

การศึกษาผลของน้ำตาลดีไรโบสต่อการเจริญของเซลล์ไฟโบรบลาสต์

The influence of D-Ribose on fibroblast proliferation

คารินทิพย์ เชษฐกุลรัตน์

อีเมล: 6552003263@lamduan.mfu.ac.th

หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชะลอวัยและฟื้นฟูสุขภาพ

สำนักวิชาเวชศาสตร์ชะลอวัยและฟื้นฟูสุขภาพ มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

อาจารย์ ดร.อาริยา สาริกะภูติ

อีเมล: ariya.sar@mfu.ac.th

สำนักวิชาเวชศาสตร์ชะลอวัยและฟื้นฟูสุขภาพ มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

บทคัดย่อ

เซลล์ไฟโบรบลาสต์ (Fibroblasts) เป็นเซลล์สำคัญในชั้นหนังแท้ที่มีบทบาทในการสร้างคอลลาเจนและองค์ประกอบต่าง ๆ ของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน กระบวนการเสื่อมชราตามอายุส่งผลให้ความสามารถในการเจริญเติบโตและการผลิตพลังงานในระดับเซลล์ (ATP) ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (Fibroblasts) ลดลง นำไปสู่ความเสื่อมสภาพของผิวหนังและการซ่อมแซมเนื้อเยื่อ น้ำตาลดี-ไรโบส (D-Ribose) เป็นน้ำตาลชนิดเพนโทสที่มีบทบาทสำคัญในการสังเคราะห์อะดีโนซีนไตรฟอสเฟต (ATP) ซึ่งเป็นแหล่งพลังงานหลักของเซลล์ จึงมีศักยภาพในการส่งเสริมการเจริญและการทำงานของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของน้ำตาลดี-ไรโบสต่อการเจริญของเซลล์ไฟโบรบลาสต์

โดยทำการทดลองในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ปฐมภูมิจากผิวหนังมนุษย์ (HDFa) ที่เพาะเลี้ยงในอาหารชนิด DMEM ซึ่งกลุ่มทดลองได้รับน้ำตาลดี-ไรโบสที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน 5 ระดับ ได้แก่ 1.25, 2.5, 5, 10 และ 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมทางลบ (0.1% FBS) และกลุ่มควบคุมทางบวก (10% FBS) ทำการบันทึกภาพสัณฐานวิทยาและประเมินค่าร้อยละความมีชีวิตของเซลล์ด้วยวิธี MTT assay วิเคราะห์ข้อมูลด้วยสถิติ One-way ANOVA และ Dunnett's test

ผลการวิจัยพบว่า เซลล์ผิวหนังในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับน้ำตาลดี-ไรโบสความเข้มข้นต่ำ (1.25, 2.5 และ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ยังคงรูปร่างเรียวยาวปกติและยึดเกาะพื้นผิวได้ดี โดยมีความมีชีวิตของเซลล์ใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุมทางลบ อย่างไรก็ตาม เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลดี-ไรโบสเป็น 10 และ 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าความมีชีวิตของเซลล์มีแนวโน้มลดลง

โดยเฉพาะที่ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่งผลให้ค่าความมีชีวิตของเซลล์ลดลงอย่างชัดเจน เหลือเพียงร้อยละ 41.78 ± 0.46 ซึ่งลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมทางลบ ($p < 0.001$) และพบเซลล์มีลักษณะหดตัวและสูญเสียรูปร่างตามลักษณะปกติของเซลล์ไฟโบรบลาสต์

สรุปผลการศึกษาได้ว่า น้ำตาลดี-ไรโบสในความเข้มข้นสูง โดยเฉพาะ 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่งผลให้ค่าความมีชีวิตของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ผิวหนังมนุษย์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ภายใต้สภาวะการทดลองนี้ ขณะที่ความเข้มข้นต่ำถึงปานกลาง (1.25–5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ไม่ส่งผลกระทบต่อความมีชีวิตของเซลล์ ผลการศึกษาดังกล่าวเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญสำหรับการกำหนดช่วงความเข้มข้นที่เหมาะสมของน้ำตาลดี-ไรโบสในการประยุกต์ใช้ด้านเวชศาสตร์ชะลอวัยและเครื่องสำอาง เพื่อความปลอดภัยต่อเซลล์ผิวหนังในอนาคต

คำสำคัญ: น้ำตาลดี-ไรโบส, เซลล์ไฟโบรบลาสต์ผิวหนังมนุษย์, ความมีชีวิตของเซลล์, ความเสื่อมชราของผิวหนัง, การศึกษาในหลอดทดลอง

Abstract

Fibroblasts are essential cells in the dermis that play a crucial role in the synthesis of collagen and other connective tissue components. Aging is associated with a decline in fibroblast proliferative capacity and cellular energy production, leading to skin deterioration and impaired tissue repair. D-ribose is a naturally occurring pentose sugar that plays an important role in the biosynthesis of adenosine triphosphate (ATP), the primary energy source of cells. Therefore, D-ribose has the potential to promote the growth and function of fibroblasts. This study aimed to investigate the influence of D-ribose on fibroblast proliferation.

Primary Human Dermal Fibroblasts, Adult (HDFa), were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) and treated with D-ribose at five different concentrations: 1.25, 2.5, 5, 10, and 20 mg/mL for 72 hours. The experimental groups were compared with a negative control group (0.1% FBS) and a positive control group (10% FBS). Cell morphology was observed microscopically, and cell viability was evaluated using the MTT assay. Statistical analysis was performed using one-way analysis of variance (One-way ANOVA) followed by Dunnett's test.

The results showed that fibroblasts treated with low concentrations of D-ribose (1.25, 2.5, and 5 mg/mL) maintained their normal spindle-shaped morphology and attachment characteristics, with cell viability comparable to that of the negative control group. However, increasing the D-ribose concentration to 10 and 20 mg/mL resulted in a reduction in cell viability. At 20 mg/mL, cell viability decreased markedly to $41.78 \pm 0.46\%$, which was significantly lower than the negative control group ($p < 0.001$). In addition, cells exhibited shrinkage and loss of their normal fibroblast morphology.

In conclusion, a high concentration of D-ribose, particularly 20 mg/mL, significantly reduced the viability of human dermal fibroblasts under the conditions employed in this study, whereas low to moderate concentrations (1.25–5 mg/mL) did not adversely affect cell viability. These findings provide fundamental information for determining an appropriate concentration range of D-ribose for applications in anti-aging medicine and cosmetic products, with consideration for long-term skin cell safety.

Keywords: D-ribose, Human Dermal Fibroblasts, Cell Viability, Skin aging, *In vitro*

บทนำ หลักการและเหตุผล

ความสามารถในการเจริญเติบโตของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ลดลง เป็นผลมาจากกระบวนการเสื่อมชราตามอายุ การสูญเสียความสามารถในการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไฟโบรบลาสต์มีความสัมพันธ์กับการลดลงของความสามารถในการสังเคราะห์คอลลาเจนและการเพิ่มขึ้นของเอนไซม์เมทัลโลโปรตีนเนสที่ทำหน้าที่สลายชั้นเมทริกซ์ (Matrix degrading metalloproteinase : MMP) การเพิ่มจำนวนของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ลดลงตามอายุนั้น เชื่อมโยงกับการผลิตปัจจัยการเจริญเติบโต (Growth factor) ที่ลดลง และที่สำคัญกว่านั้นคือการลดการตอบสนองต่อสารกระตุ้นการเจริญเติบโตที่เกี่ยวข้อง การเปลี่ยนแปลงที่เกี่ยวข้องกับอายุ ส่งผลต่อองค์ประกอบของเซลล์ทั้งหมดในผิวหนังที่สำคัญ คือการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของผิวหนัง เพราะเซลล์เหล่านี้ทำหน้าที่ในการรักษาเนื้อเยื่อเกี่ยวพันของผิวหนัง ซึ่งพบว่าการเปลี่ยนแปลงภายในของการทำงานของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ตามอายุ รวมกับความเครียดจากสิ่งแวดล้อม เช่น รังสียูวี ทำให้เกิดความเสียหายต่อเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ซึ่งนำไปสู่การทำงานของเซลล์ที่เสื่อมลง ทำให้เกิดริ้วรอยบนผิวหนัง และเกิดรอยถลอกเรื้อรัง ซึ่งนำไปสู่การเกิดแผลเปิดจากการบาดเจ็บเล็กน้อย ๆ น้อย ๆ และลดความสามารถในการ

สมานแผล (Varani, 2010) นอกจากนี้ยังพบว่า การเปลี่ยนแปลงของระดับพลังงานในระดับเซลล์ของ เซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ผิดปกติไป นำไปสู่ความเสื่อมชราของผิวหนัง และการขาดพลังงาน ส่งผลให้เกิด การเปลี่ยนแปลงการทำงานของผิวหนังได้อีกด้วย (Shechterle & Shechterle, 2018)

น้ำตาลดี-ไรโบสเป็นน้ำตาลคาร์บอน 5 อะตอมซึ่งเป็นไอโซฟอร์มหลักของน้ำตาลไรโบสที่มีความเสถียร เป็นองค์ประกอบสำคัญในการสังเคราะห์อะดีโนซีน ไตรฟอสเฟต หรือ ATP ซึ่งเป็นโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการต่างๆของเซลล์ และเป็นโมเลกุลหลักที่เป็นแหล่งพลังงานที่พร้อมใช้งานให้กับเซลล์ (Li et al., 2021) ซึ่งอาจส่งผลให้เกิดการเพิ่มการเจริญของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ การเพิ่มการเจริญของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ซึ่งเป็นเซลล์ที่สำคัญในการฟื้นฟูเนื้อเยื่อและการรักษาบาดแผล เป็นกระบวนการที่สำคัญในการรักษาสมดุและความปลอดภัยของเนื้อเยื่อ มีปัจจัยมากมายที่มีผลต่อการเพิ่มการเจริญของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ ซึ่งรวมถึงการเพิ่มพลังงานที่ให้สำหรับกระบวนการเจริญของเซลล์ แม้จะมีข้อมูลเบื้องต้นที่ชี้ให้เห็นถึงความเป็นไปได้ในการเชื่อมโยงระหว่างน้ำตาลดี-ไรโบสและการเพิ่มการเจริญของเซลล์ แต่ข้อมูลของน้ำตาลดี-ไรโบสต่อการเพิ่มการเจริญของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ยังมีไม่เพียงพอ การศึกษาความสัมพันธ์นี้ จึงอาจให้แง่มุมใหม่เกี่ยวกับการส่งเสริมการฟื้นฟูเนื้อเยื่อและการสมานแผล รวมถึงการชะลอความเสื่อมชราของผิวหนัง ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงมุ่งหวังในการศึกษาผลของน้ำตาลดี-ไรโบสต่อการเพิ่มการเจริญของเซลล์ไฟโบรบลาสต์

วัตถุประสงค์ของการศึกษา

เพื่อศึกษาฤทธิ์ของน้ำตาลดี-ไรโบสที่มีผลต่อการเจริญของเซลล์ไฟโบรบลาสต์

ขอบเขตการวิจัย

เพื่อศึกษาฤทธิ์ของน้ำตาลดี-ไรโบสที่มีผลต่อการเจริญของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ชนิดปฐมภูมิจากผิวหนังมนุษย์วัยผู้ใหญ่ (Human dermal fibroblast, primary, adult; HDFa) ในหลอดทดลอง (*In vitro*) โดยใช้น้ำตาลดี-ไรโบสที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน 5 ระดับ ได้แก่ 1.25, 2.5, 5, 10 และ 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในการทดสอบ ภายใต้สภาวะที่มี CO₂ ความเข้มข้น 5% อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง และตรวจวัดความมีชีวิตของเซลล์ (Cell viability) และการเปลี่ยนแปลงทางสัญญาณวิทยา เพื่อประเมินการเจริญของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ด้วยวิธี MTT Assay

การทบทวนวรรณกรรม

ความสามารถในการเจริญเติบโตของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ลดลง เป็นผลมาจากกระบวนการเสื่อมชราตามอายุ โดยการสูญเสียความสามารถในการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไฟโบรบลาสต์มีความสัมพันธ์กับการลดลงของการสังเคราะห์คอลลาเจนและการเพิ่มขึ้นของเอนไซม์เมทริกซ์โปรตีนเนสซึ่งทำหน้าที่สลายองค์ประกอบของสารระหว่างเซลล์ชั้นเมทริกซ์ (Matrix degrading

metalloproteinase : MMP) นอกจากนี้การลดลงของการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ยังสัมพันธ์กับการลดลงของการสร้างปัจจัยการเจริญเติบโต (Growth factor) และการตอบสนองต่อสารกระตุ้นการเจริญเติบโต ส่งผลให้การซ่อมแซมเนื้อเยื่อและการสร้างองค์ประกอบของผิวหนังลดลง การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวร่วมกับปัจจัยภายนอก เช่น รังสียูวี สามารถกระตุ้นให้เกิดความเสียหายต่อเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ทำให้เกิดริ้วรอยบนผิวหนัง ผิวหนังสูญเสียความยืดหยุ่น และความสามารถในการสมานแผลลดลง (Varani, 2010)

น้ำตาลไรโบสพบได้ในรูปของแอล-อีแนนทีโอเมอร์ และ ดี-อีแนนทีโอเมอร์ โดยดี-ไรโบสเป็นไอโซฟอร์มที่พบในธรรมชาติและมีความเสถียรมากกว่า เป็นน้ำตาลที่ประกอบไปด้วยคาร์บอน 5 อะตอม ละลายน้ำได้ดี และเป็นองค์ประกอบสำคัญของกรดนิวคลีอิกหลายชนิด ได้แก่ อาร์เอ็นเอ นำรหัส (mRNA) อาร์เอ็นเอถ่ายโอน (Transfer RNA) และอาร์เอ็นเอไรโบโซม (Ribosomal RNA) (Li et al., 2021) นอกจากนี้น้ำตาลดี-ไรโบสยังเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์อะดีโนซีน ไตรฟอสเฟต หรือ ATP ซึ่งเป็นแหล่งพลังงานหลักของเซลล์ และจำเป็นต่อกระบวนการเมแทบอลิซึม การแบ่งตัวของเซลล์ รวมถึงการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิก เช่น ดีเอ็นเอ และอาร์เอ็นเอ (Li et al., 2021; Mahoney et al., 2018)

ในร่างกาย น้ำตาลไรโบสสามารถสร้างได้ผ่านวิถีเพนโตสฟอสเฟต (Pentose phosphate pathway, PPP) อย่างไรก็ดีตาม กระบวนการดังกล่าวเกิดขึ้นค่อนข้างช้า เนื่องจากถูกควบคุมโดยเอนไซม์กลูโคส-6-ฟอสเฟต ดีไฮโดรจีเนส (Glucose-6-phosphate dehydrogenase, G-6-PDH) ซึ่งเป็นขั้นตอนกำหนดอัตราของกระบวนการ ส่งผลให้การสร้างน้ำตาลดี-ไรโบสภายในเซลล์มีข้อจำกัดในบางภาวะ (Mahoney et al., 2018) ดังนั้นการได้รับน้ำตาลดี-ไรโบสจากภายนอก จึงอาจช่วยเพิ่มการสร้าง 5-ฟอสโฟไรโบซิล-1-ไพโรฟอสเฟต (5-Phosphoribosyl-1-pyrophosphate, PRPP) PRPP และส่งเสริมการสังเคราะห์ ATP ได้รวดเร็วยิ่งขึ้น

มีการศึกษาพบว่า การเสริมน้ำตาลดี-ไรโบส สามารถช่วยเพิ่มการฟื้นตัวของระดับ ATP และลดความเสียหายของเซลล์ในภาวะที่เนื้อเยื่อขาดพลังงาน ทั้งในสัตว์ทดลองและในมนุษย์ (Mahoney et al., 2018) นอกจากนี้ ผู้ป่วยโรคหลอดเลือดหัวใจตีบและภาวะหัวใจล้มเหลวที่ได้รับน้ำตาลดี-ไรโบส มีการเผาผลาญพลังงานของกล้ามเนื้อหัวใจดีขึ้น ส่งผลให้ความสามารถในการทำกิจกรรมทางกายและคุณภาพชีวิตดีขึ้น (Pliml et al., 1992) และไม่มีหลักฐานว่าการได้รับน้ำตาลดี-ไรโบสจะเป็นอันตรายต่อเซลล์มนุษย์ (Pliml et al., 1993)

ในด้านสุขภาพผิว มีการศึกษาพบว่าน้ำตาลดี-ไรโบส สามารถเพิ่มอัตราการหายใจในไมโทคอนเดรียและไซโตซอล ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้สำคัญของการทำงานของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ รวมทั้งเพิ่มระดับ ATP ภายใต้สภาวะขาดออกซิเจน และเมื่อนำไปใช้เป็นส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์บำรุงผิว พบว่า

สามารถช่วยลดริ้วรอย เพิ่มความกระจ่างใส และทำให้ผิวดูมีสุขภาพดีขึ้น (Shecterle & Shecterle, 2018)

ATP เป็นโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการต่าง ๆ ของเซลล์ ตั้งแต่เป็นแหล่งพลังงานไปจนถึงการส่งสัญญาณระหว่างเซลล์ และเกี่ยวข้องกับกระบวนการต่าง ๆ ของเซลล์ (Coppi et al., 2007) โดยพบว่า ระดับ ATP ในเซลล์ผิวหนังจะลดลงตามอายุ ซึ่งสัมพันธ์กับการเสื่อมของเซลล์ไฟโบรบลาสต์และการเกิดริ้วรอยของผิวหนัง (Shecterle & Shecterle, 2018) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาพบว่า ATP สามารถกระตุ้นการเจริญและการทำงานของเซลล์หลายชนิด รวมถึงเซลล์แอสโทรไซต์ โดยมีฤทธิ์เช่นเดียวกับเบสิคไฟโบรบลาสต์โกรทแฟคเตอร์ (Basic fibroblast growth factor) (Abbracchio et al., 1995 & Ciccarelli et al., 1994)

จากการทบทวนวรรณกรรมพบว่า น้ำตาลดี-ไรโบเป็นสารตั้งต้นที่สำคัญในการสังเคราะห์ ATP และมีบทบาทในการส่งเสริมการทำงานของเซลล์ผ่านการเพิ่มการเผาผลาญพลังงาน อย่างไรก็ตาม งานวิจัยที่ผ่านมาส่วนใหญ่ศึกษาผลด้านการสร้างพลังงานหรือผลทางคลินิก ขณะที่ข้อมูลเกี่ยวกับผลของน้ำตาลดี-ไรโบต่อความมีชีวิตของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกันยังมีจำกัด จึงยังไม่สามารถสรุปได้อย่างชัดเจนถึงผลของ น้ำตาลดี-ไรโบต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ ซึ่งยังเป็นประเด็นที่ควรได้รับการศึกษาเพิ่มเติม

ระเบียบวิธีวิจัย

การศึกษาครั้งนี้ เป็นการศึกษาเชิงทดลองในห้องปฏิบัติการ (*In vitro* experiment study) ประกอบด้วยกลุ่มควบคุมทั้งทางลบและทางบวก และกลุ่มทดลอง โดยทำการศึกษายาทบาทของ น้ำตาลดี-ไรโบต่อการเจริญของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ ซึ่งเป็นเซลล์ไฟโบรบลาสต์เพาะเลี้ยงจากผิวหนังมนุษย์

การดำเนินการวิจัย

1. การเพาะเลี้ยงเซลล์ (Cell Culture)

เซลล์ไฟโบรบลาสต์ปฐมภูมิจากผิวหนังมนุษย์วัยผู้ใหญ่ (Human dermal fibroblast, primary, adult; HDFa) (ATCC PCS201-012TM ; American Type Culture Collection, ประเทศสหรัฐอเมริกา) ได้รับการเพาะเลี้ยงใน Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) และอาหารเลี้ยงเซลล์ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส 4.5 กรัม/ลิตร และเสริมด้วยแอล-กลูตามีนความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ โดยใช้ไโดเปปไทด์ของแอล-อะลานีนและแอล-กลูตามีนความเข้มข้น 1X (1X GlutaMAX™-I Supplement) แทนเพื่อคงความเสถียร และซีรัมตัวอ่อนลูกวัว ความเข้มข้น 10%

(v/v) ซึ่งเซลล์จะถูกเก็บรักษาไว้ในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์รูปตัวที่ ที่อุณหภูมิ 37°C ภายในบรรยากาศที่มีความชื้นและมีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ความเข้มข้น 5%

2. การเตรียมตัวอย่าง

ทำการละลายน้ำตาลดี-ไรโบสความบริสุทธิ์ 98% (Bioenergy, เมืองมินนีแอโพลิส, รัฐมินนิโซตา, ประเทศสหรัฐอเมริกา) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM+0.1% FBS+1X GlutaMAX™ โดยเตรียมให้ความเข้มข้นของน้ำตาลดี-ไรโบสที่ความเข้มข้น 1.25, 2.5, 5, 10 และ 20 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตรของอาหารเลี้ยงเซลล์ ภายในตู้ชีวนิรภัยระดับ 2 (Biological safety cabinet Class II)

3. การทดสอบการเจริญของเซลล์ (Cell Viability Assay)

เซลล์ไฟโบรบลาสต์จากผิวหนังมนุษย์ ได้รับการเพาะที่ความหนาแน่น 3,000 เซลล์ต่อหลุมในงานเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ DMEM+5% FBS+1X GlutaMAX™ แล้วทำการบ่มในตู้บ่มที่มี CO₂ ความเข้มข้น 5% อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากบ่มครบเวลาแล้ว กลุ่มทดลองจะให้เซลล์สัมผัสกับตัวอย่างน้ำตาลดี-ไรโบสที่ความเข้มข้น 1.25, 2.5, 5, 10 และ 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร กลุ่มควบคุมทางลบจะให้เซลล์สัมผัสกับอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM+0.1% FBS+1X GlutaMAX™ และกลุ่มควบคุมทางบวกจะให้เซลล์สัมผัสกับอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM+10% FBS+1X GlutaMAX™ หลังจากนั้นเซลล์จะถูกบ่มในตู้บ่มที่มี CO₂ ความเข้มข้น 5% อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ในระหว่างการบ่มเซลล์ ทำการถ่ายรูปเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับที่เวลา 0, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาทำการประเมินการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์โดยใช้ MTT assay โดยทำการดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกแล้วทำการล้างด้วย PBS ปริมาณ 100 ไมโครลิตรต่อหลุม หลังจากนั้นทำการเติมสารละลาย MTT ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของ DMEM ในปริมาณ 100 ไมโครลิตรต่อหลุม และบ่มกับเซลล์เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาทำการดูดสารละลายออกแล้วทำการละลายผลึกสีภายในเซลล์ด้วยไอโซโพรพานอล 100 ไมโครลิตรต่อหลุม และทำการเขย่าจนเบา ๆ ที่อุณหภูมิห้องที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ก่อนนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยสเปกโตรโฟโตเมตริกที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร และทำการคำนวณหาค่าร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์ (% Cell viability) เพื่อแสดงถึงการเจริญของเซลล์ การทดสอบในแต่ละกลุ่มจะดำเนินการโดยวัดซ้ำ 3 หลุม (Technical replicates) เพื่อให้มั่นใจถึงความสม่ำเสมอและความน่าเชื่อถือของผลลัพธ์

4. การวิเคราะห์ทางสถิติ (Statistical Analysis)

ก่อนการวิเคราะห์ข้อมูล ทำการตรวจสอบข้อตกลงเบื้องต้นของการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-way Analysis of Variance; One-way ANOVA) ได้แก่ การตรวจสอบการแจกแจงแบบปกติของข้อมูล (Normality) ด้วยวิธี Shapiro–Wilk test และการตรวจสอบความแปรปรวน

เท่ากันของข้อมูล (Homogeneity of variance) ด้วยวิธี Levene's test ซึ่งพบว่า ข้อมูลมีการแจกแจงแบบปกติ และมีความแปรปรวนเท่ากัน จึงเหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ด้วย One-way ANOVA

วิธีการทางสถิติที่ใช้สำหรับการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ คือ One-way ANOVA โดยใช้ค่าความเชื่อมั่นที่ 95% (CI_{95}), p -value < 0.05 ร่วมกับการทดสอบด้วย Dunnett's test ด้วยโปรแกรม IBM SPSS Statistics version 20 โดยเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุมทางลบ กลุ่มควบคุมทางบวก และกลุ่มทดลองที่ได้รับน้ำตาลดี-ไรโบสในความเข้มข้นต่าง ๆ ซึ่งผลการทดลองในแต่ละกลุ่มจะดำเนินการวัดซ้ำ จำนวน 3 หลุม (Technical replicates ; $n=3$) และแสดงผลเป็นค่าร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ในรูปค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Mean $\pm$ SD)

ผลของการวิจัย

1. ผลการทดสอบการเจริญของเซลล์ผิวหนังชนิดไฟโบรบลาสต์

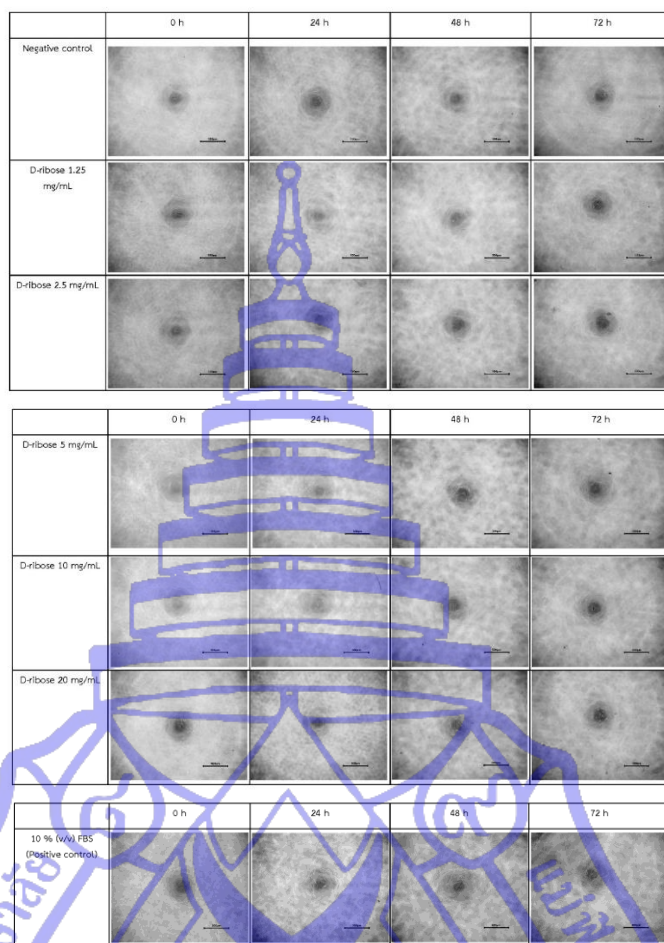
จากการสังเกตรูปร่างลักษณะเซลล์ผิวหนังไฟโบรบลาสต์ที่เวลา 0, 24, 48 และ 72 ชั่วโมงพบว่า

1.1 เซลล์ในกลุ่มควบคุมทางลบ กลุ่มควบคุมทางบวก และกลุ่มที่ได้รับน้ำตาลดี-ไรโบสในความเข้มข้น 1.25, 2.50 และ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบเซลล์ยังคงมีลักษณะเรียวยาว (spindle-shaped morphology) ยึดเกาะพื้นผิวได้ดี และมีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเซลล์ใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุมทางลบ โดยไม่พบการเปลี่ยนแปลงอย่างชัดเจนตลอดการทดลอง

1.2 เซลล์ในกลุ่มที่ได้รับน้ำตาลดี-ไรโบสในความเข้มข้น 10 และ 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบเซลล์บางส่วนหดตัว สูญเสียรูปทรงเรียวยาว และกลายเป็นทรงกลมขนาดเล็กเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยเฉพาะกลุ่มที่ได้รับน้ำตาลดี-ไรโบสความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ระยะเวลา 72 ชั่วโมง ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดสอบความมีชีวิตของเซลล์ด้วยวิธี MTT assay ที่พบว่าความมีชีวิตของเซลล์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ขณะที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แม้จะพบการเปลี่ยนแปลงของรูปร่างเซลล์และแนวโน้มการลดลงของความมีชีวิตของเซลล์ แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

ตารางที่ 1 ผลการทดสอบความมีชีวิตของเซลล์ผิวหนังชนิดไฟโบรบลาสต์(% Cell viability) เมื่อทดสอบกับน้ำตาลดี-ไรโบส ที่ความเข้มข้น 1.25,2.50,5,10 และ 20 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (กลุ่มทดลอง), ซีรัมตัวอ่อนลูกวัว(FBS)ความเข้มข้น 10% (v/v) (กลุ่มควบคุมทางบวก) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ และอาหารเลี้ยงเซลล์ (กลุ่มควบคุมทางลบ)เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง และวัดผลด้วยวิธี MTT assay

กลุ่มทดสอบ	เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (% Cell viability)			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
กลุ่มควบคุมทางลบ	81.87	101.30	116.82	100.00 $\pm$ 17.51
น้ำตาลดี-ไรโบส	108.72	91.07	95.23	98.34 $\pm$ 9.23
1.25 มก./มล.	113.02	102.00	95.45	103.49 $\pm$ 8.88
น้ำตาลดี-ไรโบส	115.49	99.35	102.07	105.64 $\pm$ 8.64
2.50 มก./มล.	99.09	80.63	85.09	88.27 $\pm$ 9.63
น้ำตาลดี-ไรโบส	41.27	41.93	42.15	41.78 $\pm$ 0.46
20 มก./มล.	164.98	156.08	142.19	154.42 $\pm$ 11.48
10% (v/v) FBS (กลุ่มควบคุมทางบวก)				



ภาพที่ 1 ลักษณะรูปร่างของเซลล์ผิวหนังชนิดไฟโบรบลาสต์ เมื่อทดสอบกับน้ำตาลดี-ไรโบส ที่ความเข้มข้น 1.25, 2.50, 5, 10 และ 20 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (กลุ่มทดลอง), ซีรัมตัวอ่อนลูกวัว (FBS) ความเข้มข้น 10% (v/v) (กลุ่มควบคุมทางบวก) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ และอาหารเลี้ยงเซลล์ (กลุ่มควบคุมทางลบ) เป็นระยะเวลา 0, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง (สเกลบาร์ 500 ไมครอน)

2. ผลการวิเคราะห์ทางสถิติ

เมื่อนำข้อมูลผลการทดสอบมาวิเคราะห์ทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS โดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (One-way ANOVA) พบว่าเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเซลล์มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มทดลอง ($p < 0.05$) และเพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างแต่ละกลุ่มทดลองกับกลุ่มควบคุมทางลบ จึงทำการวิเคราะห์แบบ Dunnett's test ผลการวิเคราะห์ พบว่า กลุ่มที่ได้รับน้ำตาลดี-ไรโบสที่ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และกลุ่มควบคุมทางบวก (10% (v/v) FBS) มีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุมทางลบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) ในขณะที่กลุ่มที่ได้รับน้ำตาลดี-ไรโบสที่ความเข้มข้น 1.25–10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ไม่พบ

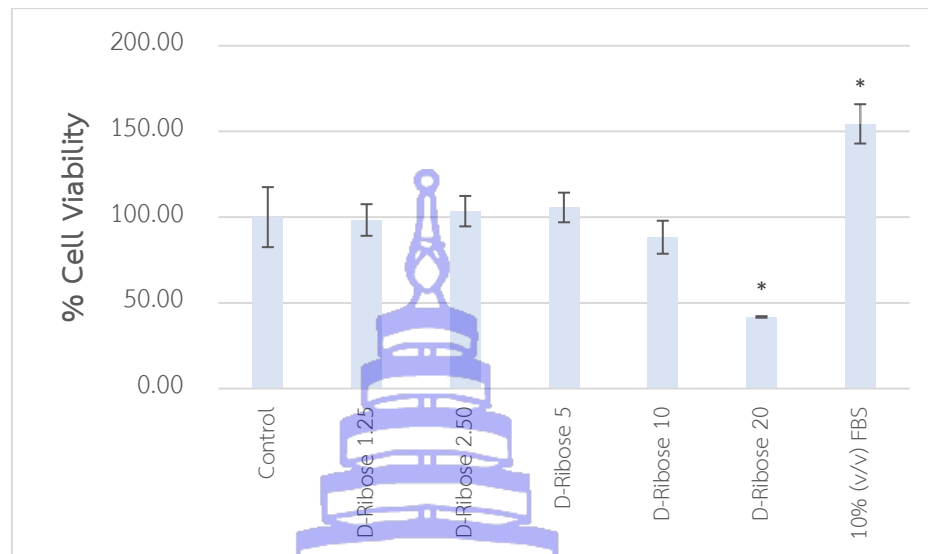
ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมทางลบ ($p > 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 2 และภาพที่ 2

ตารางที่ 2 ค่าความมีชีวิตของเซลล์ผิวหนังชนิดไฟโบรบลาสต์ (% Cell viability) ภายหลังการทดสอบด้วยน้ำตาลดี-ไรโบสที่ความเข้มข้นต่าง ๆ รวมทั้งกลุ่มควบคุมทางลบ และกลุ่มควบคุมทางบวก แสดงผลในรูปของค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และค่า p-value ซึ่งได้จากการเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมทางลบด้วยวิธี Dunnett's test

กลุ่มทดสอบ	เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (Mean $\pm$ SD)	p-value
กลุ่มควบคุมทางลบ	100.00 $\pm$ 17.51	-
น้ำตาลดี-ไรโบส 1.25 มก./มล.	98.34 $\pm$ 9.23	1.000
น้ำตาลดี-ไรโบส 2.50 มก./มล.	103.49 $\pm$ 8.88	0.996
น้ำตาลดี-ไรโบส 5 มก./มล.	105.64 $\pm$ 8.64	0.963
น้ำตาลดี-ไรโบส 10 มก./มล.	88.27 $\pm$ 9.63	0.580
น้ำตาลดี-ไรโบส 20 มก./มล.	41.78 $\pm$ 0.46*	<0.001
10% (v/v) FBS (กลุ่มควบคุมทางบวก)	154.42 $\pm$ 11.48*	<0.001

หมายเหตุ วิเคราะห์ข้อมูลด้วย One-Way ANOVA ตามด้วย Dunnett's post hoc test (N = 3)

* แสดงถึงความแตกต่างจากกลุ่มควบคุมทางลบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$



หมายเหตุ วิเคราะห์ข้อมูลด้วย One-Way ANOVA ตามด้วย Dunnett's post hoc test (N = 3)

* แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมทางลบที่ $p < 0.05$

ภาพที่ 2 ค่าความมีชีวิตของเซลล์ผิวหนังชนิดไฟโบรบลาสต์ (% Cell viability) ภายหลังการทดสอบด้วยน้ำตาลดี-ไรโบสในความเข้มข้นต่าง ๆ รวมทั้งกลุ่มควบคุมทางลบ และกลุ่มควบคุมทางบวก แสดงผลในรูปของค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

สรุปผล

ผลการทดสอบการเจริญของเซลล์ ด้วยวิธี MTT assay ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์เพาะเลี้ยงจากผิวหนังมนุษย์ พบว่า การให้น้ำตาลดี-ไรโบสในความเข้มข้นต่าง ๆ ส่งผลต่อการเจริญของเซลล์แตกต่างกัน โดยกลุ่มควบคุมทางลบมีค่าเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเซลล์เฉลี่ยเท่ากับ 100.00 ± 17.51 ในขณะที่กลุ่มที่ได้รับน้ำตาลดี-ไรโบสความเข้มข้น 20 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ทำให้ความมีชีวิตของเซลล์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมทางลบ โดยมีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเซลล์อยู่ที่ 41.78 ± 0.46 ($p < 0.001$) และกลุ่มที่ได้รับน้ำตาลดี-ไรโบสในความเข้มข้น 1.25, 2.5, 5 และ 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ไม่พบความแตกต่างของความมีชีวิตของเซลล์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมทางลบ โดยมีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเซลล์อยู่ที่ 98.34 ± 9.23 , 103.49 ± 8.88 , 105.64 ± 8.64 และ 88.27 ± 9.63 ตามลำดับ ส่วนกลุ่มควบคุมทางบวก พบว่าความมีชีวิตของเซลล์เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมทางลบ โดยมีเปอร์เซ็นต์การเจริญของเซลล์อยู่ที่ 154.42 ± 11.48 ($p < 0.001$)

อภิปรายผล

จากการศึกษา พบว่า น้ำตาลดี-ไรโบสที่ความเข้มข้นสูง (20 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) มีผลต่อการเจริญของเซลล์ผิวหนังชนิดไฟโบรบลาสต์อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับคุณสมบัติของน้ำตาลดี-ไรโบสที่สามารถเกิดปฏิกิริยาไกลเคชันได้รวดเร็วกว่าน้ำตาลกลูโคส ส่งผลให้เกิดการสะสมของสาร Advanced Glycation End-products (AGEs) ภายในเซลล์ และกระตุ้นให้เกิดการจับกลุ่มของโปรตีน ซึ่งนำไปสู่การทำงานผิดปกติของเซลล์และเซลล์ตาย (Han et al., 2011; Wei et al., 2012) การสะสมของ AGEs สามารถกระตุ้นการเกิดภาวะความเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) และเพิ่มการสร้างอนุมูลอิสระ (reactive oxygen species; ROS) ซึ่งส่งผลต่อการทำงานของไมโทคอนเดรียและกระตุ้นการตายของเซลล์แบบ apoptosis ได้ นอกจากนี้ AGEs ยังสามารถจับกับตัวรับสำหรับ AGEs (Receptor for Advanced Glycation End-products; RAGE) บนผิวเซลล์ และกระตุ้นการส่งสัญญาณผ่าน Nuclear factor kappa B (NF- κ B) ซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบและการลดลงของการอยู่รอดของเซลล์ (Chen et al., 2022; Gkogkolou & Böhm, 2012)

แม้ว่าน้ำตาลดี-ไรโบสจะเป็นองค์ประกอบสำคัญในกระบวนการสังเคราะห์อะดีโนซีน ไตรฟอสเฟต (Adenosine triphosphate, ATP), นิโคตินาไมด์ อะดีนีน ไดนิวคลีโอไทด์ ฟอสเฟต (Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH) และกรดนิโคลิอิก แต่ผลการทดลองในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า การได้รับน้ำตาลดี-ไรโบสในระดับความเข้มข้นสูงอาจส่งผลให้เกิดความไม่สมดุลของกระบวนการเผาผลาญภายในเซลล์ และอาจก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity) ได้

และแม้ว่าน้ำตาลดี-ไรโบสที่ความเข้มข้นต่ำ (≤ 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) จะไม่แสดงผลต่อการเจริญของเซลล์อย่างมีนัยสำคัญในครั้งนี้ แต่มีแนวโน้มที่การเจริญของเซลล์ลดลงตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น แสดงถึงขีดจำกัดที่ควรระวังในการใช้น้ำตาลดี-ไรโบสในการประยุกต์ทางเวชศาสตร์ชะลอวัย โดยเฉพาะในผลิตภัณฑ์เพื่อการดูแลผิวหรือการกระตุ้นพลังงานในเซลล์ผิวหนัง

สำหรับกลุ่มที่ได้รับซีรัมตัวอ่อนลูกวัว (FBS) ความเข้มข้น 10% (v/v) ซึ่งใช้เป็นกลุ่มควบคุมทางบวก พบว่า เซลล์มีการเพิ่มจำนวนและมีความมีชีวิตของเซลล์สูงที่สุด เนื่องจาก ซีรัมตัวอ่อนลูกวัวมีสารหลายชนิดที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนของเซลล์ เช่น องค์ประกอบของปัจจัยการเจริญเติบโต (Growth factor) ซึ่งช่วยกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์ รวมถึง ปัจจัยการเกาะติดของเซลล์ (Adhesion factor) และสารที่มีฤทธิ์ต้านทริปซิน (Antitrypsin activity) ซึ่งช่วยส่งเสริมการยึดเกาะของเซลล์ นอกจากนี้ ซีรัวยังเป็นแหล่งของวิตามิน แร่ธาตุ สารอาหาร และฮอร์โมนต่าง ๆ อีกด้วย (Freshney, 2010)

อย่างไรก็ตาม มีรายงานบางฉบับ พบว่า น้ำตาลดี-ไรโบส อาจช่วยส่งเสริมการฟื้นตัวของระดับอะดีโนซีน ไตรฟอสเฟต (Adenosine triphosphate, ATP) ในเนื้อเยื่อที่อยู่ในภาวะพลังงานต่ำ โดยเฉพาะกล้ามเนื้อหัวใจหลังภาวะขาดเลือด (Ischemia) ซึ่งรายงานว่าน้ำตาลดี-ไรโบส สามารถช่วย

เร่งการฟื้นตัวของระดับ ATP และปรับปรุงการทำงานของหัวใจภายหลังภาวะขาดเลือดได้ (Bayram et al., 2018; Pliml et al., 1992; Shecterle et al., 2018) สะท้อนให้เห็นว่า ผลของน้ำตาลดี-ไรโบส อาจขึ้นอยู่กับชนิดของเซลล์ สภาวะพลังงานพื้นฐานของเซลล์ และความเข้มข้นที่ใช้

โดยสรุป การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า น้ำตาลดี-ไรโบส อาจมีผลเสียต่อเซลล์ผิวหนังเมื่อใช้ในปริมาณสูง และควรมีการศึกษาทดลองในระดับโมเลกุลเพิ่มเติม เพื่อประเมินความปลอดภัยในการนำไปประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์ทางเวชศาสตร์ชะลอวัยหรือเครื่องสำอางในอนาคต

อย่างไรก็ตามการศึกษานี้เป็นการศึกษาในระดับเซลล์ (*In vitro*) และประเมินความมีชีวิตของเซลล์ด้วยวิธี MTT assay เพียงวิธีเดียว จึงสะท้อนผลต่อกิจกรรมเมแทบอลิซึมของเซลล์เป็นหลัก และยังไม่สามารถอธิบายกลไกการออกฤทธิ์ของน้ำตาลดี-ไรโบสต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ได้อย่างชัดเจน นอกจากนี้ การทดลองใช้การวัดซ้ำแบบ technical replicates จึงควรมีการศึกษาซ้ำแบบ biological replicates และใช้วิธีการประเมินเพิ่มเติมเพื่อยืนยันผลการศึกษา

ข้อเสนอแนะสำหรับการศึกษาในอนาคต

1. ข้อเสนอแนะสำหรับการศึกษาวิจัยในอนาคต ควรพิจารณาศึกษาน้ำตาลดี-ไรโบสในช่วงความเข้มข้นต่ำกว่า 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อประเมินผลต่อการเพิ่มจำนวนและการทำงานของเซลล์ นอกจากนี้ ควรศึกษาตัวชี้วัดอื่นเพิ่มเติมนอกเหนือจากความมีชีวิตของเซลล์ เช่น การสังเคราะห์คอลลาเจน การสังเคราะห์ ATP ตัวชี้วัดด้านความเสื่อมชราของเซลล์ (Cellular senescence markers), ตัวชี้วัดการอักเสบ (Inflammatory markers), การวัดระดับอนุมูลอิสระ ROS และการทำงานของเซลล์ในระยะยาว เพื่อให้เข้าใจผลของน้ำตาลดี-ไรโบสต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ได้อย่างครอบคลุมมากยิ่งขึ้น

2. ข้อเสนอแนะสำหรับการพัฒนาผลิตภัณฑ์ ควรมีการศึกษาประสิทธิภาพและความปลอดภัยของน้ำตาลดี-ไรโบสเพิ่มเติมเพื่อการประยุกต์ใช้ในรูปแบบผลิตภัณฑ์อาหารเสริม เนื่องจากน้ำตาลดี-ไรโบสมีบทบาทสำคัญในการสังเคราะห์ ATP และการสร้างพลังงานของเซลล์ อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาทั้งในระดับเซลล์ สัตว์ทดลอง และการศึกษาทางคลินิกในมนุษย์ เพื่อกำหนดขนาดรับประทานที่เหมาะสม รวมถึงยืนยันประสิทธิภาพและความปลอดภัยในการส่งเสริมสุขภาพผิวในระยะยาว

รายการอ้างอิง

- Abbracchio, M. P., Ceruti, S., Langfelder, R., Cattabeni, F., Saffrey, M. J., & Burnstock, G. (1995). Effects of ATP analogues and basic fibroblast growth factor on astroglial cell differentiation in primary cultures of rat striatum. *International journal of developmental neuroscience*, 13(7), 685-693.
- Bayram, M., Perkowski, D., Cyr, J. S., & Abraham, W. T. (2018). Clinical significance and applications of d-ribose in cardiovascular disease. *Int. Arch. Cardiovasc. Dis*, 2, 1-9.
- Bonifant, H., & Holloway, S. (2019). A review of the effects of ageing on skin integrity and wound healing. *British journal of community nursing*, 24(Sup3), S28-S33.
- Chen, C. Y., Zhang, J. Q., Li, L., Guo, M. M., He, Y. F., Dong, Y. M., . . . Yi, F. (2022). Advanced glycation end products in the skin: molecular mechanisms, methods of measurement, and inhibitory pathways. *Frontiers in Medicine*, 9, 837222. <https://doi.org/10.3389/fmed.2022.837222>
- Ciccarelli, R., di Iorio, P., Ballerini, P., Ambrosini, G., Giuliani, P., Tiboni, G. M., & Caciagli, F. (1994). Effects of exogenous ATP and related analogues on the proliferation rate of dissociated primary cultures of rat astrocytes. *Journal of neuroscience research*, 39(5), 556-566.
- Coppi, E., Pugliese, A. M., Urbani, S., Melani, A., Cerbai, E., Mazzanti, B., . . . Pedata, F. (2007). ATP modulates cell proliferation and elicits two different electrophysiological responses in human mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, 25(7), 1840-1849. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2006-0669>
- Freshney R. I. (2010). *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications* (6th ed.). John Wiley & Sons, Inc.
- Gkogkolou, P., & Böhm, M. (2012). Advanced glycation end products: Key players in skin aging?. *Dermato-endocrinology*, 4(3), 259-270. <https://doi.org/10.4161/derm.22028>
- Han, C., Lu, Y., Wei, Y., Liu, Y., & He, R. (2011). D-ribose induces cellular protein glycation and impairs mouse spatial cognition. *PLoS One*, 6(9), e24623. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024623>

- Hwang, S. J., Ha, G. H., Seo, W. Y., Kim, C. K., Kim, K. J., & Lee, S. B. (2020). Human collagen alpha-2 type I stimulates collagen synthesis, wound healing, and elastin production in normal human dermal fibroblasts (HDFs). *BMB Reports*, 53(10), 539–544. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2020.53.10.120>
- Jenkins, G. (2002). Molecular mechanisms of skin ageing. *Mechanisms of ageing and development*, 123(7), 801-810.
- Li, S., Wang, J., Xiao, Y., Zhang, L., Fang, J., Yang, N., . . . Qin, H. (2021). D-ribose: Potential clinical applications in congestive heart failure and diabetes, and its complications. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 21(5), 1-9. <https://doi.org/10.3892/etm.2021.9927>
- Losquadro, W. D. (2017). Anatomy of the Skin and the Pathogenesis of Nonmelanoma Skin Cancer. *Facial Plastic Surgery Clinics of North America*, 25(3), 283. <https://doi.org/10.1016/j.fsc.2017.03.001>
- Mahoney, D. E., Hiebert, J. B., Thimmesch, A., Pierce, J. T., Vacek, J. L., Clancy, R. L., . . . Pierce, J. D. (2018). Understanding D-ribose and mitochondrial function. *Advances in bioscience and clinical medicine*, 6(1), 1. <https://doi.org/10.7575/aiaa.abcm.v.6n.1p.1>
- Pliml, W., Arnim, T. Von, Stablein, A., Hofmann, H., Zimmer, H.-G., & Erdmann, E. (1992). Effects of ribose on exercise-induced ischaemia in stable coronary artery disease. *The Lancet*, 340, 507–510.
- Pliml, W., von Arnim, T., & Hammer, C. (1993). Effects of therapeutic ribose levels on human lymphocyte proliferation in vitro. *The clinical investigator*, 71(10), 770-773.
- Shecterle, L. M., & St. Cyr, J. A. (2009). Dermal benefits of topical D-ribose. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*, 2, 151-152. <https://doi.org/10.2147/ccid.s7487>
- Shecterle, L. M., Terry, K. R., & Cyr, J. A. S. (2018). Potential clinical benefits of D-ribose in ischemic cardiovascular disease. *Cureus*, 10(3). <https://doi.org/10.7759/cureus.2291>

Varani, J. (2010). Fibroblast aging: intrinsic and extrinsic factors. *Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies*, 7(3-4), 65-70.

<https://doi.org/10.1016/j.ddstr.2011.06.001>

Wei, Y., Han, C. S., Zhou, J., Liu, Y., Chen, L., & He, R. Q. (2012). D-ribose in glycation and protein aggregation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1820(4), 488-494. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.01.005>

Wong, Q. Y. A., & Chew, F. T. (2021). Defining skin aging and its risk factors: a systematic review and meta-analysis. *Scientific reports*, 11(1), 22075.

<https://doi.org/10.1038/s41598-021-01573-z>

Zouboulis, C. C., & Makrantonaki, E. (2011). Clinical aspects and molecular diagnostics of skin aging. *Clinics in dermatology*, 29(1), 3-14.

<https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2010.07.001>

