HE005

วิตามินซียับยั้งการหายของแผลจากเซลล์ไฟโบรบลาสจากเหงือกในห้องปฏิบัติการ □

In Vitro Effect of L-Ascorbic acid on Gingival Fibroblast to Regulate Wound Healing

ทพญ.ทัชฌา ชัยตระกูลทอง[1]
อ.ทญ.ดร.ภัคสินี กมลรัตนกุล[2]
รศ.ทญ.ดร.รัชนี อัมพรอร่ามเวทย์[3]

บทคัดย่อ

เซลล์ไฟโบรบลาสจากเหงือกมีบทบาทสำคัญต่อการหายของแผลในช่องปาก นอกจากเซลล์ไฟโบรบลาสจะปิดแผลด้วยคุณสมบัติของเซลล์ เช่น การเคลื่อนที่ (migration) และ การแบ่งตัวเพิ่มจำนวน (proliferation) แล้ว เซลล์ไฟโบรบลาสยังเป็นแหล่งสำคัญในการผลิตเมทริกซ์นอกเซลล์ (Extracellular matrix) โดยเฉพาะอย่างยิ่งคอลลาเจน วิตามินซี (L-ascorbic acid) เป็นสารที่มีหน้าที่หลายอย่างในร่างกายร่างกาย รวมไปถึงมีความสำคัญในกระบวนการ ไฮดรอกซิเลชั่น (hydroxylation) ซึ่งจำเป็นต่อการสร้างคอลลาเจน เป็นที่น่าสนใจว่าวิตามินซีอาจจะสามารถ ส่งเสริมการหายของแผลในช่องปากผ่านการกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไฟโบรบลาสได้ วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้ เพื่อศึกษาทดสอบคุณสมบัติของวิตามินซีที่มีต่อพฤติกรรม ของเซลล์ไฟโบรบลาสจากเหงือก เพื่อประเมินการหายของแผลในช่องปากในห้องปฏิบัติการ เซลล์ไฟโบรบลาสจะถูกแยกจากฟันของอาสาสมัคร ที่เข้ารับการผ่าฟันคุดที่คณะทันต-แพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เซลล์ไฟโบรบลาสดังกล่าวจะถูกนำมาล้างผ่านด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีวิตามินซีความเข้มข้นต่างๆ 3 ครั้งต่อวัน ผลของการล้างผ่านด้วยวิตามินซีที่มีต่อการหายของแผลในห้องปฏิบัติการจะถูกประเมินด้วย Scratch-test assay การเพิ่มจำนวน ของเซลล์จะถูกวิเคราะห์ด้วย MTT assay

ผลการวิจัยพบว่าการล้างผ่านด้วยวิตามินซีความเข้มข้น 10 และ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่มีผลอย่างมีนัยสำคัญต่อการปิดของแผลในห้องปฏิบัติการ อย่างไรก็ตามวิตามินซีที่ความเข้มข้น 50, 70 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่งผลให้แผลปิดช้าลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบ กับกลุ่มควบคุม (ระดับนัยสำคัญที่ 0.05) สอดคล้องกับการทดสอบการเพิ่มจำนวนของ เซลล์โดย MTT assay แสดงให้เห็นว่า ความเข้มข้นของวิตามินซีตั้งแต่ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรขึ้นไปยับยั้งการเพิ่ม จำนวนของเซลล์ไฟโบรบลาสลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

[1,2]ภาควิชาศัลยศาสตร์ช่องปากและแมกซิโลแฟเชียลคณะทันตแพทยศาตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

[3]ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะทันตแพทยศาตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สรุปได้ว่าวิตามินซีความเข้มข้นสูงกว่า 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำให้แผลในห้องปฏิบัติการ ปิดช้าลงอย่างมีนัยสำคัญโดยยับยั้งเพิ่มจำนวนของเซลล์ไฟโบรบลาสจากเหงือก ในขณะที่วิตามินซี ความเข้มข้นต่ำนั้นมีความปลอดภัย และสามารถจ่ายให้ผู้ป่วยหลังได้รับการผ่าตัดในช่องปากได้ แต่ควรเลือกการบริหารยาที่เหมาะสม โดยระวังการสัมผัสกันของวิตามินซีและแผลในช่องปากโดยตรง

คำสำคัญ : วิตามินซี, เซลล์ไฟโบรบลาสจากเหงือก, การหายของแผลในช่องปาก

Abstract

Beside closing the wound by intrinsic properties like migration and proliferation, gingival fibroblasts produce a major source of extracellular matrix especially collagen and therefore play a major role in oral wound healing. Vitamin C or L-ascorbic acid has diverse functions in the body, including an essential role in hydroxylation reactions which is necessary for collagen formation. Whether L-ascorbic acid can promote gingival wound healing through inducing proliferation of fibroblasts is of our interest. The aim of this study is to evaluate the effect of L-ascorbic acid on gingival fibroblasts behaviors to promote wound healing *in vitro*. Primary human gingival fibroblasts isolated from teeth extracted from healthy volunteers were rinsed 3 times a day with medium containing L-ascorbic acid of various concentrations. Effect of L-ascorbic acid rinsing on *in vitro* wound healing was assessed by mean of Scratch-test assay. Cell proliferation was analyzed by MTT assay.

Rinsing with vitamin C at concentration of 10 and 20 μg/ml demonstrated no significant effect on *in vitro* wound closure. However, vitamin C at the concentration of 50, 70 and 100 μg/ml significantly delayed wound closure comparing with the control group (p value=0.05). This data was in accordance with cell proliferation assessed by MTT assay demonstrating that Vitamin C at concentration above 50 μg/ml significantly reduce fibroblasts viability.

This study suggests that vitamin C at concertation above 50 μg/ml significantly delay *in vitro* gingival wound closure by inhibiting proliferation of gingival fibroblast. Low dose of Vitamin C is safe and can be prescribed to patients after oral surgery but suitable drug administration to avoid direct contact with oral wound should be concern.

Keywords : ascorbic acid, vitamin C, gingival fibroblast, wound healing

1. บทนำ

เซลล์ไฟโบรบลาสเป็นเซลล์ที่พบมากในชั้นเนื้อเยื่อยึดต่อ (connective tissue) ของร่างกาย เซลล์ไฟโบรบลาสจากเหงือกมีบทบาทสำคัญต่อการหายของแผลในช่องปาก นอกจากเซลล์ไฟโบรบลาสจะปิดแผลด้วยคุณสมบัติของเซลล์เอง เช่น การเคลื่อนที่ (migration) และ การแบ่งตัว เพิ่มจำนวน (proliferation) แล้ว เซลล์ไฟโบรบลาสยังเป็นแหล่งสำคัญ ในการผลิตเมทริกซ์นอกเซลล์ (Extracellular matrix) โดยเฉพาะอย่างยิ่งคอลลาเจน (Taiseer al-Khateeb, Phil Stephens et al. 1997, HÄKkinen, Uitto et al. 2000) เพื่อสร้างให้เกิดเนื้อเยื่อแกรนูเลชัน (granulation tissue) ทดแทนเนื้อเยื่อที่สูญเสียไปจากการบาดเจ็บ และทำให้เกิดการหดรั้งของแผล (wound contraction) แผลจะปิด จากนั้นเซลล์ไฟโบรบลาสจะลดจำนวนลงในที่สุด

วิตามินซี (L-ascorbic acid) เป็นวิตามินที่มนุษย์ไม่สามารถสังเคราะห์ขึ้นได้เองในร่างกาย ต้องได้รับจากภายนอก วิตามินซีเป็นสารที่มีหน้าที่หลายอย่างในร่างกาย รวมไปถึงมีความสำคัญ ในกระบวนการไฮดรอกซิเลชั่น (hydroxylation) ซึ่งจำเป็นต่อการสร้างคอลลาเจน ทีสมบูรณ์ และจำเป็นต่อกระบวนการหายของแผล นอกจากนี้ยังเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และเสริมการทำงาน ของเซลล์อักเสบอีกด้วย (A. Bendich 1986, Ryu-Ichiro Hata 1989) การได้รับวิตามินซีไม่เพียงพอ จะส่งผลให้เกิดโรคเลือดออกตามไรฟัน (scurvy) รวมไปถึงทำให้แผลหายช้าลง (N. Boyera , I. Galey et al. 1998) จึงเป็นที่น่าสนใจว่าวิตามินซีอาจจะสามารถส่งเสริมการหายของแผล ในช่องปากผ่านการกระตุ้นการเคลื่อนที่และเพิ่มจำนวนของเซลล์ ไฟโบรบลาสได้

2. วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาทดสอบคุณสมบัติของวิตามินซีที่มีต่อการหายของแผลในช่องปากในห้องปฏิบัติการ โดยทดสอบการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไฟโบรบลาสจากเหงือก

3. แนวคิดทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เมื่อเกิดบาดแผลขึ้น ร่างกายจะมีระบบการซ่อมแซมแบ่งเป็น 4 ระยะ ได้แก่ ระยะห้ามเลือด (hemostatic phase) ระยะอักเสบ (inflammation phase) ระยะเพิ่มจำนวน (proliferation phase) และ ระยะจัดเรียงใหม่ (remodeling phase) (Evans 2004, larjava 2012, Bassem M Mohammed 2016) ซึ่งจะมีเซลล์ที่มีบทบาทและทำหน้าที่แตกต่างกันออกไปในแต่ละระยะ ในระยะเพิ่มจำนวน เซลล์ที่มีบทบาทสำคัญ คือ เซลล์ไฟโบรบลาส (Bassem M Mohammed 2016) ในช่องปากเมื่อเกิดแผล เซลล์ไฟโบรบลาสจากเหงือกจะแบ่งตัวเพิ่มจำนวน และเคลื่อนตัวมาบริเวณที่มีแผล เพื่อหลั่งสารต่างๆ ได้แก่ ไซโตไคน์ (cytokines) และเมทริกซ์ภายนอกเซลล์ (extracellular matrix) เพื่อช่วยในกระบวนการหายของแผล (Taiseer al-Khateeb, Phil Stephens et al. 1997) เมทริกซ์ภายนอกเซลล์เป็นสิ่งแวดล้อมที่อยู่รอบเซลล์ มีหน้าที่หลายอย่าง ได้แก่ รับแรงที่กระทำต่อเซลล์ (mechanical support) ซึ่งมีอิทธิพลต่อ รูปร่าง การเคลื่อนที่ การพัฒนา และการเปลี่ยนแปลง (differentiation) ของเซลล์ นอกจากนี้ยังช่วยในการ

ติดต่อสื่อสารระหว่างเซลล์ และยังเป็นแหล่งสะสมสำหรับโมเลกุลต่างๆ ให้เซลล์อีกด้วย (Potter-Perigo 2011) คอลลาเจน (Collagen) เป็นเมทริกซ์ภายนอกเซลล์ ที่เซลล์ไฟโบรบลาสสังเคราะห์และสะสมไว้สำหรับ ซ่อมแซมเนื้อเยื่อที่บาดเจ็บ นอกจากนี้คอลลาเจนยังเป็นโปรตีนที่พบมากที่สุดในร่างกายมนุษย์ (Smith 1975) วิตามินซีเป็นวิตามินที่ละลายในน้ำ มีบทบาทสำคัญในการสร้างสายคอลลาเจน ที่สมบูรณ์ให้กับร่างกายและส่งเสริมการทำงานของเมทริกซ์ภายนอกเซลล์ มีงานวิจัยในอดีตมากมายที่แสดงให้เห็นว่าวิตามินซีมีประโยชน์ต่อการหายของแผลในร่างกาย (Hunt 1941, Bourne 1942, Cheraskin 1982, G.M. Abrahmsohn 1993) จึงมีความเป็นไปได้ว่าวิตามินซี จะสามารถส่งเสริมการหายของแผลในช่องปากจากจากการกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไฟโบรบลาส หรือส่งเสริมการการเคลื่อนที่ และการเพิ่มการสังเคราะห์เมทริกซ์นอกเซลล์

4. วิธีดำเนินการวิจัย

ส่วนที่ 1 การเพาะเลี้ยงเซลล์จากชิ้นเหงือก เก็บชิ้นเหงือกจากผู้ป่วยอาสาสมัครอายุ 18-25 ปี ที่เข้ารับการผ่าตัดฟันคุดที่ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยฟันคุดต้องเป็นฟันที่ยังไม่งอกขึ้นสู่ช่องปาก เมื่อได้ชิ้นเหงือกจากผู้ป่วยแล้ว นำใส่อาหารเลี้ยงเชื้อ DMEM (ผสม 10% FBS, 1% L-Gluamine, 1% antibiotics) ทันที เมื่อถึงห้องปฏิบัติการนำเชิ้นเหงือกล้างด้วย PBS 2 ครั้ง จากนั้นตัดเป็นชิ้นขนาด 2x2 มิลลิเมตร ทำการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37°C ที่ความเข้มข้นคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซนต์ หลังจากนั้นทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 3 วัน เพาะเลี้ยงจนได้เซลล์ไฟโบรบลาสมากพอ ที่จะนำไป ใช้ในการทดสอบกับวิตามินซีต่อไป

ส่วนที่ 2 การทดลองในห้องปฏิบัติการ การนำเซลล์ไฟโบรบลาสที่เพาะเลี้ยงจากส่วนที่1 มาใช้ในการทดลอง โดยแบ่งเป็น 2 การทดลองย่อย ได้แก่

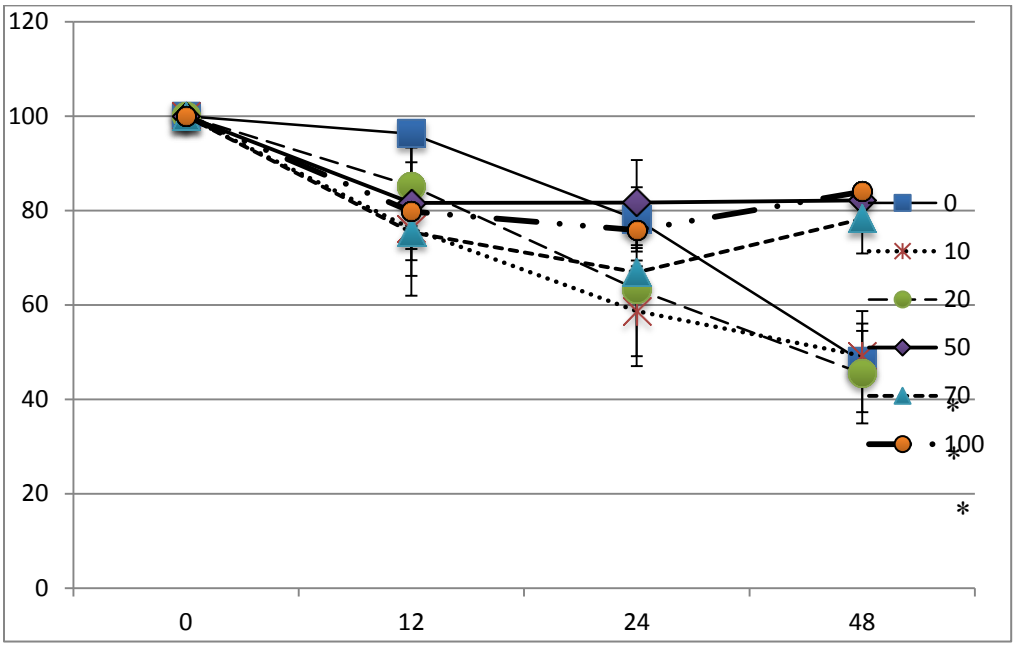
1. การจำลองแผลบนเซลล์เหงือกในห้องปฏิบัติการ (Scratch-test assay) หยอดเซลล์จำนวน 100,000 เซลล์/หลุม ลงในจานเลี้ยงเซลล์ชนิด 12 หลุม (คิดเป็นความหนาแน่นของเซลล์ 39500 เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร) เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 °C 5% คาร์บอนไดออกไซด์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นใช้ปลายปิเปตทำการขีดให้เกิดรอยแผลจำลองบนเพลตที่มีเซลล์เกาะอยู่เต็ม ทำการถ่ายภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Eclipse TS100, Nikon, Japan) จากนั้น ล้างผ่านเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสมวิตามินซีที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 0, 10, 20, 50, 70 และ100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 7 นาที 3 ครั้งต่อวัน เป็นเวลา 2 วัน โดยทำการบันทึกภาพที่เวลา 0, 12, 24, 48 ชั่วโมงหลังได้รับวิตามินซี พื้นที่รอยแผลจากภาพถ่ายจะถูกวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Image J 1.45S (Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) โดยใช้วิธีการวิเคราะห์ของ Liang และคณะ ปี2007 แผลที่หลงเหลืออยู่ถูกนำมาวิเคราะห์ เปรียบเทียบกัน

2. MTT assay หยอดเซลล์จำนวน 40,000 เซลล์/หลุม ลงในจานเลี้ยงเซลล์ชนิด 24 หลุม ที่อุณหภูมิ 37°C 5% คาร์บอนไดออกไซด์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นล้างเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสมวิตามินซีที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 0, 10, 20, 50, 70 และ100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 7 นาที 3 ครั้งต่อวัน เมื่อครบกำหนด 1 วัน ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เดิมออกใส่สาร MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyl tetrazolium bromide) จากนั้น บ่มเป็นเวลา 30 นาที ดูดสารออก ล้างด้วย PBS จากนั้นใส่สารหยุดปฏิกิริยา (9:1 DMSO and glycine buffer) จากนั้นนำไปวัดความเข้มแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร (ELx800, BioTek, Winooski, VT, USA) ความเข้มแสงที่ได้จะบ่งบอกถึงปริมาณเซลล์และอัตราการเจริญเติบโตเทียบกับกราฟมาตรฐาน และนำมาเปรียบเทียบกันในแต่ละกลุ่มทดลอง

5. ผลการวิจัย

การล้างด้วยวิตามินซีความเข้มข้น 10 และ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่มีผลอย่างมีนัยสำคัญต่อการปิดของแผลในห้องปฏิบัติการ อย่างไรก็ตาม วิตามินซี ที่ความเข้มข้น 50, 70 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำให้แผลปิดช้าลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (ระดับนัยสำคัญที่ 0.05) ดังแสดงให้เห็นในภาพที่ 1 สอดคล้องกับการทดสอบการเพิ่มจำนวนของเซลล์โดย MTT assay ดังแสดงให้เห็นในภาพที่ 2 ว่าความเข้มข้นของวิตามินซีตั้งแต่ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรขึ้นไป ลดการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไฟโบรบลาสลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เปอร์เซนต์พื้นที่ของแผล

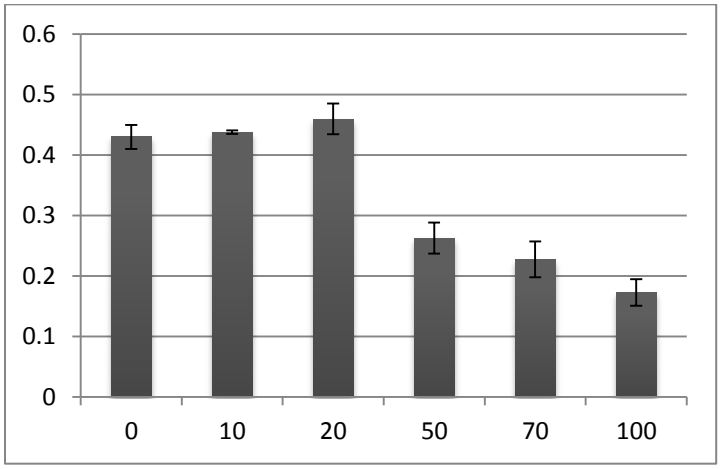


เวลา (ชั่วโมง)

*** คือมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ=0.05 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม**

ภาพที่ 1 แสดงเปอร์เซนต์พื้นที่แผลที่เวลา 0, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง หลังล้างด้วยวิตามินซี ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มแสง(optical density)



ความเข้มข้นของวิตามินซี(ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

*** คือมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ=0.05 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม**

ภาพที่2 แสดงผลค่าความเข้มแสง (Optical density) จากการศึกษาไฟโบรบลาสใน MTT Assay เมื่อได้รับวิติมันซี ที่ความเข้มข้นต่างๆ

6. การอภิปรายผล

การศึกษาของ G.M. Abrahmsohn และคณะ ปี 1993 ได้การทดสอบวิตามินซีต่อ การหายของแผลถอนฟัน พบว่าวิตามินซีช่วยเร่งการหายของแผล และสามารถช่วยลดอัตราการเกิดภาวะแทรกซ้อนได้ เช่น การเกิดกระดูกเบ้าฟันอักเสบ (dry socket) จึงมีการแนะนำ การให้วิตามินซีแก่ผู้ป่วยหลังได้รับ การผ่าตัดในช่องปาก แต่การทดสอบดังกล่าวให้ยาเม็ด รับประทานแก่ผู้ป่วย เมื่อเปรียบเทียบผลการวิจัยดังกล่าวกับงานวิจัยนี้ ซึ่งเป็นการให้เฉพาะที่ โดยตรงให้ผลที่แตกต่างกัน การใช้วิตามินซีที่เป็นยาเม็ดรับประทานจึงน่าจะเหมาะสมมากกว่า การอมให้ละลายช้าๆในช่องปาก เพื่อไม่ให้เกิดการสัมผัสของวิตามินซีกับแผลโดยตรง สาเหตุของการตายของเซลล์ไฟโบรบลาสที่ความเข้มข้นของวิตามินซีเพิ่มขึ้นนั้น มีความสงสัยว่าอาจเป็นเพราะความเป็นกรดที่เพิ่มขึ้น ผู้วิจัยจึงทำจึงทดสอบค่าความเป็นกรด-ด่าง (PH) ของวิตามินซีในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ความเข้มข้นต่างๆ ผลที่ได้คือไม่มีความแตกต่างกันของค่า PH ในทุกความเข้มข้น จึงสรุปได้ว่าผลที่ทำให้ให้เซลล์ตายไม่ได้เป็นผลจากความเป็นกรด แต่เป็นผลจากคุณสมบัติอื่นๆ ของวิตามินซี การศึกษาวิจัยในปัจจุบันเริ่มมีการศึกษาการใช้วิตามินซีทดสอบกับเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆ ผลที่ได้คือวิตามินซีสามารถลดการแบ่งตัวเพิ่มจำนวน (proliferation) ของเซลล์มะเร็งได้ (Park 2013) โดยกระบวนนั้นยังไม่ทราบแน่ชัด แต่หนึ่งในสาเหตุการตายคือการเกิดกระบวนการ การตายของเซลล์ (Apoptosis) (Seung-Woo Hong, Dong-Hoon Jin et al. 2007) จึงมีความเป็นไปได้ว่าการตายของเซลล์ในการทดลองนี้จะเกิดจาก Apoptosis เช่นกัน

7. สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุปได้ว่าวิตามินซีความเข้มข้นสูงกว่า 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำให้แผลในห้องปฏิบัติการ ปิดช้าลงอย่างมีนัยสำคัญโดยยับยั้งเพิ่มจำนวนของ เซลล์ไฟโบรบลาสจากเหงือก ในขณะที่วิตามินซี ความเข้มข้นต่ำนั้นมีความปลอดภัย และสามารถจ่ายให้ผู้ป่วยหลังได้รับการผ่าตัด ในช่องปากได้ แต่ควรเลือกการบริหารยาที่เหมาะสม โดยระวังการสัมผัสกันของวิตามินซีและแผลในช่องปากโดยตรง

8. บรรณานุกรม

1. A. Bendich, L. J. M., and O. Scandurra (1986). "The Antioxidant Role of Vitamin C." Adv. in Free Radical Biology & Medicine **2**: 419-444.
2. Bassem M Mohammed, B. J. F., Donatas Kraskauskas, Susan Ward4, Jennifer S Wayne, Donald F Brophy, Alpha A Fowler III, Dorne R Yager & Ramesh Natarajan (2016). "Vitamin C promotes wound healing through novel pleiotropic mechanisms." Int Wound J **13**: 527-584.
3. Bourne, G. H. (1942). "vitamin C and Repair Of Injured Tissues." The Lancet.

4. Cheraskin, W. M. R. a. E. (1982). "[OBJ]Vitamin C and human wound healing." Oral Surg **53**(231-236).
5. Evans , R. F. D. a. M. C. (2004). "Wound healing: An overview of acute, Fibrotic and Delayed healing." Frontiers in Bioscience **9**: 283-289.
6. G.M. Abrahmsohn, R. A. H., S.Fregeolle (1993). "Vitamin C and dental healing: Testing and placebo effect." General Dentistry.
7. HÄKkinen, L., V.-J. Uitto and H. Larjava (2000). "Cell biology of gingival wound healing." Periodontology 2000 **24**(1): 127-152.
8. Hunt, A. H. (1941). "The Role of Vitamin C in Wound Healing." Journal of Surgery **28**: 436.
9. larjava, H. (2012). Oral Wound Healing: Cell Biology and Clinical Management.
10. N. Boyera , I. Galey and B. A. Bernard (1998). "Effect of vitamin C and its derivatives on collagen synthesis and cross-linking by normal human fibroblasts " International Journal of Cosmetic Science **20**: 151-158.
11. Park, S. (2013). "The Effects of High Concentrations of Vitamin C on Cancer Cells." nutrients **5**: 3496-3505.
12. Potter-Perigo, T. N. W. a. S. (2011). "The extracellular matrix: an active or passive player in fibrosis?" AJP-Gastrointest Liver Physiol **301**(1522-1547).
13. Ryu-Ichiro Hata, H. S. (1989). "L-Ascorbic Acid 2-Phosphate Stimulates Collagen Accumulation, Cell Proliferation, and Formation of a Three-Dimensional Tissuelike Substance by Skin Fibroblasts." Journal of Cellular Physiology **138**: 8-16.
14. Seung-Woo Hong, Dong-Hoon Jin and S.-H. Y. Eun-Sil Hahm, Jong-Seok Lim, Keun-Il Kim, Young Yang, Soo-Suk Lee, Jae-Seung Kang, Wang-Jae Lee, Won-Keun Lee and Myeong-Sok Lee (2007). "Ascorbate (vitamin C) induces cell death through the apoptosis-inducing factor in human breast cancer cells." Oncology Reports **18**: 811-815.

15. Smith, Q. T. (1975). "Collagen metabolism in wound healing " S. B. Day (ed.), Trauma: 31-45.
Taiseer al-Khateeb, Phil Stephens, J. P. S. and and D. W. Thomas (1997). "An investigation of preferential fibroblast wound repopulation using a novel in vitro wound model." (0022-3492 (Print)).