraction sockets with and without platelet-rich fibrin. *Annals of Maxillofacial Surgery*, 8(1), 28-34.

Data Availability Statement: The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

Conflicts of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.



Copyright: © 2025 by the authors. This is a fully open-access article distributed under the terms of the Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International (CC BY-NC-ND 4.0).