

CLINICAL EFFICACY OF WOUND DRESSING CONTAINING SILK SERICIN  
FOR SPLIT-THICKNESS SKIN GRAFT DONOR SITE TREATMENT

Ms. Tippawan Siritientong

A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Doctor of Philosophy Program in Pharmaceutical Care

Department of Pharmacy Practice

Faculty of Pharmaceutical sciences

Chulalongkorn University

Academic Year 2013

Copyright of Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)  
are the thesis authors' files submitted through the Graduate School.

ประสิทธิศักร์ทางคลินิกของแผ่นปิดแผลผสมเซริซินจากไหม  
ในการรักษาบาดแผลจากการปลูกถ่ายผิวหนังที่มีหนังแท้เหลืออยู่บางส่วน

นางสาวทิพวรรณ ศิริเต็ยรทอง

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรดุษฎีบัณฑิต

สาขาวิชาการบริหารทางเภสัชกรรม ภาควิชาเภสัชกรรมปฏิบัติ

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2556

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ทิพวรรณ ศิริเชิยรทอง: ประสิทธิภาพทางคลินิกของแผ่นปิดแผลผสมเซริซินจากไหมในการรักษาบาดแผลจากการปลูกถ่ายผิวหนังที่มีหนังแท้เหลืออยู่บางส่วน. (CLINICAL EFFICACY OF WOUND DRESSING CONTAINING SILK SERICIN FOR SPLIT-THICKNESS SKIN GRAFT DONOR SITE TREATMENT) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รศ.ภญ.ดร.พรอนงค์ อร่ามวิทย์, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: รศ.นพ.อภิชัย อังสพัทธ์, 215 หน้า.

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบความปลอดภัยของแผ่นปิดแผลผสมเซริซินด้วยวิธี patch test ในอาสาสมัครสุขภาพดีซึ่งทำการวิจัยที่ภาควิชาเภสัชกรรมปฏิบัติ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยและโรงพยาบาลตำรวจในช่วงเดือนเมษายน 2554 ถึงมกราคม 2555 และเพื่อทดสอบประสิทธิภาพและความปลอดภัยของแผ่นปิดแผลผสมเซริซินในการรักษาบาดแผลจากการปลูกถ่ายผิวหนังที่มีหนังแท้เหลืออยู่บางส่วนเปรียบเทียบกับ Bactigras<sup>®</sup> ซึ่งเป็นแผ่นปิดแผลมาตรฐานทำการวิจัยในผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาที่หน่วยศัลยกรรมตกแต่งและเสริมสร้าง แผนกศัลยศาสตร์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ในช่วงเดือนมีนาคมถึงธันวาคม 2555

อาสาสมัครสุขภาพดีที่เข้าร่วมการศึกษาเพื่อทดสอบความปลอดภัยของแผ่นปิดแผลผสมเซริซินจนสิ้นสุดการวิจัยมีจำนวนทั้งสิ้น 110 คน สุ่มผิวหนังบริเวณแผ่นหลังเพื่อติดแผ่นปิดแผลผสมเซริซินหรือ Bactigras<sup>®</sup> เป็นเวลา 3 วัน 2 รอบ วันละระยะเวลา 7-10 วัน แล้วติดแผ่นปิดแผลทั้งสองชนิดซ้ำในตำแหน่งเดิมเป็นเวลาอีก 3 วัน ผลการประเมินการเปลี่ยนแปลงของความแดงและความดำของผิวหนังด้วย Mexameter MX18<sup>®</sup> และประเมินการระคายเคืองผิวหนังเฉพาะที่ด้วยหมอมือหนัง 3 ทานด้วย Human Repeat Insult Patch Test (HRIPT) scale พบการระคายเคืองของผิวหนังที่สัมผัสแผ่นปิดแผลผสมเซริซินแตกต่างจากผิวหนังที่สัมผัสกับ Bactigras<sup>®</sup> อย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p>0.05$ )

ผู้ป่วยที่เข้าร่วมการวิจัยทางคลินิกเพื่อทดสอบประสิทธิภาพและความปลอดภัยของแผ่นปิดแผลผสมเซริซินในการรักษาบาดแผลจากการปลูกถ่ายผิวหนังที่มีหนังแท้เหลืออยู่บางส่วนมีทั้งหมด 28 คนซึ่งมีบาดแผลดังกล่าวจำนวน 30 บาดแผลแบ่งครั้งแต่ละบาดแผลเพื่อสุ่มรักษาด้วยแผ่นปิดแผลผสมเซริซินและ Bactigras<sup>®</sup> พบว่าระยะเวลาเฉลี่ยที่ใช้ในการหายของบาดแผลและคะแนนความเจ็บปวดที่ผู้ป่วยประเมินในวันที่ 1-5 หลังการผ่าตัดของบาดแผลจากการปลูกถ่ายผิวหนังที่มีหนังแท้เหลืออยู่บางส่วนที่รักษาด้วยแผ่นปิดแผลผสมเซริซินน้อยกว่าบาดแผลที่รักษาด้วย Bactigras<sup>®</sup> อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p<0.05$ ) พบบาดแผลครั้งที่รักษาด้วยแผ่นปิดแผลผสมเซริซินมีสัญญาณของการติดเชื้อ 2 บาดแผล (ร้อยละ 6.67) ในขณะที่บาดแผลครั้งที่รักษาด้วย Bactigras<sup>®</sup> ไม่พบการติดเชื้อ ด้านความปลอดภัย ปริมาณสารเคมีในเลือด ได้แก่ AST, ALT, ALP, BUN และระดับน้ำตาลในเลือดสูงขึ้นในวันแรกรับและมีปริมาณลดลงในวันที่ 7-14 ขณะที่ปริมาณอัลบูมิน อิเล็กโทรไลต์ในเลือด และองค์ประกอบของเลือดของผู้ป่วย ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างก่อนและหลังผ่าตัด ( $p>0.05$ ) ระดับของสารก่อการอักเสบ คือ IL-6 และ TNF- $\alpha$  ในเลือดของผู้ป่วยมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในวันแรกหลังการผ่าตัด ( $p<0.05$ ) และลดลงมาอยู่ระดับเดียวกับก่อนการผ่าตัดในวันที่ 7-14 หลังการผ่าตัด เมื่อนำแผ่นปิดแผลหลังใช้กับผู้ป่วยแล้วมาสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าเซลล์ผิวหนังติดกับ Bactigras<sup>®</sup> อย่างแน่นหนามากกว่าเซลล์ผิวหนังที่อยู่บนแผ่นปิดแผลผสมเซริซิน เมื่อลอกเซลล์ดังกล่าวออกมาพบลักษณะของเซลล์จากแผ่นปิดแผลผสมเซริซินสมบูรณ์และมีขอบเขตของเซลล์ชัดเจนซึ่งแสดงให้เห็นถึงความสมบูรณ์ของเซลล์ผิวหนังที่ถูกกระตุ้นการเจริญเติบโตด้วยเซริซิน

การวิจัยนี้สรุปได้ว่าแผ่นปิดแผลผสมเซริซินสามารถเร่งการหายและลดระดับความเจ็บปวดของบาดแผลที่เกิดจากการผ่าตัดที่หน้าบางส่วนเมื่อเปรียบเทียบผลการรักษาด้วย Bactigras<sup>®</sup> โดยไม่ก่อให้เกิดอาการไม่พึงประสงค์ที่รุนแรง จึงอาจเป็นทางเลือกใหม่ให้กับผู้ป่วยที่มีความจำเป็นต้องได้รับการรักษาด้วยการปลูกถ่ายผิวหนังที่มีหนังแท้เหลืออยู่บางส่วนต่อไป

ภาควิชา.....เภสัชกรรมปฏิบัติ..... ลายมือชื่อนิสิต.....  
 สาขาวิชา.....การพยาบาลทางเภสัชกรรม..... ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....  
 ปีการศึกษา ..2556..... ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม .....

# # 5277104033: MAJOR PHARMACEUTICAL CARE

KEYWORDS : SERICIN/ WOUND DRESSING/ SKIN GRAFT/ DONOR SITE

TIPPAWAN SIRITIENTONG: CLINICAL EFFICACY OF WOUND DRESSING CONTAINING SILK SERICIN FOR SPLIT-THICKNESS SKIN GRAFT DONOR SITE TREATMENT. ADVISOR: ASSOC. PROF. PORNANONG ARAMWIT, Pharm.D., Ph.D., CO-ADVISOR: ASSOC. PROF. APICHAH ANGSPATT, M.D., 215 pp.

The objective of this study was to investigate the safety profile of silk sericin dressing using patch test in healthy volunteers during April 2011 to January 2012 at the Department of Pharmacy Practice, Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University and Police General Hospital. We also would like to study the clinical efficacy of this dressing for Split-Thickness Skin Graft (STSG) donor site treatment compared with Bactigras<sup>®</sup>, a standard treatment, during March to December 2012 at the Division of Plastic and Reconstructive Surgery, Department of Surgery, King Chulalongkorn Memorial Hospital.

One hundred and ten healthy volunteers were included and complied with patch test protocol by randomly applying silk sericin dressing and Bactigras<sup>®</sup> on the back for 3 days twice. Seven and ten days later, both dressings were re-applied on the same areas and left for another 3 days in the challenge phase. There was no significant difference in skin irritation including the change of skin color measured by Mexameter MX18<sup>®</sup> and Human Repeat Insult Patch Test (HRIPT) scale, evaluated by 3 dermatologists, between the skin treated with silk sericin dressings and Bactigras<sup>®</sup> ( $p>0.05$ ).

Twenty-eight patients with 30 STSG donor sites were enrolled in this study. The donor sites were equally divided into two parts, one part treated with silk sericin dressing and Bactigras<sup>®</sup> was applied to another. The results showed that the median of time for complete healing as well as pain scores assessed by patients during 5 postoperative days consecutively on the side treated with silk sericin dressing were significantly lower than those treated with Bactigras<sup>®</sup> ( $p<0.05$ ). Two sites treated with silk sericin dressing (6.7%) showed signs of infection while no sign of infection was found in Bactigras<sup>®</sup>-treated sites. Initially, blood biochemistry data including AST, ALT, ALP, BUN and fasting blood sugar were elevated but then decreased within 7-14 days later while albumin, blood electrolytes and blood compositions were changed insignificantly pre- and post-operation ( $p>0.05$ ). On the first post-operative day, serum pro-inflammatory cytokines (IL-6 and TNF- $\alpha$ ) increased significantly ( $p<0.05$ ) and then returned to baseline levels on day 7-14 post-operation. According to microscope images of the dressing after peeling off, epithelial cells attached more tightly on Bactigras<sup>®</sup> than silk sericin dressing. Better morphology and complete border of epithelial cells found on silk sericin dressing after peeling off.

In conclusion, silk sericin dressing accelerates healing process and significantly reduced pain, comparing to that of Bactigras<sup>®</sup> without serious adverse events. Therefore, we introduce silk sericin dressing as an alternative treatment for STSG donor site.

Department : Pharmacy Practice

Student's Signature .....

Field of Study : Pharmaceutical Care

Advisor's Signature .....

Academic Year : 2013

Co-advisor's Signature .....

## ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my sincere gratitude to my thesis advisor, Associate Professor Pornanong Aramwit, Pharm.D., Ph.D. of the Department of Pharmacy Practice, Faculty of Pharmaceutical Sciences, and my thesis co-advisor, Associate Professor Apichai Angspatt, M.D. of the Division of Plastic and Reconstructive Surgery, Department of Surgery, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, for the valuable advice, continual guidance, supervision, encouragement and kindness throughout the course of this study.

I am thankful to the members of my thesis committee for their valuable scrutiny and comments.

I gratefully acknowledge the financial support for my study from the Thailand Research Fund through the Royal Golden Jubilee Ph.D. Program (Grant No. PHD/0115/2551). Thank you very much to Assistant Professor Pithi Chanvorachote, Ph.D. of the Department of Pharmacology and Physiology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University for support in knowledge and facilitation relating to the *in vitro* experiment. I would like to express my deeply appreciation to Flt.Lt. Surinnart Charoenchitt, M.D. for his co-operation during the clinical study. Special thanks to Ms. Karuna Klaimukh at Special laboratory, Mr. Satit Cheykwrop at C.S.S.D. of King Chulalongkorn Memorial Hospital and Ms. Thanyawan Aresanasuwan at Bangkok Biomaterial Center, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University for their support in the laboratory instruments and facilities all along the sample preparations.

In addition, I am grateful to all friends and staffs at my faculty for their encouragement and help. I would like to express my deepest thanks to all healthy volunteers and patients who participated in this study and all of those whose name have not been mentioned for helping me in any ways.

Finally, I am deeply grateful and infinite thankfulness to my family for their endless love, understanding and precious support throughout my life. All of your care and encouragement have brought me to this success.

## CONTENTS

	PAGE
ABSTRACT (THAI).....	iv
ABSTRACT (ENGLISH).....	v
ACKNOWLEDGEMENTS.....	vi
CONTENTS.....	vii
LIST OF TABLES.....	ix
LIST OF FIGURES.....	x
LIST OF ABBREVIATIONS.....	xi
CHAPTER I INTRODUCTION.....	1
1.1 Rationale and background.....	1
1.2 Hypothesis.....	4
1.3 Objectives.....	5
1.4 Scopes.....	5
1.5 Expected Outcomes.....	5
CHAPTER II LITERATURE REVIEWS.....	7
2.1 Skin structures and functions.....	7
2.2 Wound and wound healing process.....	9
2.3 Skin grafts.....	16
2.4 Wound dressing for split-thickness skin graft donor site.....	18
2.5 Silk sericin.....	23
CHAPTER III RESEARCH METHODOLOGY.....	29
3.1 Phase I preliminary study for safety of the silk sericin dressing in healthy volunteers.....	29
3.2 Phase II clinical efficacy of silk sericin dressing in patients with STSG donor site.....	35
3.3 Statistical analysis.....	44

	<b>PAGE</b>
3.4 Ethical consideration.....	45
CHAPTER IV RESULTS.....	46
4.1 Phase I preliminary study for safety of the silk sericin dressing in healthy volunteers.....	46
4.2 Phase II clinical efficacy of silk sericin dressing in patients with STSG donor site.....	54
CHAPTER V DISCUSSION.....	75
CHAPTER VI CONCLUSION.....	87
6.1 Conclusion.....	87
6.2 Limitations.....	90
6.3 Recommendations.....	90
REFERENCES.....	91
APPENDICES.....	105
Appendix A.....	106
Appendix B.....	107
Appendix C.....	116
Appendix D.....	158
Appendix E.....	162
Appendix F.....	214
VITA.....	215



## LIST OF TABLES

TABLE	PAGE
1 Factors influencing wound healing process.....	13
2 Summary of commercial wound dressing types and properties.....	20
3 Participants' demographic data (for safety evaluation using patch test).....	47
4 Erythema and melanin values of the tested skin measured by Mexameter MX18 <sup>®</sup> during each visit.....	48
5 Skin evaluations for any local side effects according to HRIPT scoring scales by 3 independent clinical dermatologists compared to the baseline skin characteristics.....	51
6 Percentage of skin evaluation according to HRIPT scoring scale, calculate by the frequency of responses at every visit from 3 independent clinical dermatologists.....	52
7 Participants' demographic data (for efficacy and safety evaluation during clinical study).....	55
8 Donor sites' characteristics.....	57
9 Times for complete healing.....	58
10 Pain score evaluated by patients.....	62
11 Comparison of pain score between non-infected and infected donor sites..	63
12 Blood biochemistry data of hepatic functions, renal functions, electrolytes levels and blood compositions.....	65
13 Comparison of blood biochemistry data between patients having infected and non-infected donor sites.....	67
14 IL-6 and TNF- $\alpha$ levels in patients' serum.....	70

## LIST OF FIGURES

FIGURE	PAGE
1 A cross-sectional image of normal human skin.....	8
2 Normal wound healing process and cells involved in each step.....	11
3 Classification of skin grafts by thickness.....	17
4 Silk sericin dressing.....	31
5 Bactigras <sup>®</sup> .....	31
6 Diagram of phase I experiment at every visit of healthy volunteers.....	34
7 Diagram of phase II clinical study.....	42
8 Erythema value of the skin area contacted with silk sericin dressing and Bactigras <sup>®</sup> during each visit.....	49
9 Melanin value of the skin area contacted with silk sericin dressing and Bactigras <sup>®</sup> during each visit.....	49
10 Kaplan–Meier curves comparing cumulative healing of all STSG donor site using silk sericin dressing compared with Bactigras <sup>®</sup> .....	59
11 Body temperatures of the patients.....	61
12 Silk sericin dressing and Bactigras <sup>®</sup> after peeling off as visual observation and scanning electron microscopic observation.....	72
13 Epithelial cells appearance under polarized light microscope which found on silk sericin dressing and Bactigras <sup>®</sup> after peeling off.....	73
14 STSG donor sites with signs of infection.....	83

## LIST OF ABBREVIATIONS

ALP	=	Alkaline phosphatase
ALT	=	Alanine aminotransferase
AST	=	Aspartate aminotransferase
BMI	=	Body mass index
BSA	=	Bovine serum albumin
BUN	=	Blood urea nitrogen
EGF	=	Epidermal growth factor
ELISA	=	Enzyme linked immunosorbent assays
FBS	=	Fasting blood glucose
FGF	=	Fibroblast growth factor
FTSG	=	Full-thickness skin graft
Hb	=	Hemoglobin
Hct	=	Hematocrit
HRIPT	=	Human repeat insult patch test
HRP	=	Horse radish peroxidase
IGF	=	Insulin-like growth factors
IL-6	=	Interleukin-6
KGF	=	Keratinocyte growth factor
MMP	=	Matrix metalloproteinases
PDGF	=	Platelet derived growth factor
PVA	=	Polyvinyl alcohol
ROS	=	Reactive oxygen species
Scr	=	Serum creatinine
STSG	=	Split-thickness skin graft
TGF	=	Transforming growth factor
TIMP	=	Tissue inhibitors of metalloproteinases

TMB	=	Tetramethylbenzidine
TNF- $\alpha$	=	Tumor necrosis factor- $\alpha$
VAS	=	Visual analog scale
VEGF	=	Vascular endothelial growth factor
WBC	=	White blood cells

# CHAPTER I

## INTRODUCTION

### 1.1 Rationale and Background

Split-Thickness Skin Graft (STSG) is one of the common surgical procedures in plastic and reconstructive surgery done by cutting healthy skin included all layers of the epidermis and varied parts of the dermis for covering damaged area, the recipient site, of the body (1, 2). STSG is often employed after serious injury when large area of the skin tissue is loss or wound is unhealed by normal epithelialization. The purposes of the grafting are; accelerating wound healing process, shortening the course of treatment and reducing any complications to the patients (3-5). In the United States, there are approximately 24,000 burn victims underwent STSG in order to get better recovery and reduce infection rate (6). Moreover, in 2010, there were 88 patients required STSG for treatment of scar contractures, tumor resections, traumatic wounds and burns in King Chulalongkorn Memorial Hospital, Bangkok, Thailand (7). After undergoing skin graft harvesting; however, another wound is occurred at the donor site which can cause pain, increase risk of extraneous microbial contamination and several possible complications such as wound contraction, fluid and electrolytes imbalance and systemic infection as the same as wounds from other causes. Donor site requires appropriate management and needs adequate wound assessment consecutively; otherwise, it will become deeper wound, of which patient extremely suffers from, leading to lengthen the hospital stay, and contributes to the death of the patients (2, 8).

Within 24 hours postoperation, there are several steps for STSG donor site therapy. First, it is essential to stop bleeding using sterile gauze soaked with normal saline-diluted adrenaline. Second, all wounds are covered with primary dressing and

secondary absorptive layer to absorb exudates and protect wounds from shearing forces. Third, elastic bandage should be applied to the donor site in order to provide adequate pressure to reduce blood loss which can be removed after 6 hours of postoperation. Moreover, a graft site and a donor site must remain immobilize along the treatment course to minimize healing disruption (2, 9). It must be noted that if there is excessive fluid leakage from secondary dressing or any signs of infection (redness or swelling of surrounding tissue, malodor, or increased purulent exudates), health care providers must consider removing all dressings and perform a wound swab at the suspected site in order to identify types and amounts of infected microorganism. After a donor site is re-dressed with a suitable dressing, physicians should regularly assess the patient's pain and give any analgesics as required. Moreover, continuous rehabilitation should be provided to support patients to their normal activities as soon as possible (9, 10).

Objectives of wound management include healing promotion, pain reduction, blood or fluid loss minimization, and avoidance from wound infection. Currently, there are many types of commercial wound dressings which can be categorized into 3 types; open dressing, semi-open dressing, and close dressing (11). It is important to select suitable dressings for STSG donor site treatment. Ideal dressing is able to maintain moisture environment on wound surface supporting normal re-epithelialization of the skin and minimize dressing change frequency to reduce medical care management. However, at present, commercial wound dressings have no active ingredient which can be accelerate wound healing process effectively. Moreover, newly developed wound dressings inserted with growth factors or cell components are more costly than the traditional materials due to the advance technology and have to import from other countries (12-14). As the result of economical limitation, most of Thai traumatic patients cannot afford to use those new dressings in spite of having serious indications. Therefore, this study aims to fabricate wound dressing from local raw materials which

can accelerate the healing process and investigate its healing properties together with any possible adverse reactions (if any).

Silk sericin is a natural protein from the cocoons of *Bombyx mori* which is normally removed by alkali water during degumming process in the manufacture of silk fabrics (15, 16). Many researches, in the recent years, have obtained the knowledge about the biological properties of silk sericin and its advantages in medical field. Silk sericin contains amino acids similarly to natural moisturizing factors found in human skin. This protein has been reported to be an effective skin moisturizer and antioxidant (17). It can promote fibroblast and keratinocyte proliferation *in vitro* (18, 19). The study by Aramwit *et al.* (20) indicated that topical cream containing 8 % silk sericin showed the ability to accelerate epithelialization process and promoted collagen synthesis in rat full-thickness wounds without causing any inflammation compared to cream base or 10 % povidone-iodine solution (Betadine<sup>®</sup>). Pro-inflammatory cytokine, Interleukin (IL)-1 $\beta$  and Tumor Necrosis Factor (TNF)- $\alpha$ , in wounds treated with sericin cream were lower than wounds treated with cream base or normal saline solution. This study concluded that sericin cream can promote wound healing with no cytotoxicity and inflammation (21). Recent study by Palapinyo *et al.* in 2011 (22) investigated the efficacy and safety of topical silver zinc sulfadiazine cream containing silk sericin compared with silver zinc sulfadiazine cream commonly used at Siriraj Hospital, Bangkok, Thailand, in 16 burn patients with 34 partial thickness wounds. The results indicated that cream containing silk sericin can effectively shorten the course of treatment with no adverse reaction. However, topical preparation such as cream lacks of wound protective property from mechanical trauma and requires at least daily wound care by medical providers which causes inconvenience to both patients and health care providers. Moreover, it is not consistent with STSG donor site treatment principle to leave the primary dressing of donor site intact as long as possible in order to minimize healing process disruption (2).

According to the benefits on wound healing promotion of silk sericin and disadvantages of cream preparation, a wound dressing containing silk sericin has been developed by blending sericin solution with polymer in order to form a scaffold which is a high porous three-dimensional structure with outstanding benefits for gas permeability and fluid entrapment (23). After obtaining sericin-polymer scaffold with desired properties, stabilization process and gamma-radiated sterilization are consecutively performed prior to its use in clinical practice (24). Preliminary *in vivo* study of the efficacy and safety of wound dressing containing silk sericin (silk sericin dressing) on full thickness skin wounds in rats showed that wounds treated with this scaffold had higher rate of healing and wound sizes reduced faster than those treated with control dressing (without silk sericin). No infection was found during treatment with either type of wound dressing (25). In histological examination, wounds treated with silk sericin dressing did not show any significant inflammatory responses. From the advantages of a newly developed dressing, the purpose of this study is to investigate the safety profile of silk sericin dressing in healthy volunteers using patch testing procedure and the clinical efficacy of this dressing for STSG donor site treatment compared with petrolatum-impregnated fine mesh gauze, Bactigras<sup>®</sup>, which is a standard dressing for donor site therapy at King Chulalongkorn Memorial Hospital. Meshing characteristics of Bactigras<sup>®</sup> allows fluid drainage to the secondary absorbent dressings and decrease risk of wound maceration. The major disadvantages of Bactigras<sup>®</sup> are lack of wound healing acceleration property, no absorptive capacity and unable to maintain moisture environment on wound bed which leads to wound adherence. High wound bed adherence imply damage epithelial cells during dressing removal as well as cause pain and discomfort to the patients. In this study, the time for complete re-epithelialization, rate of infection, and pain evaluation as well as the adverse events that may occur are evaluated. Systemic pro-inflammatory cytokines patterns of the patients and cells attached to wound dressing characteristics are also investigated.

## 1.2 Hypothesis



Wound dressing containing silk sericin (called silk sericin dressing) shows minimum local adverse events and has acceptable safety profile when undergoing human patch test in healthy volunteers. Moreover, it expects that silk sericin dressing can accelerate wound healing process in STSG donor sites. It also postulates that STSG donor sites treated with silk sericin dressing show faster healing rate and cause less pain than those treated with Bactigras<sup>®</sup>, a standard treatment. There should be no difference in infection rate and adverse event between STSG donor sites treated with silk sericin dressing compared to those treated with Bactigras<sup>®</sup>.

### 1.3 Objectives

- 1.3.1 To evaluate the safety of the silk sericin dressing in healthy volunteers using human patch test.
- 1.3.2 To investigate the efficacy and safety of the silk sericin dressing compared with Bactigras<sup>®</sup> for STSG donor site treatment. Any possible adverse events including systemic effects on hepatic and renal functions and also pro-inflammatory cytokines (IL-6 and TNF- $\alpha$ ) are evaluated.

### 1.4 Scopes

- 1.4.1 Human patch test was conducted to determine the safety profiles of silk sericin dressing compared with Bactigras<sup>®</sup> from April 2011 to January 2012 at the Department of Pharmacy Practice, Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University and Police General Hospital, Bangkok, Thailand.
- 1.4.2 The prospective randomized clinical study was conducted to determine the efficacy and safety of silk sericin dressing as well as its effects on hepatic, renal functions and pro-inflammatory cytokines (IL-6 and TNF- $\alpha$ ) in patients underwent STSG donor site from March to December 2012 at the

Division of Plastic and Reconstructive Surgery, Department of Surgery,  
King Chulalongkorn Memorial Hospital, Bangkok, Thailand.

## 1.5 Expected Outcomes

- 1.5.1 This study will show the efficacy of silk sericin dressing on wound healing acceleration. STSG donor site can be used as a model for new developed dressing materials efficacy as it is uniform in thickness with smooth surface. The results of this study will assure the potential of silk sericin dressing as a dressing choice for patients undergoing STSG and other open-wounded treatment, as an alternative to current expensive commercial wound dressings.
- 1.5.2. This study may show any possible adverse events caused by silk sericin dressing, both in healthy volunteers and patients, which is an important data for further development of wound dressing.

## CHAPTER II

### LITERATURE REVIEWS

#### 2.1 Skin structures and functions

A basic understanding of skin structures and functions is needed to connect with the role of the skin as an important route of extraneous substances exposure contributing to many diseases. Skin is the largest organ of the body which consists of 3 layers; epidermis, dermis and subcutaneous tissues (Figure 1). Epidermis, the outermost layer of human body exposes directly to the environment. The dense stratified squamous epithelium of this layer acts as a protective barrier of internal organs which is continuously sloughed off and replaced by keratinocytes arise from the basal layer. In addition to keratinocytes, this layer consists of melanocytes, Merkel cells and Langerhans cell which are involved in skin pigmentation, perception and immune response, respectively. Thickness of epidermis varies from 0.05 mm on the eyelids to 0.8-1.5 mm on the soles of the feet and palms of the hand with average whole epidermis thickness equals to 0.1-0.3 mm (26, 27). Dermis, the second layer of human skin, is found below the epidermis separated by a basement membrane. It contains a number of structures including a network of connective tissue, predominantly collagen, elastin and proteoglycans produced by fibroblasts to provide cell support, elasticity and strength of the skin. There are rich of capillary blood vessels providing all cells nutrients and waste disposal and involving skin thermoregulation by vasoconstriction or dilatation. Cutaneous sensory nerves lie in dermis effectively detect pain, temperature, touch, pressure and vibration. Hair follicles, sebaceous glands, sweat glands and lymphatic tissues are also located in the dermis. Subcutaneous tissues or hypodermis is connected between the dermis and underlying body components. It is mainly composed of adipocytes which serve as thermal insulator, mechanical protection and

high-energy source of the body (28). In general, all these components of the skin layers work perfectly together to provide effective functions of the skin.

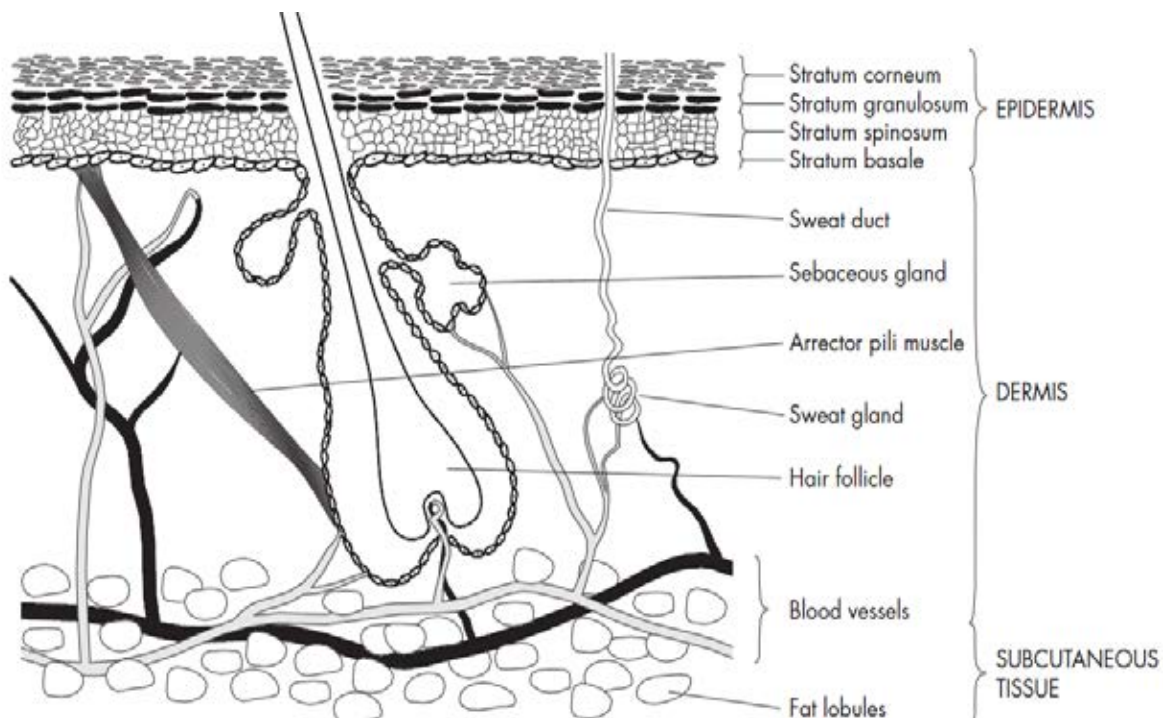


Figure 1: A cross-sectional image of normal human skin (28)

There are many important functions of normal human skin as following which result from the co-operation of various skin components (28). First, skin acts as a protective barrier which allows or not allows water and substances to penetrate into and out of the body. Extraneous pathogens are also effectively blocked from entering into the body by dense stratified squamous layers of epidermis and secretions from cutaneous glands. Second, skin reduces ultraviolet light exposure to the body by absorption and reflection activity of melanin and epidermal lipid; therefore, it avoids human DNAs from exposing ultraviolet directly and protects them against mutation. Third, skin plays an important role of vitamin D production, storage and secretion of the body by ultraviolet-induced modification of cholesterol-related molecules in the skin.

Fourth, skin has many sensory nerve fibers for heat, cold, pain and mechanical sensations. Skin works as a thermo-regulator to maintain body temperature appropriately for normal functions of internal organs by transmitting signal to hypothalamus in brain which regulates sweat secretion and capillary networks vasoconstriction or vasodilatation. Moreover, nociceptors in skin layers are pain perceptions which are one of the warning mechanisms of the body to avoid injury. Fifth, skin is the first-line of immune systems of the body. Langerhan cells in epidermis can entrap foreign bodies and transmit signal to other immune cells such as macrophages or lymphocytes (29). Sixth, skin, including hair and nails, is involved in aesthetic aspects and human appearance for sociability (28). Therefore, once skin is damaged by any cause such as acute trauma, burn or surgical interventions, these functions will be disrupted consecutively. The severity of damage depends on the depth, size and location of the defects. It lets inner organs directly expose to potentially harmful microbial, thermal, mechanical and chemical influences and then causes prolonged pathological impacts to the body leading to the death of the patients.

## **2.2 Wound and wound healing process**

Wound is defined as a disruption of normal anatomical structure and function regardless to the causes of damage (30). It can be range from a simple defect on superficial skin to extensive damage into deeper tissue such as subcutaneous layer, muscle or even bone. There are many criteria for wound classifications for better understanding each wound behavior and treatment decision. Based on the clinical time frame of healing, wound can be classified as acute and chronic wounds. Acute wound is a skin injury that can heal completely to comparable structure and function to intact skin within an expected time frame, usually 30 days (31). It normally causes by mechanical trauma or surgical procedure. On the other hand, chronic wound is a skin injury that fails to proceed through a normal healing process orderly and timely. Chronic wound often results from underlying pathological conditions of the patients such as

diabetes, malignancies or persistent infections (30, 31). Wound also can be categorized by appearances and degree of contamination. Appearances classify wounds into necrotic (dry black dead tissue), sloughy (moistly yellow rehydrate-dead tissue), infected-malodorous (red inflamed tissue with pus and unpleasant odor), granulating (red exudative granulation tissue) and epithelializing (pink proliferative epithelial cells to form new epidermis) (32). Wound are also classified based on degree of contamination as aseptic (bone and joint area), contaminated (abdominal and lung area) and septic wound (abscess or bowel area) (31). Wounding, of whatever form, disrupts the local environment within the tissue, which results in impaired functions of the skin and consequence of complications leading to the death of the patients. Therefore, all wounds must be treated properly to return to a normal anatomical structure, function and appearance as soon as possible.

At the moment of skin injury, wound healing process is spontaneously switched on as a physiological response. Typically, the process of wound healing is divided into 4 continuously overlapping phases including hemostasis, inflammatory, proliferative and remodeling phase as shown in Figure 2 (31).

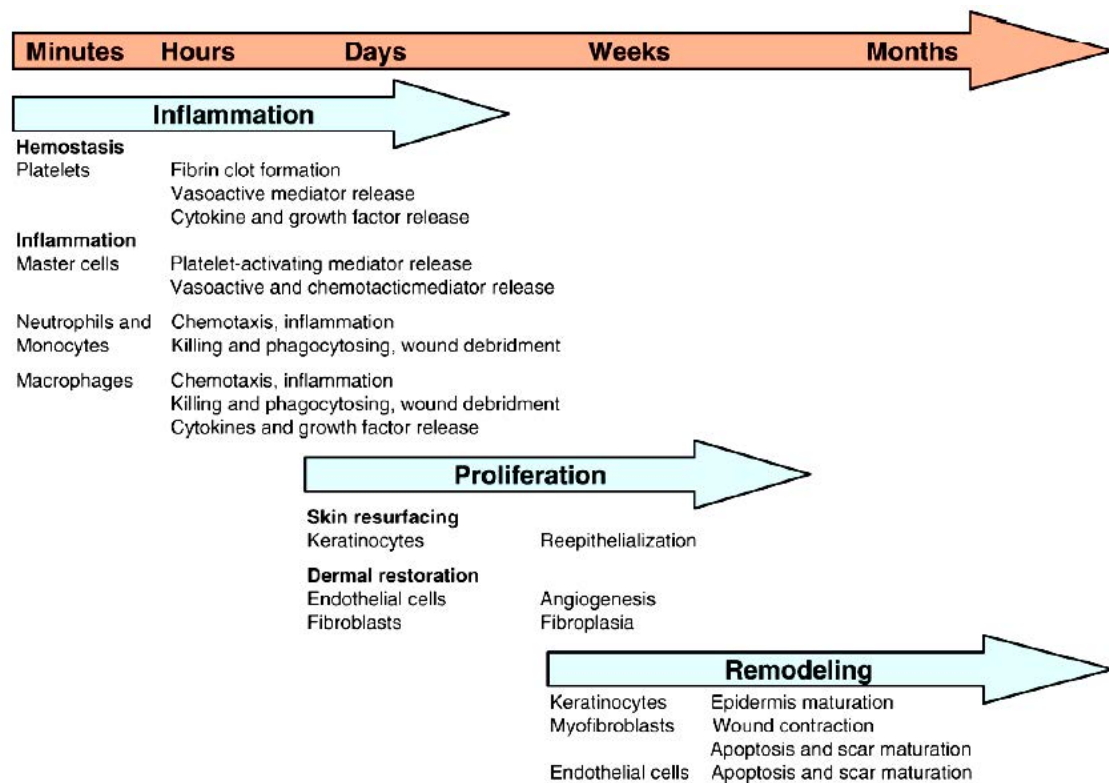


Figure 2: Normal wound healing process and cells involved in each step (33)

Hemostasis phase occurs immediately after injury. The purpose of this phase is to limit blood loss by vasoconstriction, platelet aggregation and blood clot formation at injured area. The clot that forms is made of platelets, fibrin, fibronectin, vitronectin and thrombospondin (31, 34). Platelets aggregated within a fibrin clot network also provide the matrix for cell migration, release a variety of growth factors and cytokines such as Platelet Derived Growth Factor (PDGF), Transforming Growth Factor (TGF)- $\beta$ , Epidermal Growth Factor (EGF) and Insulin-like Growth Factors (IGF) (35), that set the stage for an orderly series of events into inflammatory phase.

At the early inflammatory phase within 24-36 hours of injury, the increase of vascular permeability and chemoattractive agents induce neutrophil infiltration process. Neutrophils adhere on the surface of epithelium mediated by adhesion molecules named selectin and integrin and subsequently migrate into wound site to phagocytose

microorganisms, foreign bodies and debris providing the first line of defense against infection by releasing proteolytic enzymes and Reactive Oxygen Species (ROS) (31). Within 72 hours of injury, if the wound is not contaminated, neutrophils are then eliminated and macrophages appear in the wound to continue phagocytosis. Macrophages begin the transition from inflammation to proliferative phase by secreting a variety of chemotactic factors (eg. fibronectin) and growth factors (eg. PDGF, TGF- $\beta$ , TGF- $\alpha$ , Fibroblast Growth Factor (FGF), Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)) that stimulate keratinocytes, fibroblasts and endothelial cells activities for wound repair (33). Lymphocytes are the last cell types to enter the wound during the late inflammatory phase which are later involved in the remodeling of collagen and extracellular matrix in the following step (36).

Proliferative phase which normally starts 3-5 days after wounding, predominantly involves the formation of granulation tissue, angiogenesis and epithelialization. Fibroblast cells migrate and synthesize new extracellular matrix consisting of type I and type III collagen, hyaluronan, fibronectin and proteoglycan (31). These form an amorphous, gel-like connective tissue matrix necessary for cell migration and increase integrity of newly forming skin. Endothelial cells initiate an angiogenic process to form new capillary vessels participated in granulation tissue formation along with nutrition and oxygen supply for growing tissues. Several growth factors have been shown to play important roles in angiogenesis, including VEGF, angiopoietins, FGF, and TGF- $\beta$  (31, 33). Keratinocytes proliferate and migrate from wound edges to cover the wound surface stimulating by Epidermal Growth Factor (EGF), Keratinocyte Growth Factor (KGF), and TGF- $\alpha$  (33). Moreover, fibroblasts are gradually changed into myofibroblasts which are the main mediators for wound contraction in the remodeling phase.

As soon as the new tissue is formed, the remodeling phase starts to reorganize structural integrity and functional potential of the skin. This final phase controls the balance between synthesis and breakdown of collagen by the coactions of Matrix Metalloproteinases (MMPs) and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases (TIMPs) family



(37) to optimize collagen alignment. As the wound heals, the remaining cells are further eliminated by apoptosis, blood flow to the wound area reduces and metabolic activity at the wound site decreases. Finally, new skin tissue obtains approximately 80% of the strength of intact tissue. This step may be prolonged up to 2 years or even more (31).

These 4 phases are working orderly and timely together with complex interactions of various cell types, molecular mediators and structural elements until the wound is completely healed. There are many factors or stimuli that influence wound healing process in one way or another. These factors can be considered as local and systemic factors as shown in Table 1. It is important to understand these factors so that they can be managed optimally as parts of an overall strategy to help complete wound repair.

Table 1: Factors influencing wound healing process.

Local factors	Systemic factors
Wound characteristics	Intrinsic factors
- Size, depth and location	- Patients' age and body weight
Blood and oxygen supply	- Underlying disease
Infection	- Stress
	Extrinsic factors
	- Drugs, alcoholism and smoking
	- Nutrition

Local factors mean the parameters that directly come from the wound characteristics itself. Size, depth and location of wound that indicate severity of injury influence the healing rate. Large damage tissue induces blood loss and delays the re-epithelialization process due to more capillary vessels opening and higher distance between wound edges for keratinocyte migration than small wound. The depth of the wound also has an effect on time to heal which connects to the risk of hypertrophic scar

development. The degree of wound contraction varies with the depth of the wound. In partial-thickness wound, a wound included the epidermis and some parts of dermis, contraction is less important in direct proportion to their depth. On the other hand, wound contraction mostly occur in full-thickness wound which contraction is a main process accounting for up to a 40% decrease in the size of the wound (33). Wound healing process is also affected by location of the defect. Wounds occurring on bony prominences, on areas of decreased vascularity and in areas with fewer epidermal appendages tend to be slow to heal (38). Blood supply also plays an important role in wound healing process due to its functions as nutrient and oxygen reserves. Cell proliferations and activities during wound healing process have high energy and oxygen consumption. Once the skin is damaged concomitant with vascular disruption, the microenvironment around injured area is quite hypoxia which induce growth factors and cytokine production from macrophages, fibroblasts and keratinocytes such as PDGF, TGF- $\beta$ , VEGF, TNF- $\alpha$  and endothelin-1 (39). Therefore, short-term hypoxia after injury stimulates wound healing but chronic hypoxia has negative effect through prolong inflammatory phase, retard re-epithelialization and extracellular matrix production. Moreover, risk of infection also increases when skin surface is broken leading micro-organism invasion. If decontamination process is ineffective in microbial clearance, prolonged inflammatory response as a result of elevation of pro-inflammatory cytokine such as IL-1, IL-6 and TNF- $\alpha$  will occur (40) and consequently impaired healing process.

Systemic factors can be divided into 2 parts; intrinsic and extrinsic factors. Intrinsic factors are the factors that directly depend on patients' demographic data such as age, body weight, underlying disease and physiological stress while extrinsic factors come from external exposures such as medications, alcohol, smoking and nutritional uptake. Elderly patients whose age over 65 years showed decreased rates of healing compared to younger patients because of inflammatory response alteration, delayed re-epithelialization, delayed angiogenesis and collagen deposition (41, 42). Overweight or

obese patients are likely to have pressure-related injuries and infections as a result of skin hypoperfusion, impaired immune response and difficulty of antibiotics delivery through blood supply (43). In addition, aging and obesity are associated with anxiety, depression and stress which can cause many diseases and health conditions. Underlying diseases, especially diabetes, have been obviously reported that impaired wound healing by many mechanisms. Hyperglycemia causes oxidative stress, fibroblasts and epithelial cells dysfunction, impaired angiogenesis, high MMPs level for collagen breakdown and decreased immune resistance which eventually contributes to physiological stress, infection and chronic wound development (44). Stress disrupts neuroendocrine immune equilibrium through the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and sympathetic nervous system. It induces glucocorticoids production and reduces the levels of the pro-inflammatory cytokines; IL-1, IL-6, and IL-8 and TNF- $\alpha$  at the trauma areas which are important for the initial phase of wound healing (45).

Together with intrinsic factors, extrinsic factors on wound healing process including medications, alcohol, smoking and nutritional uptake are taken into account. Many medications potentially interfere wound healing, for example, corticosteroids which suppress cellular proliferation, granulation tissue formation and collagen synthesis and chemotherapeutic drugs which inhibit all cellular division and reduce immune functions of the patients (46). If it is possible, these drugs should be discontinued to recover normal healing process; otherwise, wound may be repeated and become chronic. Social history of the patients is also considered as risk factors of wound healing impairment. Alcohol intake and cigarette smoking increase oxidative stress, induce MMPs activity, enhance patient susceptibility to infections and impair angiogenesis (47, 48). Prolonged alcohol consumption and smoking enhance malnutrition and vitamin depletion due to unhealthy eating habits. Wound healing depends on patient's nutritional status especially adequate calories, protein and micronutrients which are needed at every step of the healing process. There are studies reported that specific amino acids; glutamine and arginine, polyunsaturated fatty acid,

vitamin A, vitamin C, and zinc play an important role in wound healing, and their deficiencies can cause impaired skin recovery process (49, 50).

### 2.3 Skin grafts

A skin graft is one of the surgical procedures to repair losses or aesthetic correction of skin tissues by transferring of a section of healthy skin (donor site) to replace the damaged tissue in specific area needed to be recovered (recipient site) (1). When the wounds occur without the possibility of spontaneous healing or direct tissue primary closure, skin grafts are generally considered for treatment. The features of skin grafts vary in source, size, thickness, and location of the skin chosen to be harvested. According to the sources of the explants, skin grafts are classified into 3 types; autograft, allograft, and xenograft (1, 2). Autograft is called when the donor and recipient site are in the same patient. This graft exhibits high graft take rate and well skin compatibility. However, in patient whose normal skin for donor site is limited, such as extensive burns exceed 50–60% of the total body surface area, or in patient who has severe co-morbid disease improper to undergo any surgical procedure, allograft or xenograft are mainly indicated. Allograft is the graft which the donor and recipient site are in different subjects. It can be harvested from a cadaver or can originate from skin removed during surgical interventions or from donors usually related to the recipient patient. Xenograft comes from animals whose skin has a structural affinity with human such as porcine skin. However, both allograft and xenograft can cause immunological response and exhibit higher rate of graft rejection than autograft (51). The disease transmission is also mentioned to be concerned before using allograft and xenograft transplants.

Skin grafts are also divided on the basis of thickness into split thickness and full thickness as shown in Figure 3. STSG includes the epidermis and different amounts of dermis. With regard to the thickness, STSG is further divided into thin (0.15-0.3 mm),

intermediate (0.3-0.45 mm), and thick (0.45-0.6 mm) while Full Thickness Skin Graft (FTSG) involves all dermis or deeper tissue which are usually thicker than 0.6 mm (1). The thicker of the skin graft, the greater durability with the better cosmetic result but slower donor site healing and higher rate of graft rejection.

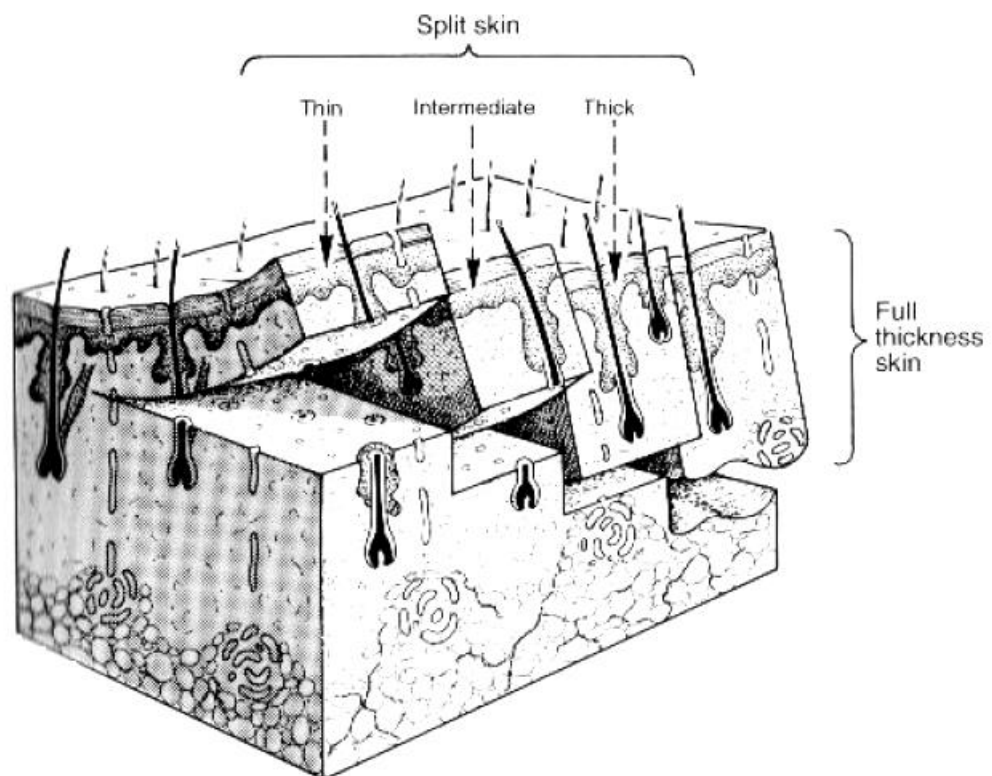


Figure 3: Classification of skin grafts by thickness (52).

STSG is usually used to repair skin loss in anatomically critical zones or large area of the body such as burn, extensive trauma, or wound caused by tumor resection. It can be meshed to obtain greater surface coverage, irregular surface adherence and fluid drainage from beneath the graft. However, donor site for STSG lacks the entire epidermis and variable depth of dermis which is painful and causes a large amount of blood loss because of the opening of blood vessel and sensory nerve to the environment. Donor site is also highly possible to get wound contraction, scar, or depigmentation postoperatively. Therefore, in case of aesthetic surgical procedure

involved small area of the skin or concernment of tissue texture matching appearance, FTSG is mainly chosen with its better cosmetic results (1, 2, 53).

The factors needed to consider about the location for skin graft donor site include size or depth of the recipient area, skin quality requirement (color, hairs, and possibility of resensibilization) and potential morbidity for the patient to ambulate, sit, and sleep. STSG donor site can be selected from varied parts of the body; for example, scalp, abdomen, thigh, buttock and instep (2). Donor sites for skin grafts should be also well hidden, if it is possible, because skin discoloration or scar may be occurred. Adequate STSG donor site management plays an important role to minimize postoperative wound healing problems and offer rapid rehabilitations. Normally, donor site is able to heal spontaneously by re-epithelialization and the skin graft can be re-harvested from the same area after 2 months later (54, 55). However, the quality of the skin being re-harvested remains decrease.

The characteristics of wound at recipient site and clinical status influence types of skin grafts chosen. Medical providers have to seriously concern that the benefits at the recipient site must outweigh the donor site defect. Moreover, the patients should be educated about the necessity of skin graft procedure to treat their wounds and the expected result of the treatment for patient wound care cooperation and optimum treatment outcome.

#### **2.4 Wound dressing for split-thickness skin graft donor site treatment**

Considering which types of dressing is appropriate for each wound depends on cause, size, depth, location, degree of exudation and level of contamination. The features of wound; for example, STSG donor site causes higher amount of fluid loss, more pain and discomfort to the patient than FTSG because the former usually covers large area of skin tissue and allows more surface of blood vessels and nerves under the

skin exposing to the environment whereas the latter has smaller size result in being able to close primarily after harvesting. In addition, patient acceptance and affordability to the expenses after treatment should be concerned. The characteristics of the ideal dressing for STSG donor sites are the ability to provide the optimum environment for skin re-epithelialization, maintenance moist condition above wound bed, ability to absorb and contain exudates without leakage, wound protection from mechanical trauma and exogenous contamination, being easily applicable without trauma on dressing removal and economical in cost (3, 56). Currently, there is no available dressing containing all those features; therefore, it is a challenge to generate a new dressing material with better properties closer to those of ideal dressing.

Common treatments used for STSG donor site are categorized as open, semi-open, and closed treatment (11). With open treatment, the donor site remains exposed to the environment without coverage. Even though this technique raises definitely lowest cost, it is often painful with highest risk of infection and associated with extended healing time. Now, there are available only 2 treatment techniques, semi-open and closed, which are commonly used in surgical wound care (57, 58). With semi-open treatment, wound is covered with a mesh dressing which allows some parts of wound bed exposed to the air while the closed treatment means a wound dressing is applied on the donor site and left intact for several days to create the occlusive condition on wound surface. The dressings used for semi-open treatment are fine mesh gauze or tulle gras such as Bactigras<sup>®</sup> (Smith&Nephew, UK), Jelonet<sup>®</sup> (Smith&Nephew, UK), Sofra-tulle<sup>®</sup> (Hoechst Marion Roussel Ltd, UK) and Scarlet red<sup>®</sup> (Kendall<sup>™</sup>, USA) etc. The examples of commercial occlusive dressing used in closed treatment are films or membranes, hydrocolloids, alginates, hydrofibers, polyurethane foams and silicone dressings. Summary of types and properties of the commercial wound dressing products are shown in Table 2.

Table 2: Summary of commercial wound dressing types and properties (32, 56, 59-62).

Types of wound dressing	Transparency	Self-adhesive	Absorbent capacity	Gas and water vapor permeability	Other characteristics	Trade name
Mesh gauze	No	Yes/No	No	Yes	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Need secondary absorbent layer</li> <li>- Some are impregnated with antimicrobial agent</li> <li>- Relatively inexpensive</li> </ul>	Bactigras <sup>®</sup> Adaptic <sup>®</sup> Jelonet <sup>®</sup> Scarlet-red <sup>®</sup> Sofra-tulle <sup>®</sup> Xeroform <sup>®</sup>
Film	Yes	Yes/No	No	Yes	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Allow wound inspection for direct assessment</li> <li>- Contraindicate to medium-highly exudative wound</li> </ul>	Opsite <sup>®</sup> Tegaderm <sup>®</sup>
Hydrocolloid	No	Yes	Low to moderate	Yes	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Provide autolytic property</li> <li>- Manufactured in many shapes, sizes</li> <li>- Beware of wound maceration</li> </ul>	Comfeel <sup>®</sup> DuoDERM <sup>®</sup> Urgotul <sup>®</sup>
Alginate	No	No	High	Yes	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Provide hemostatic and autolytic properties</li> <li>- Gel odor or texture may be confused with infection</li> </ul>	Algisite <sup>®</sup> Curasorb <sup>®</sup> Kaltostat <sup>®</sup> Sorbsan <sup>®</sup> Urgosorb <sup>®</sup>



Table 2: Summary of commercial wound dressing types and properties (continue).

(32, 56, 59-62)

Types of wound dressing	Transparency	Self-adhesive	Absorbent capacity	Gas and water vapor permeability	Other characteristics	Trade name
Hydrofiber	No	No	High	Yes	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Allow packing into wounds</li> <li>- Provide autolytic property</li> <li>- Contraindicate to dry wound</li> </ul>	Aquacel®
Hydrogel	No	Yes	Low	Yes	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Provide autolytic property</li> <li>- Indicate to dry, necrotic or sloughy wound</li> <li>- Need secondary protective layer</li> </ul>	Intrasite®
Foam	No	No	High	Yes	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Provide thermal insulation and cushioning effect to wound</li> <li>- Require tape to adhere dressing on wound</li> <li>- Contraindicate to dry wound</li> </ul>	Allevyn® Askina® Lyofoam®
Silicone dressing	No	Yes	No	Yes	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Need secondary absorbent layer</li> </ul>	Mepitel® Mepilex®

Each type of dressing has its own advantages and disadvantages so it is important to match the different wounds to appropriate dressing. The wound care techniques of semi-open and closed treatment are also different which can be concluded as following described. After harvesting donor site, semi-open technique commonly uses fine mesh gauze as a primary wound contact layer. This type of dressing allows the airflow and drains the exudates to the secondary absorbent dressings. In the case of fluid leakage or excessive discharge, the secondary dressings are removed and replaced by new sterile absorbent dressing to avoid infection and wound edge maceration. It is important that the first-applied dressing should stay intact on wound as long as possible to minimize healing process disruption because dressing removal often results in considerable pain and damage the new epithelium. The fine mesh gauze should only be removed earlier if wound shows any signs of infection. In closed treatment, occlusive dressing maintains moist on wound surface which takes part in wound healing promotion, pain or mechanical damage reduction. Polyurethane foam, alginates, or hydrofibers also have highly absorptive capacity which can manage moderately to heavily exuding wound and reduce dressing removal frequency. However, due to their high cost, it is unlikely that these dressings can be afforded by many patients who have economical limitation (58, 60).

A fine mesh gauze impregnated with paraffin and 0.5% chlorhexidine acetate (Bactigras<sup>®</sup>) is one of the semi-open dressing widely used as a STSG donor site coverage (63). Therefore, wound care treated by this dressing is similar to semi-open treatment technique as mentioned above. The major disadvantages of Bactigras<sup>®</sup> are not only wound adherence leading to damage epithelial cells during dressing removal, but also cause pain and discomfort to the patients (64). However, wounds treated with this dressing has low infection rate with acceptable outcomes and cost-effectiveness compared to other types of dressings (60). Consequently, Bactigras<sup>®</sup> is currently considered as a standard dressing for STSG donor sites and further new formulated

wound dressings should be conducted the experiment by comparing to this paraffin mesh gauze (64-66).

## 2.5 Silk Sericin

Silk sericin is a natural protein obtained during the degumming process of silk cocoon in silk fabrication industry. Silk cocoons comprise of 2 protein components; 25-30% sericin and 70-75% fibroin. Sericin functions as adhesive that glues fibroin fibers together to form robust silk cocoon (16, 67). Its secondary structure exists in amorphous random coil when dissolves in hot water and converts to  $\beta$ -sheet organized structure in low temperature resulting in gel formation. This gel is easily dissolved at 50-60°C and then return to gel again by cooling effect which represented sol-gel transition property of sericin (68).

Silk sericin consists of many hydrophilic amino acids whose molecular weights fall between 10-400 kDa. Amino acid compositions mainly found in silk sericin are serine (33.4%) and aspartic acid (16.7%) (69, 70). However, molecular weight and amount of amino acid compositions of extracted sericin are different with regard to degumming methods as indicated in the study by Aramwit *et al.* (71). This study investigated 4 degumming methods; heat under pressure, acid, base, or urea solution on the properties of extracted sericin. Silk sericin extracted by heat under pressure composed of moderate molecular weight ranging from 25-150 kDa with the highest amounts of methionine compared to other extraction methods. Methionine is an amino acid essential in collagen production which is a part of wound healing. Silk sericin extracted by heat under pressure also stimulated proliferation and attachment of mouse fibroblast cells and promoted collagen synthesis from those cells effectively. Naturally, collagen is a major component of connective tissue in dermis and subcutaneous layer of human skin which is mainly contributed to wound healing aggravation and new epithelial tissue

strengthening. In recent year, there are several studies found that silk sericin may have potential to stimulate wound healing process *in vitro*, *in vivo*, and in clinical practice.

In 2005, Tsubouchi *et al.* (72) investigated the effect of silk sericin at the concentrations of 0.25, 2.5, and 25  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  on human skin fibroblast attachment and proliferation. The result showed that 2.5 and 25  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  sericin coating on polystyrene dishes promoted cell proliferation up to 250 times within 72 hours cultivation compared to control (no sericin coat). Moreover, those 3 concentrations of sericin exhibited increase of collagen synthesis 250-300 times above control group. Phase contrast microscopic images indicated that cells growing on sericin coating dished exhibited a well-spread fibrous shape, while those growing on no sericin coating dishes exhibited round shape. This result conformed to what found in the study by Terada *et al.* (18) in the same year. This experiment added 0.1% sericin solution in tissue culture media and found that silk sericin promoted human skin fibroblast proliferation better than Bovine Serum Albumin (BSA) of which this study used as a control.

The molecular mechanism by which silk sericin stimulates cell proliferation and collagen synthesis are still unknown. However, the success of silk sericin in skin tissue culture leads to interest in its use as a natural biomaterial for wound dressing. In 2005 and 2008, Teramoto *et al.* continuously conducted the experiment about ethanol-induced silk sericin hydrogel and gel film formulated for wound dressing (73, 74). Sericin hydrogels and gel films can be formed by ethanol addition to sericin solution to induce  $\beta$ -sheet structure formation. The resulting gel film exhibited rapid water absorption and mechanical stability against swelling in water. When it wet, this gel film showed more flexible and larger elongation, up to approximately 400%, than dry state. Fibroblast cell adhesion and growth on silk sericin gel film in day 7 was also comparable to that in cell culture dish which inferred that silk sericin gel film had no cytotoxicity.

In 2007, Aramwit *et al.* formulated cream containing 8% silk sericin and investigate the effects on wound healing in rats (20). After getting 2 full-thickness skin wounds on dorsum, rats were divided into 2 groups; group 1 comparing between 8% sericin cream and a 10% povidone-iodine solution (Betadine<sup>®</sup>) while group 2 comparing between 8% sericin cream and cream base (cream without sericin). All wounds were cleaned daily with normal saline solution and each assigned samples were applied on wound after cleaning. Wound surfaces were observed daily for wound size measurement and any possible signs of skin irritation. The results found that wounds treated with sericin cream showed significantly higher percent of wound-size reduction than wounds treated with cream base ( $p < 0.01$ ) whereas there was no significant difference as compared to wounds treated with Betadine<sup>®</sup>. Mean time taken for complete wound healing in wounds treated with sericin cream, Betadine<sup>®</sup>, and cream base are 11, 12, and 15 days, respectively with no allergic reaction in all groups. Regarding the histological examination, wounds treated with sericin cream exhibited an increase in collagen components and complete healing with no ulceration which obviously differed to wounds treated with the others. In 2009, same researchers studied the effect of silk sericin solution and 8% sericin cream on induction of pro-inflammatory cytokines, IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ , in cell lines and in animals (21). These cytokines are involved in macrophage and lymphocyte functions which play an important role in the immune system of the body. The results showed that silk sericin solution at the concentrations of 0.2-1.0 mg/mL had no cytotoxicity on fibroblast cells. At day 7 of the experiment, IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  levels in skin samples of wounds treated with sericin cream fell under toxic levels and lower than wounds treated with cream base or normal saline solution. It is consistent with the study by Panilaitis *et al.* in 2003 which indicated that extracted sericin solution were immunological inert to macrophage cell cultures (75). All results from these previous studies suggest that silk sericin has wound healing potential without causing inflammatory reaction.

Further investigations substantially emphasize the use of silk sericin in clinical level during the recent years. In 2010, Namviriyachote *et al.* reported a case study of 14-year old boy with partial thickness burn wound treated with silver zinc sulfadiazine cream containing silk sericin (76). There was complete recovery of skin wound after 14 days of the treatment with no sign of infection or skin irritation. In 2011, Palapinyo *et al.* conducted double-blinded clinical study to evaluate the efficacy and safety of silver zinc sulfadiazine cream with silk sericin compared to silver zinc sulfadiazine cream without silk sericin, as a control, in 34 partial thickness burn wounds (22, 77). Sericin-treated wounds effectively promoted epithelialization with no infection and adverse reaction. Pain score assessed by patients themselves were also comparable between both groups. However, topical preparation as cream proper only in superficial wound with little exudate, has no protective property from mechanical trauma and requires at least daily wound care from health care providers. Amount of cream applied on wounds each time of dressing changes, in addition, may be inconsistent.

According to disadvantages of cream preparation, a newly silk sericin-based wound dressing was formulated. Tao *et al.* in 2005 have tried to prepare porous materials from sericin solution by freezing the sericin solution and then drying under negative pressure which called freeze-drying process (78). Smaller pore size and higher pore density were observed with lower freezing temperature or higher sericin concentration due to lack of ice crystals forming time and restriction of water movement. However this material from sericin alone was very fragile and unable to be handle which was not suitable for use in medical applications. The further experiments were required to obtain the silk sericin-based wound dressing with better physical and biological properties.

Polyvinyl Alcohol (PVA), a commonly used synthetic polymer, and glycerin, a plasticizer, were introduced to blend with sericin solution to form a three dimensional porous scaffold with strong and stable structure (79). The silk sericin-PVA scaffold was

flexible and can absorb moisture efficiently between 500-700 times compared to its dry weight. Nevertheless, this scaffold was unable to maintain its structure and broke into pieces after immersing in water for 24 hours which inferred that it was improper to be practically used as a wound dressing.

A stabilization process which is believed to improve the properties of biomaterials was selected to create better integrity of silk sericin-PVA scaffold. Both chemical crosslinking and physical stabilization process were applied. Blending with genipin, a naturally crosslinking agent extract from gardenia fruit, can form the silk sericin-PVA scaffold with uniform pore size, stable structures with good compressive strength, high swell property and desired level of sericin release (79). The genipin-crosslinked silk sericin-PVA scaffolds also promoted the attachment and proliferation of fibroblasts and accelerated healing of full-thickness wounds in rat with lower amounts of macrophages and multinucleated giant cells (80). However, dark-blue color residue which can stain the skin and obscure wound inspection was only an obvious disadvantage of this genipin-crosslinked silk sericin-PVA scaffold. Therefore, stabilization method by ethanol immersion is further investigated. The result showed that ethanol-precipitated silk sericin-PVA scaffold (called wound dressing containing silk sericin or silk sericin dressing) exhibits more integrity and stable which made it easier to apply on wound without skin staining (25). However, ethanol cannot be also applied for sterilizing agent since the ethanol-treated scaffold produced signs of bacterial growth after 24 hours incubation in tryptic soy broth (24). Therefore, the scaffold should be sterilized by other methods such as gamma irradiation, the most appropriate procedure for silk sericin-based scaffold sterilization, prior to use in clinical practice. Recently, *in vivo* study of the efficacy and safety of silk sericin dressing on full thickness skin wounds in rats showed that wound treated with silk sericin dressing (or silk sericin-PVA scaffold stabilized by ethanol) can be noticed the skin re-epithelialization on day 3 and wounds are completely closed within day 14 whereas wounds treated with the dressing without silk sericin spends more time, up to 21 days, to complete healing (25). The higher extent

of type III collagen, percentage of epithelialization and healing scores were also found in the wounds treated with silk sericin dressing than those of the control scaffolds without sericin. There is no significant sign of infection and skin irritation in both groups as observed in visual field and histological examination (25).

According to the literature reviews about the benefits of silk sericin in wound healing acceleration and the results of the recent study of a new developed dressing, the purpose of this study is to evaluate the safety profile of silk sericin dressing in healthy volunteers by assessment of changes in skin colors both erythema and melanin values of the skin after silk sericin dressing contact using patch test and investigate the clinical efficacy of this dressing for STSG donor site treatment compared to Bactigras<sup>®</sup> which is the standard commercial available dressing for donor site therapy at King Chulalongkorn Memorial Hospital. The time for complete re-epithelialization, rate of infection, and pain evaluation as well as the adverse events which may occur are evaluated. Systemic pro-inflammatory cytokines patterns of the patients and cells attached to wound dressing characteristics are also investigated. This study will give further important information on clinical safety and efficacy profiles of silk sericin dressing to be used as a dressing of choice for patients undergoing STSG as well as other open-wounded instead of current expensive commercial wound dressing.



## CHAPTER III

### RESEARCH METHODOLOGY

#### 3.1 Phase I preliminary study for safety of the silk sericin dressing in healthy volunteers

This prospective, randomize-controlled match pair study was conducted to determine the safety profiles of silk sericin dressing compared to commercial wound dressing (Bactigras<sup>®</sup>) from April 2011 to January 2012 at the Department of Pharmacy Practice, Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, and Police General Hospital, Bangkok, Thailand.

##### Study samples

Thai healthy volunteers were selected for skin irritation testing. The study protocol was reviewed and approved by the institutional review board of Police General Hospital (Approval number 30/2554 on 8 April 2011, Appendix A). Adequate explanation of the objectives, methods, and potential harms of the intervention was given to each individual and written inform consent was obtained. One hundred and twelve subjects fulfilled the following criteria were recruited in this study. The criteria for enrollment included:

##### *Inclusion criteria:*

1. Age 18-65 years old
2. Be healthy, normal physical and mental status
3. Be able to follow the study procedure and visit the investigator in every appointment
4. Agree to be included into study by signing the consent form

***Exclusion criteria:***

1. Any skin diseases such as psoriasis, infectious skin diseases
2. Immunodeficiency diseases
3. Use concomitant drugs as followed; immunosuppressants, oral and topical antihistamines, oral and topical steroids in a week prior to be enrolled in the study
4. Known allergy or hypersensitivity reaction to silk sericin or chlorhexidine acetate
5. Not follow time schedule of the appointment
6. Pregnancy or lactation

**Sample size determination**

Sample size was based on a review of critical factors in the conduct and interpretation of the human patch test of McNamee *et al.* in 2008 (81). It recommended that sample size for testing any transdermal delivery device or dressing should be at least 100 healthy volunteers who take parts in a complete study. This amount of volunteers had 0.99 of probability to find any skin adverse effects which likely had an incidence equal to 5 percent in target population. Moreover, Henderson and Riley investigated statistical calculations of patch tests adapted for detection and evaluation of chemical agents (82). If no reaction was observed in a group of 100 test subjects, then the rate of positive reactions in a larger population is not likely to exceed 2.9%, based on a confidence level of 95%, under identical conditions. The drop-out rate was defined as 10 percent of subjects; therefore, sample size should be at least 112 healthy volunteers.

**Study interventions**

Silk sericin dressing is a scaffold fabricated by silk sericin-PVA-glycerin blending, stabilized by 70% ethanol immersion and sterilized by gamma irradiation before use. To test the quality between each batch, the resultant dressings are randomly

selected to measure the amount of protein released for 3 days. The variation between batches should not be higher than 7%. The stability test to find its shelf life is shown in Appendix B. Bactigras<sup>®</sup> is a fine mesh gauze impregnated with paraffin and 0.5% chlorhexidine acetate (Smith&Nephew, UK) and used as a standard treatment for skin graft donor site according to the protocol of King Chulalornkorn Memorial Hospital.



Figure 4: Silk sericin dressing



Figure 5: Bactigras<sup>®</sup>

Randomization

All eligible healthy volunteers were applied both silk sericin dressing and Bactigras<sup>®</sup>. Left or right areas at the back skin were randomly allocated for applying silk sericin dressing by block randomization using block size equals to 4 following by simple randomization to choose an order of randomized scheme. Another side of the back skin is then automatically applied with Bactigras<sup>®</sup>.

### Study procedures

After signing consent forms, demographic data were recorded from all eligible volunteers. Back areas were chosen from every subject to provide enough area to apply silk sericin dressing and Bactigras<sup>®</sup> at the same time. The left and right areas on the back were randomly allocated for silk sericin dressing or Bactigras<sup>®</sup> attachment. All eligible participants acclimatized in a room with the temperature of  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$  and  $50\pm 5\%$  relative humidity for approximately 10 minutes then baseline characteristics of skin at the back were observed. Skin colors both redness (erythema) and darkness (melanin) were measured by a Mexameter MX18<sup>®</sup> (Courage + Khazaka electronic GmbH, Germany). The instrument calibration was checked before each measurement session to ensure it was within the manufacturer's limits. Photos of the skin were taken from both areas for skin irritation evaluated by 3 clinical dermatologists. Information obtained from the subjects was recorded in case record form as shown in Appendix C.

On the first visit, silk sericin dressing or Bactigras<sup>®</sup>, in the size of  $4\times 4\text{ cm}^2$ , were applied on assigned back areas. Both dressings were then covered by gauze together with retentive tapes and left for 3 days. If the dressings removed prior the assigned time, the participant were instructed to visit the investigator as soon as possible to apply new dressings and continue the study. This process was done in 2 cycles which called the induction phase. Seven to ten days after application of the last induction patch, single challenge dressings (both study and control dressings) were repeat applied on the

same areas and left for another 3 days. This latter process was called the challenge phase.

In every visit, erythema and melanin levels as well as photos of the back area were taken within 30 minutes after dressings were removed. The volunteers were also interviewed by the investigator for details of any skin irritation perceived. All skin photos taken were separately evaluated for any visual skin irritation using the HRIPT scale by 3 independent clinical dermatologists who are unknown which interventions given. At the end of this phase, all study information from participants who complied with entire study procedure was carefully gathered for per-protocol analysis and interpretation.

#### **Outcome measurements**

- Changes in skin colors both erythema and melanin values of the back skin contacted to the test samples
- HRIPT score of the test area separately evaluated by 3 dermatologists
- Any skin irritation perceived by the participants

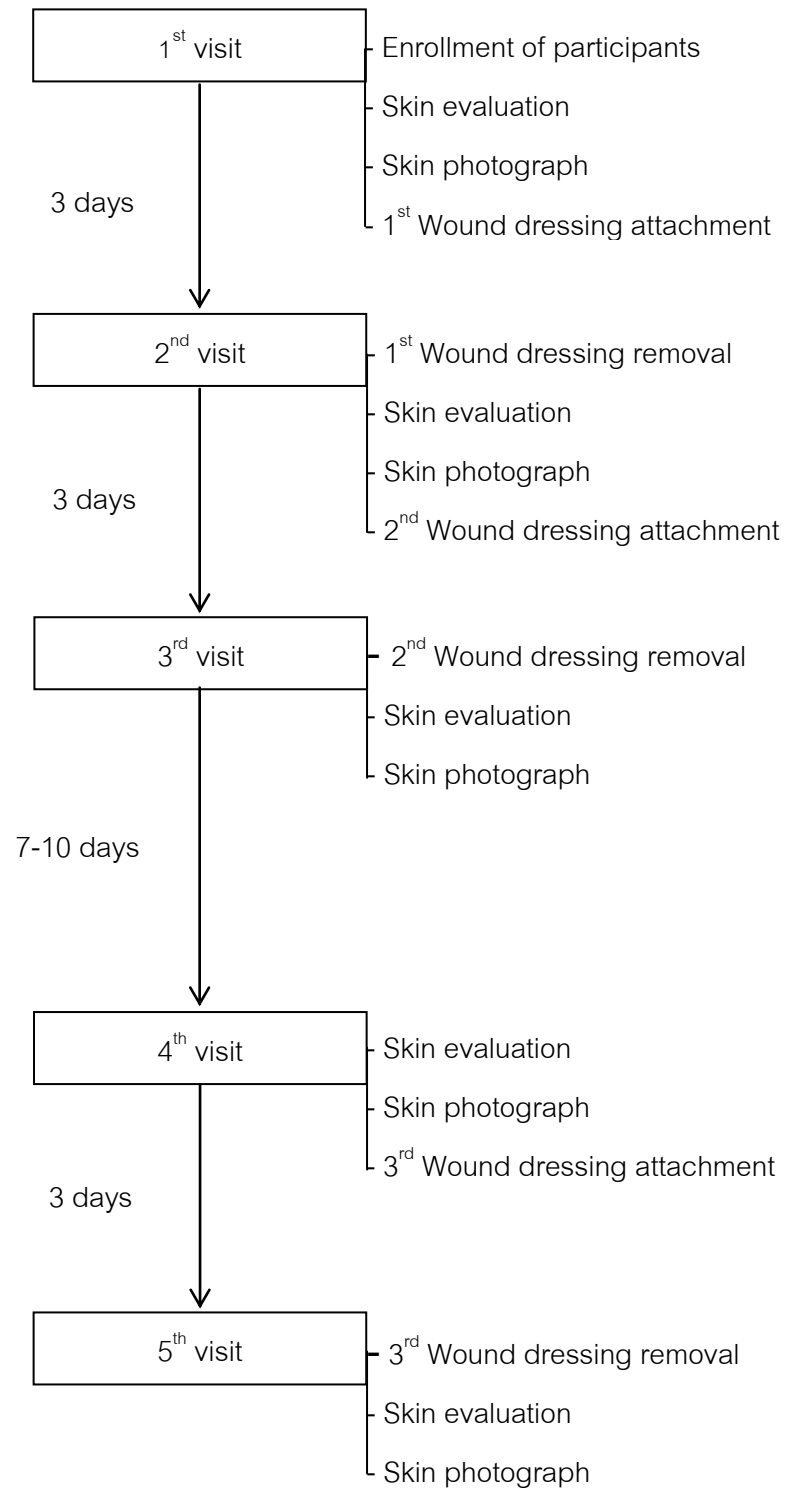


Figure 6: Diagram of phase I experiment at every visit of healthy volunteers

### 3.2 Phase II clinical efficacy of silk sericin dressing in patients with STSG donor site

This prospective, randomized-controlled match pair study was conducted to determine the efficacy and safety of silk sericin dressing for the treatment of STSG donor site compared with Bactigras<sup>®</sup>; a standard treatment, from March to December 2012 at the Division of Plastic and Reconstructive Surgery, Department of Surgery, King Chulalongkorn Memorial Hospital, Bangkok, Thailand.

#### Study samples

STSG donor sites which were carried out at Division of Plastic and Reconstructive Surgery, King Chulalongkorn Memorial Hospital, Bangkok, Thailand were recruited for this clinical trial. The study protocol was reviewed and approved by the institutional review board of King Chulalongkorn Memorial Hospital (Approval number 4/55 on 23 February 2012, Appendix D, Clinical Trial Registration Number NCT01539980 title Clinical study on silk sericin wound dressing for split-thickness skin graft donor sites treatment). Adequate explanation of the objectives, methods, and potential harms of the intervention was given to the patients and written informed consent was obtained. Twenty eight subjects with 30 donor sites fulfilled the following criteria were included in this phase. The criteria for enrollment included:

#### *Inclusion criteria:*

1. Patients who required STSG such as burn, trauma patients etc.
2. Patients whom surgeons assessed that ready for undergoing STSG
3. Patients must have sufficient normal skin at thigh area for 1 or more STSG donor sites
4. The thickness of donor sites fell between 0.15-0.45 mm (0.006-0.018 inches) and their sizes were at least 50 cm<sup>2</sup>
5. Age 18-65 years old
6. Agree to be included into study by signing the consent form

**Exclusion criteria:**

1. Use other areas for STSG donor sites instead of thigh
2. Donor sites were located at high risk of infection such as harvesting closed to current infective wound (excessive purulent discharge or bad odor)
3. Patients who were immunocompromised or mental defect
4. Patients who were not be able to or not willing to comply with the study protocol
5. Known allergy or hypersensitivity reaction to silk sericin or chlorhexidine acetate
6. Pregnancy or lactation

**Sample size determination:**

This study investigates 2 dependent samples to compare the time taken for complete epithalization between silk sericin dressing group and control (Bactigras<sup>®</sup>) group. The sample size calculating formula as followed;

$$N = \frac{\left( Z_{\alpha} + Z_{\beta} \right)^2 S_p^2}{D^2}$$

The study of Angspatt *et al.* in 2011 compared the treatment effect for partial-thickness skin grafts between carboxymethylchitosan and Bactigras<sup>®</sup> in 44 patients (66). Mean times taken for complete healing of donor sites treated with carboxymethylchitosan and Bactigras<sup>®</sup> were  $11.32 \pm 2.55$  and  $15.03 \pm 2.93$  days, respectively ( $p < 0.001$ ).

Define; confidence level = 95% ( $\alpha = 0.05$ )

power of the study = 90% ( $\beta = 0.1$ )

$$Z_{\alpha} = 1.96$$

$$Z_{\beta} = 1.28$$



N = Sample size needed

$S_p^2$  = Pooled variance

D = Effect size; difference in time taken for complete healing of

STSG donor site treated with two types of dressing was determined as 2 days.

According to data obtained from the study of Angspatt *et al.*

Pooled variance;

$$S_p^2 = \frac{S_1^2 + S_2^2}{2} = \frac{2.55^2 + 2.93^2}{2} = 7.5437$$

Sample size;

$$N = \frac{\left( Z_\alpha + Z_\beta \right)^2 S_p^2}{D^2}$$

$$= \frac{(1.96 + 1.28)^2 \times 7.5437}{2^2}$$

$$= 19.78 \approx 20 \text{ donor sites}$$

Defined 30% drop out rate

$$N = \frac{20}{1-0.3} = 30 \text{ donor sites}$$

Therefore, STSG donor sites needed for this study were at least 30 donor sites.

### Randomization

STSG donor sites that meet all eligibility criteria were equally divided into two parts. The cephalic half and caudal half were defined as A and B, respectively. A side is

randomized to treat with silk sericin dressing by simple randomization. Randomization is performed by using a random number table; odds equal to A and evens equal to B. The other side is then automatically treated with Bactigras<sup>®</sup>.

### Study procedures

All eligible patients were explained thoroughly about study's objectives, methodology and possibilities of risk, patients agreed to be included in the study signed in the informed consent. Patients' demographic data and physical examination at the beginning of the study were recorded. Indication of STSG use and treatment-related details as well as medications ordered to the patients was also recorded in case record form as shown in Appendix E.

Harvesting of skin grafts was performed by the same standardized procedure to all patients. After the patients were administered general anesthesia, skin preparation for STSG donor site was done by scrubbing with 10% povidone iodine followed by 5% chlorhexidine gluconate solution. All antiseptic residues were washed off with sterile normal saline solution and left skin to dry for a short period of time. With the help of castor oil lubrication, STSG was harvested at thigh area by a powerized dermatome (Zimmer<sup>®</sup> Ltd, UK) and used to cover patients' defects directly or meshing. After harvesting the graft, a wound occurred at donor site was covered with adrenaline soaked gauze for a few minutes to stop bleeding. Half of the donor site was randomly treated with silk sericin dressing and the other half was then treated with Bactigras<sup>®</sup>. The photos of donor site were also taken before and after dressing application together with ruler scale for wound dimension measurement. The secondary absorbent gauze and elastic bandages were then tightly applied to the wound to protect it from external shear force. Two days later, the top absorbent layers and bandage were gently removed leaving the primary dressing in place to prevent wound damages. No further dressing changed and leaving the donor sites immobilized as long as possible unless there was

excessive fluid leakage or any signs of infection. Additional multiple absorbent gauzes were required if there was excessive exudates which could be seen easily on fluid oozing gauzes and leakage to the top layer. In case of signs of infection, which determined as clinical examination together with wound or wound edge discoloration, edema, redness, inflammation, offensive odor, excessive exudates, extremely intolerable pain at wound area or wound tissue necrosis appearance, surgeon must consider taking out all dressings and covered both sides of donor areas by Bactigras<sup>®</sup>. A wound swab at the suspected site was performed by surgeons for microbial identification. Then, this donor site will be reported as an infected wound in the result section.

In 5 postoperative days consecutively, all patients were asked to assess their pain severity at each part of donor site by writing a mark on the Visual Analog Scale (VAS). VAS was composed of 10-centimeters line equal to 10 points which 0 score located at the left side mean "no pain" and 10 score located at the right side mean "worst intolerable pain". In case of discharge, verbal interview by telephone was used instead of VAS according to the pain assessment schedule.

Blood samples were collected at pre-operation and 7-14 day post-operation for measuring blood chemistry data indicated blood glucose, liver function (aspartate amino transferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP) and albumin), renal function (blood urea nitrogen (BUN), creatinine (Scr)), and blood compositions (hemoglobin (Hb), hematocrit (Hct), platelets, and White Blood Cell count (WBC)). Additional blood samples were also collected at preoperative, first, and seventh postoperative day to determine pro-inflammatory cytokine profiles (IL-6 and TNF- $\alpha$ ) during the treatment process. After collection, these blood samples were centrifuged for serum separation, transferred to cryogenic vials and kept in liquid nitrogen until analysis. In case of discharge, blood samples were collected at the outpatient department, King

Chulalongkorn Memorial Hospital on the first follow-up visit (normally 7-14 postoperative days) and underwent in the same manner to collect serum.

The completely healed day of donor site and other local adverse events were observed by surgeons. Time taken for complete healing of donor site was determined as duration from the operative day to the day that the dressing material spontaneously peeled off without causing pain, and wound underneath exhibited complete epithelialization without fluid leakage. Wound dressings after peeling off were also collected and kept at 4°C for observation the appearance of cells which may attach on the dressing by polarized light microscope and scanning electron microscope. In case of discharge, patients was instructed to take notes about the date when each dressing easily removed with no pain and bring the used dressings to the investigator at the next follow-up visit.

Medical records of the patients were reviewed thoroughly by investigators for recording clinical relevant data. Physical examination, vital signs and medications of the patients during the study procedure were also recorded. All study information was finally gathered for analysis and interpretation.

**Primary outcome measure:**

- Time taken for complete healing of each half of donor site treated with silk sericin dressing or Bactigras<sup>®</sup>
- Pain score at each half of donor sites assessed by patients during 5 postoperative days consecutively
- Infection rate of donor sites assessed by clinical observations and swab evaluation

**Secondary outcome measure:**

- Changes in blood chemistry, hepatic function, renal function of the patients
- Change in serum IL-6 and TNF- $\alpha$  concentration during the treatment procedure

that may be relevant to clinical observation

- Epithelial cells presents on wound dressing after peeling off
- Vital signs, medications, treatment-related data
- Any possible local adverse effect at donor site

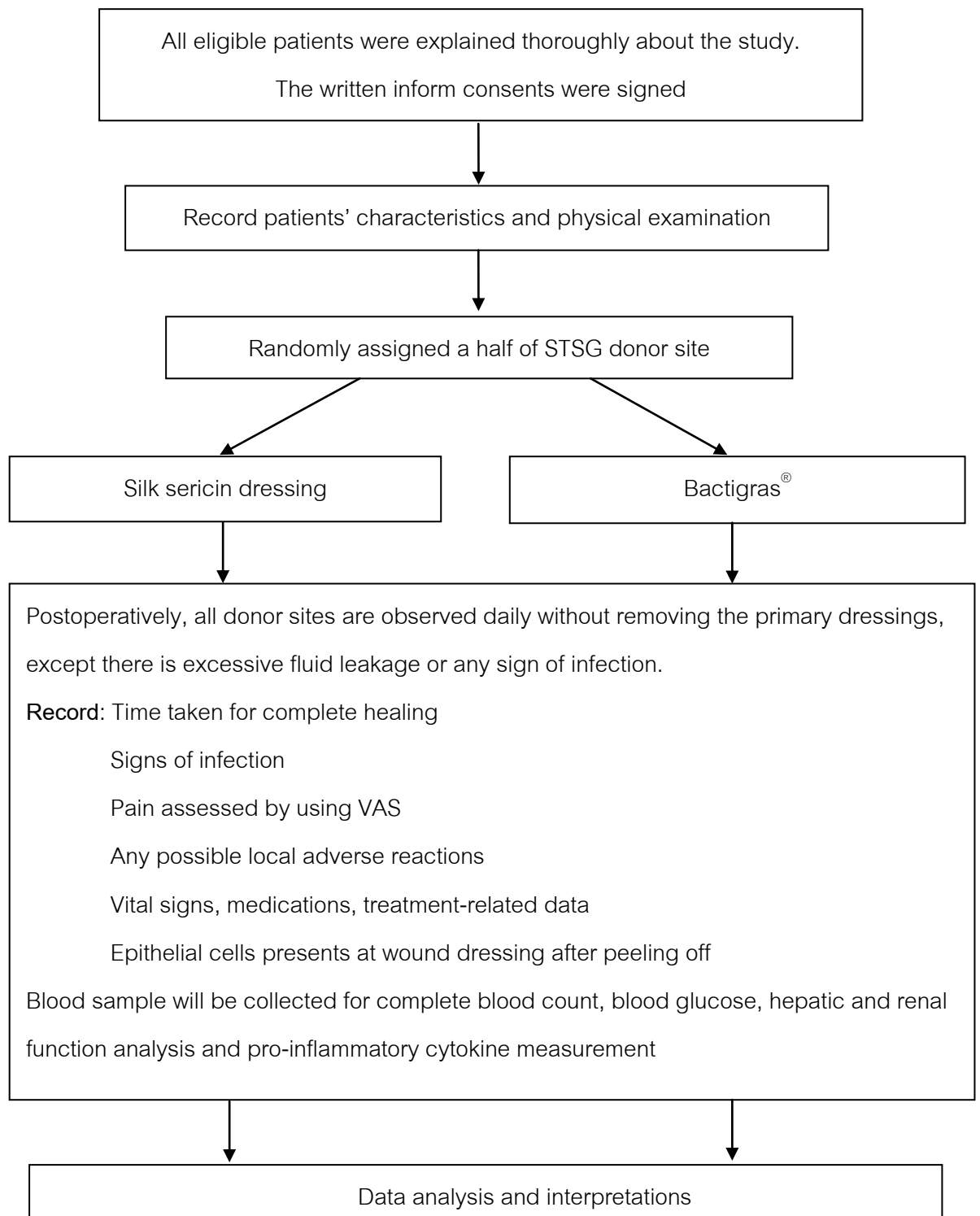


Figure 7: Diagram of phase II clinical study

### Appearance of wound dressings after peeling off

Wound dressings after peeling out off the donor sites, both silk sericin dressing and Bactigras<sup>®</sup>, were observed for cell attachment under a polarized light microscope (Olympus BX61, USA) at 4x and 20x magnification. Moreover, the dressings were cut into small pieces, mounted onto aluminum stubs and sputter coated with gold at a 10–20 nm thickness before taking images under scanning electron microscope (JEOL JSM-5410LV, Japan) at an acceleration voltage of 15 keV.

### IL-6 and TNF- $\alpha$ concentration analysis

Human IL-6 and TNF- $\alpha$  quantitative Enzyme Linked Immunosorbent Assays (ELISA) kits (Human IL-6 and TNF- $\alpha$  ELISA Ready-Set-Go, eBioScience Inc, USA) were used to measure serum IL-6 and TNF- $\alpha$  concentrations at each time point of serum collection. These serum samples were transferred to cryogenic vials and kept in liquid nitrogen until analysis. All serum samples were analyzed once together after last samples were collected. The sensitivity of the kits equaled to 2 pg/mL for IL-6 and 4 pg/mL for TNF- $\alpha$  detection. All the testing components were stored in 4°C and the recombinant standard cytokines were stored at -80°C until analysis.

Both pro-inflammatory cytokines were separately measured according to the same protocol from manufacturer as following. Capture antibody specific to each cytokine was coated on 96-well plate and incubated overnight at 4°C. The plate was washed 6 times by phosphate buffer solution with 0.05% tween 20 (called wash buffer) and blocked each well by the assay diluents for 1 hour in room temperature. The plate was then washed 6 times by wash buffer. After thawing at room temperature, 100  $\mu$ L of serum samples solution were added to each well together with the serial dilution of recombinant cytokine for generating standard curve and calibrating samples. Removing all test solutions was done after 2 hours incubation at room temperature and biotin-

conjugated secondary antibody was added and incubated for another 1 hour at room temperature. The plate was carefully washed and avidin-Horse Radish Peroxidase (HRP) was then added to each well. After 30-minutes incubation, the plates was repeat washed again and consequently added tetramethylbenzidine (TMB) substrate solution. This step was incubated in dark environment at room temperature for 30 minutes to develop the blue-colored solution. The stop solution, 1M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, was then added to each well and the solution subsequently turned to yellow color. The absorbance was measured using the microplate reader (Perkin Elmer Victor 3 Model 1420, USA) at 450 nm. Recombinant IL-6 and TNF- $\alpha$  were used to generate standard curve as shown in Appendix F. All serum samples were done in duplicates.

Serum IL-6 levels were in the range of 10 and 1000 pg/mL found in normal patients after surgery. Serum TNF- $\alpha$  was less than 100 pg/mL considered as normal level of the patient with no systemic infection (83, 84).

### 3.3 Statistical analysis

Analysis of descriptive statistics and inferential statistics data will be use SPSS version 17.0 (SPSS. Co., Ltd., Thailand). Significance level was defined at  $\alpha = 0.05$  for all analyses.

In Phase 1, demographic data of participants were shown as frequency, percent, mean and standard deviation. Comparing erythema and melanin index from Mexameter<sup>®</sup> and HRIPT scoring scale from dermatologists between two area contacted by silk sericin dressing or Bactigras<sup>®</sup> was analyzed by using paired *t*-test and repeated measures ANOVA.

In Phase 2, demographic data of participants were shown in the same way as phase I analysis. All continuous data were represented as mean and standard deviation. The intention-to-treat principle was applied. To analyze differences in time taken for complete wound healing on time to an event, the Kaplan–Meier method and Mantel–Cox



log rank test were employed. The differences in pain score and all laboratory data over time, Wilcoxon signed-rank test and Friedman test were used for nonparametric data. Chi-square was used for association analysis for categorical data.

### **3.4 Ethical consideration**

Investigator concerns about the rights of study subjects, healthy volunteers and patients to be or not to be participated in the study according to their willingness. All participants were given oral and written information about the study before recruitment. Participants can leave the study anytime which will not impact on the regular treatment they would receive. This clinical study also used the paraffin-impregnated fine mesh gauze (Bactigras<sup>®</sup>) which was a standard dressing for STSG donor site treatment as a control and all study procedures were under carefully inspection of surgeons at the Division of Plastic and Reconstructive Surgery, Department of Surgery, King Chulalongkorn Memorial Hospital, Bangkok, Thailand. All data will be kept confidential and presented only the overall results. There had no record any details that led to personally identify to the participants.

## CHAPTER IV

### RESULTS

#### 4.1 Phase I preliminary study for safety of the silk sericin dressing in healthy volunteers

This prospective randomize-controlled match pair study was conducted from April 2011 to January 2012 at the Department of Pharmacy Practice, Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, and Police General Hospital, Bangkok, Thailand. One hundred and twelve healthy volunteers were enrolled into the study. After the first patch was done, two male volunteers were withdrawn from this study. One subset withdrawal due to the unstable attachment of the patches and inconvenient to visit the investigator to apply new dressings while another subset withdrawal due to the itching and annoying perception at the back area in which he could not specify exactly when he did routine activities. At the end of the study, data from 110 healthy volunteers were analyzed for safety profiles of silk sericin dressing compared to a fine mesh gauze impregnated with paraffin and 0.5% chlorhexidine acetate (Bactigras<sup>®</sup>).

Demographic data of healthy volunteers included in the study were shown in Table 3. Participants were mainly female (73 participants; 66.40%) with mean age equal to  $27.35 \pm 9.80$  years. Most of volunteers were students (69.10%) following by state enterprise officers and government officers (11.80% and 10.90% respectively). There were 20 volunteers (18.18%) who reported their underlying diseases including hypertension (1 person; 0.91%), hyperlipidemia (2 persons; 1.82%), airborne allergy (12 persons; 10.91%), food allergy (2 persons; 1.82%), migraine (1 person; 0.91%), seasonal asthma (1 person; 0.91%), peptic ulcer (2 persons; 1.82%), flatulence and

dyspepsia (1 person; 0.89%). There was no participant who currently used oral or topical antihistamines or corticosteroids within a week prior to be enrolled in the study.

Table 3: Participants' demographic data.

Data	Number of volunteers (N = 110)	Percentage (%)
<b>Sex</b>		
- Male	37	33.60
- Female	73	66.40
<b>Age (year)</b>	27.35±9.80	
[Range]	[20, 57]	
<b>Weight (kg)</b>	56.20±10.30	
[Range]	[38, 101]	
<b>Height (cm)</b>	162.35±8.34	
[Range]	[133, 185]	
<b>Body mass index (kg/m<sup>2</sup>)</b>	21.27±3.14	
[Range]	[14.13, 31.24]	
<b>Occupation</b>		
- Business owner	1	0.90
- Maid	4	3.60
- Employed	4	3.60
- Government officer	12	10.90
- State enterprise officer	13	11.80
- Student	76	69.10
<b>Underlying disease</b>		
- No	92	81.82
- Yes	20	18.18
<b>Current alcohol drinking</b>		
- No	87	79.10
- Yes	23	20.90
<b>Current smoking</b>		
- No	93	84.50
- Yes	17	15.50

Values indicate mean±SD [range]

Table 4: Erythema and melanin levels of the tested skin measured by Mexameter MX18<sup>®</sup> during each visit (Mean ± SD) [Range].

Sample	Number of visits					p-value*
	1	2	3	4	5	
Erythema level						
Silk sericin dressing	249.82±78.64 [245.17, 254.47]	247.08±76.60 [242.55, 251.61]	249.83±78.82 [245.17, 254.50]	250.40±74.97 [245.97, 254.84]	242.14±72.57 [237.85, 246.44]	0.906
Bactigras <sup>®</sup>	252.20±82.35 [247.33, 257.07]	249.21±74.73 [244.78, 253.63]	249.79±78.69 [245.14, 254.45]	253.56±80.66 [248.79, 258.33]	243.82±72.63 [239.52, 248.12]	
Melanin level						
Silk sericin dressing	218.24±89.91 [212.93, 223.56]	215.48±88.04 [210.27, 220.69]	218.23±86.19 [213.13, 223.33]	219.98±88.18 [214.46, 225.19]	211.81±84.28 [206.82, 216.79]	0.820
Bactigras <sup>®</sup>	220.62±93.98 [215.06, 226.18]	217.29±90.79 [211.92, 222.66]	219.36±91.07 [213.98, 224.75]	225.47±93.28 [219.95, 230.98]	215.44±88.01 [210.23, 220.65]	

\*Repeated Measures ANOVA was used to compare the difference among the erythema and melanin levels in all time points.

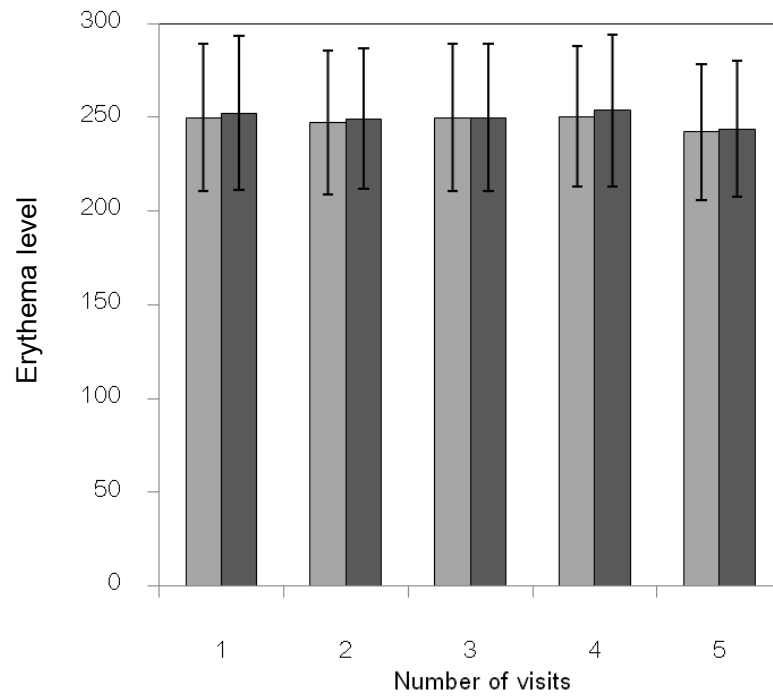


Figure 8: Erythema levels of the skin area contacted with silk sericin dressing (□) and Bactigras® (■) during each visit

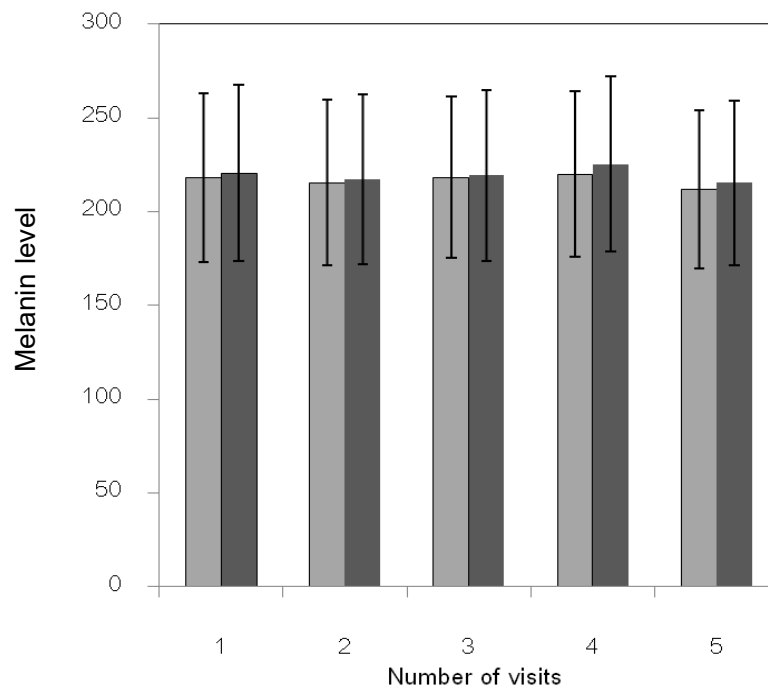


Figure 9: Melanin levels of the skin area contacted with silk sericin dressing (□) and Bactigras® (■) during each visit

Skin colorimetric measurement of erythema and melanin level was used as an objective tool to measure skin response to any substances. Mexameter MX<sup>®</sup> is an instrument commonly used in cosmetic and medical skin test. It consists of sensitive probe emitting lights at 3 specific wavelengths; 568, 600 and 870 nm, onto the skin and a receiver in the probe measure the reflective light from the tested area. The instrument reports data as erythema and melanin index calculated from light remittance and represented amounts of hemoglobin and melanin pigment, respectively under the skin. Both erythema and melanin level from Mexameter MX18<sup>®</sup> fall in the range of 0-999 which higher number means higher amounts of hemoglobin and melanin pigment contributing to skin color.

In this study, Mexameter MX18<sup>®</sup> was used to measure volunteers' skin response to silk sericin dressing and Bactigras<sup>®</sup>. At every visit, after resting in the room at 25±2°C and 50±5% relative humidity for 10 minutes, back area of healthy volunteers were repeat measured skin color for 10 times by a sensitive probe of Mexameter MX18<sup>®</sup>. Erythema and melanin level measured from the skin contacted with silk sericin dressing and Bactigras<sup>®</sup> at every visit were shown in Table 4, Figure 8 and Figure 9. Average erythema level of all back skin areas at the time of enrollment were 251.01±80.50 of which skins before contacted with silk sericin dressing were slightly lower than of skins before contacted with Bactigras<sup>®</sup>, but no significant difference was found (249.82±78.64 and 252.20±82.35, respectively). During the study visit, erythema levels of the skin after contacting with the test materials were slightly changed from baseline without significant difference between silk sericin dressing- or Bactigras<sup>®</sup>-treated area ( $p=0.906$ ). Concomitant with erythema, melanin levels of all area were measured which equaled to 219.00±91.95 at baseline of which skins before contacted with silk sericin dressing were slightly lower than of skins before contacted with Bactigras<sup>®</sup> (218.24±89.91 and 220.62±93.98, respectively). Again, there was no significant difference in melanin levels at every visit between the skins applied with silk sericin dressing or Bactigras<sup>®</sup> ( $p=0.820$ ).

Table 5: Skin evaluations for any local side effects according to HRIPT scoring scales by 3 independent clinical dermatologists compared to the baseline skin characteristics.

Parameters	Numbers of evaluation*								
	1		2		3		4		
	Silk sericin dressing	Bactigras®	Silk sericin dressing	Bactigras®	Silk sericin dressing	Bactigras®	Silk sericin dressing	Bactigras®	
<b>Erythema<sup>1</sup></b>									
No	106	101	164	157	190	196	170	169	
Mild	221	220	149	151	131	128	148	154	
Moderate	3	8	17	21	9	6	11	6	
Severe	0	1	0	1	0	0	1	1	
<i>p</i> -value**	0.651		0.571		0.758		0.921		
<b>Edema<sup>2</sup></b>									
No	279	278	259	255	282	293	265	264	
Mild	48	47	66	68	46	37	63	65	
Moderate	3	5	5	7	2	0	2	0	
Severe	0	0	0	0	0	0	0	1	
<i>p</i> -value**	0.775		0.693		0.162		0.310		
<b>Papule<sup>3</sup></b>									
No	323	318	306	307	319	316	313	312	
Exist	7	12	24	23	11	14	17	18	
<i>p</i> -value**	0.703		0.596		0.937		0.891		
<b>Vesicle<sup>4</sup></b>									
No	330	330	330	330	330	330	330	330	
Exist	0	0	0	0	0	0	0	0	
<b>Bullae<sup>5</sup></b>									
No	330	330	330	330	330	330	330	330	
Exist	0	0	0	0	0	0	0	0	

\*Maximum frequency of each parameter was equal to 330.

\*\*Chi-square test for any significant difference of the frequency among the evaluations

<sup>1</sup>Erythema: redness

<sup>2</sup>Edema: definite swelling

<sup>3</sup>Papules: many small, red, solid elevations; surface of reaction has granular feeling

<sup>4</sup>Vesicles: small circumscribed elevations having translucent surfaces so that fluid is visible (blister-like); vesicles are no larger than 0.5 cm in diameter

<sup>5</sup>Bullae: vesicles with a diameter >0.5 cm; vesicles may coalesce to form one or a few large blisters that fill the patch site

Table 6: Percentage of skin evaluation according to HRIPT scoring scale, calculated by the frequency of responses at every visit from 3 independent clinical dermatologists.

Parameters	Silk sericin dressing	Bactigras®
<b>Erythema<sup>1</sup></b>		
no	32.1-57.6%	30.6-59.4%
mild	39.7-67.0%	38.8-66.7%
moderate	0.9-5.2%	1.8-6.4%
severe	0-0.3%	0-0.3%
<b>Edema<sup>2</sup></b>		
no	78.5-85.5%	77.3-88.8%
mild	13.9-20.0%	11.2-20.6%
moderate	0.6-1.5%	0.0-2.1%
severe	0.0%	0.0-0.3%
<b>Papule<sup>3</sup></b>		
no	92.7-97.9%	93.0-96.4%
exist	2.1-7.3%	3.6-6.9%
<b>Vesicle<sup>4</sup></b>		
no	100.0%	100.0%
exist	0.0%	0.0%
<b>Bullae<sup>5</sup></b>		
no	100.0%	100.0%
exist	0.0%	0.0%

<sup>1</sup>Erythema: redness

<sup>2</sup>Edema: definite swelling

<sup>3</sup>Papules: many small, red, solid elevations; surface of reaction has granular feeling

<sup>4</sup>Vesicles: small circumscribed elevations having translucent surfaces so that fluid is visible (blister-like); vesicles are no larger than 0.5 cm in diameter

<sup>5</sup>Bullae: vesicles with a diameter >0.5 cm; vesicles may coalesce to form one or a few large blisters that fill the patch site



In addition to skin colorimetric measurement, clinical assessment was performed by 3 independent clinical dermatologists through skin photos taken at the time of enrollment and every follow-up visit. This subjective observation can report the occurrence of local adverse event supplementary to objective method.

In this study, the visual scoring of irritation was performed according to HRIPT scale. This scale was adapted from the guidance for industry skin irritant and sensitization testing of generic transdermal drug products (85) which included the observation of erythema (skin redness score 0-3 which 0 means normal skin and 3 means very severe redness), edema (skin swelling score 0-3 which 0 means normal skin and 3 means very severe swelling), papule, vesicle and bullae (evaluated as exist or no exist). All irritation degrees of back skin contacted with silk sericin dressing were comparable to those of Bactigras<sup>®</sup> ( $p>0.05$ ) as shown in Table 5 and Table 6. Focusing in the details of HRIPT scale, there were higher frequencies of mild perceptible erythema on volunteers' skin observed as the first reading but the frequencies were reduced mainly to "no erythema" on the next follow-up visit. "No edema" was mainly found in skin response although some of them showed mild or moderate level. No severe edema was found in the skin contacted with silk sericin dressing while one score was assessed as severe edema on a skin contacted with Bactigras<sup>®</sup>. Only very slight papules were observed during the study (2.1-7.3% of silk sericin dressing-contacted area and 3.6-6.9% of Bactigras<sup>®</sup>-contacted area) along with no existence of vesicle and bullae. According to the skin evaluation of all 3 dermatologists, no considerable irritation was seen in 110 healthy volunteers at any visit after applying with silk sericin dressing compared to Bactigras<sup>®</sup>.

During the study period, of 110 healthy volunteers, 12 participants (11%) reported itching sensation surrounding the test areas which mainly caused by the retentive tapes using for samples attachment. They indicated that the sensation was tolerable; thus, they were able to complete all study protocol.

## 4.2 Phase II clinical efficacy of silk sericin dressing in patients with STSG donor site

This prospective randomize-controlled match pair study was conducted from March to December 2012 at the Division of Plastic and Reconstructive Surgery, Department of Surgery, King Chulalongkorn Memorial Hospital, Bangkok, Thailand. Twenty eight patients required skin grafting as a single procedure or in combination with other reconstructive surgery procedures were enrolled into the study. After written inform consents were obtained, demographic data of all patients at baseline including sex, marital status, age, weight, height, occupation, medical care rights, known drug allergy, underlying disease and social history were recorded as shown in Table 7.

The patients were mainly female (16 patients; 57.1%) at average age equal to  $39.86 \pm 16.41$  years. Mean Body Mass Index (BMI) was in normal range ( $23.66 \pm 4.26$  kg/m<sup>2</sup>). According to the data recorded in patients' charts, there were 3 patients who had known drug allergy; one reported penicillin G, one reported ciprofloxacin and another one reported pseudo-allergy from morphine injection. Approximate 36% of patients who had chronic underlying diseases prior to hospitalization including thalassemia (1 patient; 3.6%), paroxysmal supraventricular tachycardia (1 patient, 3.6%), type II diabetes mellitus (3 patients; 10.7%), hypertension (4 patients; 14.3%), spinal cord injury with quadriplegia (1 patient; 3.6%), hyperlipidemia (1 patient; 3.6%), obesity (1 patient; 3.6%), gout (1 patient; 3.6%) and heart failure (1 patient; 3.6%). Of 28 patients included in this study, 4 patients (14.3%) were current smokers with no more than 10 cigarettes per week and 8 patients (28.6%) were occasionally alcoholic drinkers for sociability. Physical examination at the time of enrollment including body temperature, respiratory rate, blood pressure and fasting blood sugar were also shown in Table 7.

Table 7: Participants' demographic data.

Data	Number of patients (N = 28)	Percentage (%)
<b>Sex</b>		
- Male	12	42.9
- Female	16	57.1
<b>Marital status</b>		
- Single	15	53.6
- Married	13	46.4
<b>Age (year)</b>	39.86±16.41	
[Range]	[18, 65]	
<b>Weight (kg)</b>	62.00±12.29	
[Range]	[40, 85]	
<b>Height (cm)</b>	161.79±8.18	
[Range]	[143, 175]	
<b>Body mass index (kg/m<sup>2</sup>)</b>	23.66±4.26	
[Range]	[15.65, 30.12]	
<b>Occupation</b>		
- Government officer	1	3.6
- Priest	1	3.6
- Business owner	3	10.7
- Maid	3	10.7
- Student	5	17.9
- Employed	9	32.1
- Not specify	6	21.4
<b>Medical care rights</b>		
- Government welfare	2	7.1
- Social security	2	7.1
- Hospital welfare	2	7.1
- Cash	7	25.0
- Universal care service -	15	53.7

Table 7: Participants' demographic data (continue).

Data	Number of patients (N = 28)	Percentage (%)
<b>Smoking history</b>		
- No	24	85.7
- Yes	4	14.3
<b>Alcohol intake history</b>		
- No	20	71.4
- Yes	8	28.6
<b>Known Drug Allergy</b>		
- No	25	89.3
- Yes	3	10.7
<b>Underlying disease(s)</b>		
- No	18	64.3
- Yes	10	35.7
<b>Body temperature (°C)</b>	36.73±0.37	
[Range]	[36.10, 38.00]	
<b>Respiratory rate (bpm)</b>	19.96±0.43	
[Range]	[18, 21]	
<b>Blood pressure (mm.Hg)</b>		
- Systolic blood pressure	119.00±16.28	
[Range]	[99, 152]	
- Diastolic blood pressure	69.73±10.28	
[Range]	[56.50, 99.50]	
<b>Fasting blood glucose (mg/dL)</b>	108.80±23.32	
[Range]	[81, 186]	

Values indicate mean±SD [range]

Table 8: Donor sites' characteristics.

Data	Number of donor sites (N = 30)	Percentage (%)
<b>Indications of STSG</b>		
- Burn	3	10.0
- Malignancy	6	20.0
- Scar contracture	8	26.7
- Trauma	13	43.3
<b>Duration of surgery involved with STSG (minutes) [Range]</b>	142.17±86.13 [50, 395]	
<b>STSG thickness (inch) [Range]</b>	0.0110±0.0018 [0.0080, 0.0140]	
<b>STSG area (cm<sup>2</sup>) [Range]</b>	124.74±86.72 [50.48, 276.57]	
<b>Donor site location</b>		
- Left thigh	15	50
- Right thigh	15	50

Values indicate mean±SD [range]

After harvesting the graft at thigh areas, 30 STSG donor sites from 28 patients were recruited for this clinical trial. Table 8 exhibited donor sites characteristics involved in the study. Majority of cases required STSG were traumatic wounds (43.3%) following by releasing scar contracture and malignant resection (26.7% and 20.0% respectively). Mean area and depth of STSG donor sites were 124.74±86.72 cm<sup>2</sup> and 0.0110±0.0018 inch, respectively which located at left and right thighs equally. During operation, the donor sites were equally divided into two parts as the cephalic half and caudal half to determine the efficacy and safety of silk sericin dressing compared with Bactigras<sup>®</sup>; a standard dressing. Each half was randomly allocated to treat with silk sericin dressing

by simple randomization. The other side was automatically treated with Bactigras<sup>®</sup>. In this study, there were 13 donor sites that the cephalic halves were treated with silk sericin dressing and caudal halves were treated with Bactigras<sup>®</sup> whereas the rest 17 donor sites were treated in the opposite way. After that, entire wounds were covered with several layers of sterile absorbent gauzes and elastic bandages and observed for any fluid leakage or sign of infection every post-operative day.

Table 9: Times for complete healing (median±interquartile range) [range].

Data	Median times for complete healing (days) of the donor sites treated with		
	Silk sericin dressing	Bactigras <sup>®</sup>	<i>p</i> -value
All donor sites	12.00±5.00 [7, 32]	14.00±5.25 [8, 42]	0.024 <sup>a</sup>
Position of treatments			
- Cephalic half	12.00±6.00 [7, 32]	15.00±6.50 [9, 42]	0.033 <sup>b</sup>
- Caudal half	13.00±4.00 [9, 27]	14.00±5.50 [8, 30]	0.033 <sup>b</sup>
Infection criteria			
- Donor sites with no sign of infection	12.00±2.75 [7, 27]	14.00±5.50 [8, 42]	8.18×10 <sup>-5</sup> <sup>c</sup>
- Donor sites with sign of infection	25.00±14.00 [18, 32]	24.00±12.00 [18, 30]	0.317 <sup>c</sup>

<sup>a</sup>Mantel–Cox log rank test

<sup>b</sup>Test for normality of data was significance. Using Mann-Whitney U test to compare the difference of times for complete healing at different positions

<sup>c</sup>Test for normality of data was significance. Using Wilcoxon signed rank test to compare the difference of times for complete healing between donor sites treated with dressing types

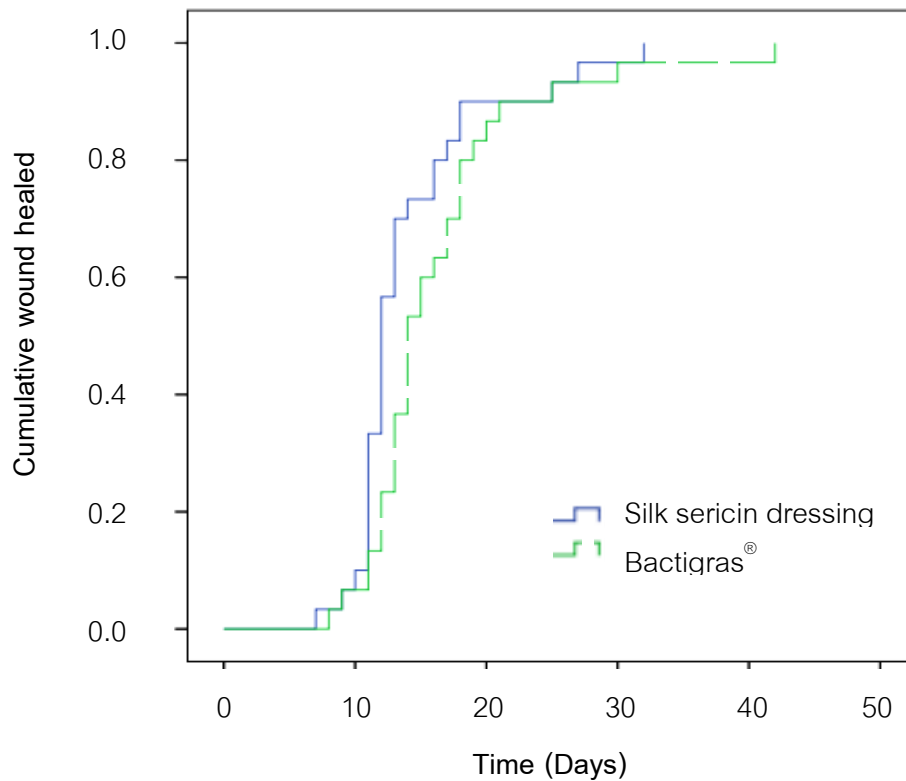


Figure 10: Kaplan–Meier curves comparing cumulative healing of all STSG donor sites using silk sericin dressing compared with Bactigras®.

The date of complete healing of donor site was recorded when each wound dressing spontaneously peeled off without causing pain to the patients and wound underneath exhibited complete epithelialization. Duration from the operative day to the day that the dressing materials peeling off referring to time taken for complete healing of STSG donor sites treated with silk sericin dressing and Bactigras® were equal to  $12.00 \pm 5.00$  and  $14.00 \pm 5.25$  days respectively which were significantly different as shown in Table 9 and Figure 10 ( $p=0.024$ ). Considering the position of treatment, median time to heal of cephalic halves of STSG donor sites treated with silk sericin dressing also significantly shorter than those treated with Bactigras® ( $12.00 \pm 6.00$  and  $15.00 \pm 6.50$  days respectively,  $p=0.033$ ) as well as the caudal halves of donor sites ( $13.00 \pm 4.00$  and  $14.00 \pm 5.50$  respectively,  $p=0.033$ ).

On the second post-operative day, after removing the elastic bandages and several layers of sterile gauze, there were 2 silk sericin dressings fully swollen with blood and not stay in place. Two STSG donor sites under those dressing (6.7%) exhibited signs of infection including purulent exudate, fluid leakage, wound edge edema and redness. While Bactigras<sup>®</sup>-treated donor sites showed no signs of infection and the dressings still attached tightly on wounds. Wound swabs at the suspected areas for microbial identification were done by surgeons, used silk sericin dressings were immediately removed, donor sites underneath were cleaned with 10% povidone-iodine solution and 0.9% normal saline solution and then covered the wounds with Bactigras<sup>®</sup> instead of silk sericin dressing. These donor sites assessments were continued to the study protocol, but reported as infected donor sites. The microbial identification tests reported that there was *Staphylococcus aureus* found in one infected donor site and *Pseudomonas aeruginosa* in another infected donor site with no further microbial quantification test.

At the end of this study, the results showed that donor sites with signs of infection required longer time for complete healing which was  $25.00 \pm 14.00$  days. However, Bactigras<sup>®</sup>-treated donor sites which located closely to the infected areas also needed longer time to heal which was  $24.00 \pm 12.00$  days insignificantly different to those of infected donor sites ( $p=0.317$ ).

Body temperatures of the patients included in the study at pre-operative day, operative day and 5 post-operative days consecutively were shown in Figure 11. Little difference was found in the body temperatures between study patients. Average patients' body temperatures at pre-operative day were slightly higher in the patients whose donor sites were then infected than other patients ( $36.90 \pm 0.07$  and  $36.72 \pm 0.19$ °C respectively) but no significant difference was found. In all patients, the body temperatures further slightly increased on the first and second post-operative days and then become almost constant. The body temperatures of the patients whose donor sites



were infected also showed the same pattern but a bit higher elevated on the first and second post-operative day. However, all patients had no fever during the study period.

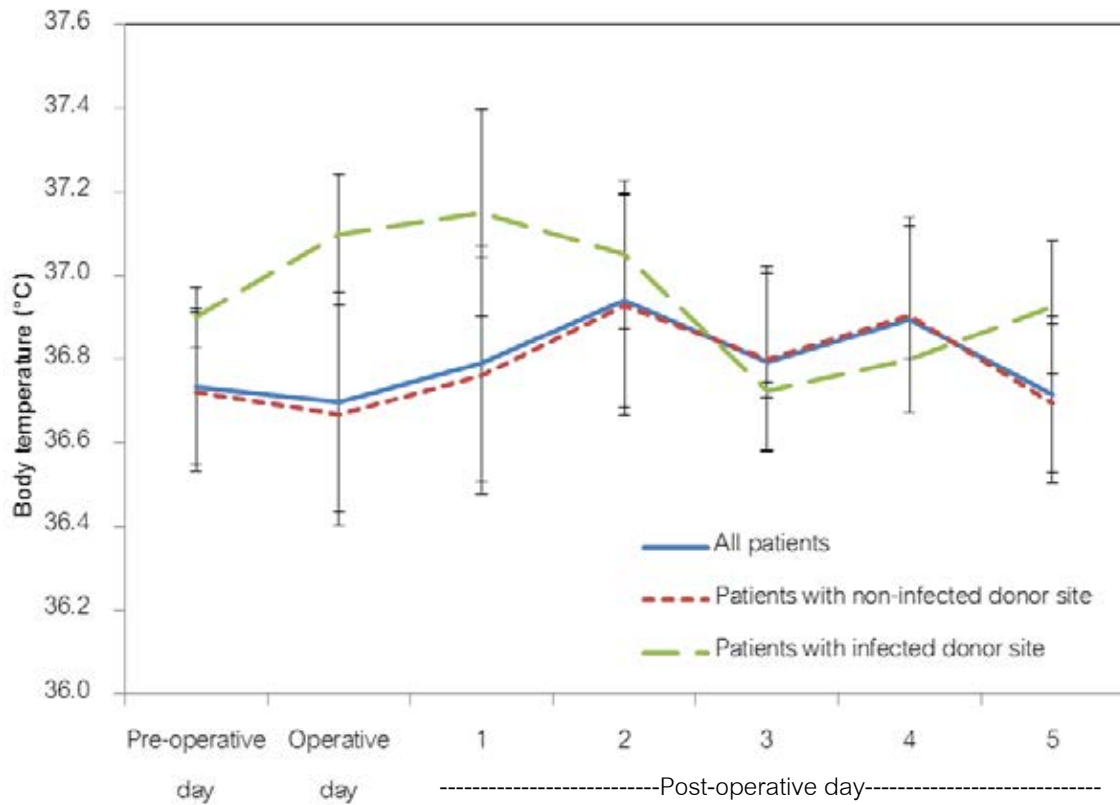


Figure 11: Body temperatures of the patients.

According to systemic antibiotic drugs prescription, cefazolin 1 gram was intravenously administered to all patients 30-60 minutes prior to surgery for prevention of surgical site infection and sepsis. Intravenous clindamycin was used in the patient who had known penicillin G allergy with maculopapular rash symptom. Generally, patients were continuously given the same antibiotics for 7-14 days post-operation. In case of the stability of patients' symptom or discharge, oral antibiotics (dicloxacillin 400 mg taken 1 tablet 4 times per day or cephalexin 500 mg taken 1 tablet 4 times per day) were ordered in patient's home medications together with topical antibiotic ointment indicated

for recipient sites with specific defects such as skin suture of the release scar contracture treatment.

Table 10: Pain score evaluated by patients (median±interquartile range) [range].

Post-operative day	Pain score <sup>b</sup>		
	Silk sericin dressing	Bactigras <sup>®</sup>	<i>p</i> -value <sup>a</sup>
1	5.12±1.98 [1.85, 10]	10.00±1.09 [5.5, 10]	2.70×10 <sup>-5</sup>
2	5.00±2.50 [2.2, 10]	9.00±2.00 [5, 10]	1.30×10 <sup>-4</sup>
3	2.45±1.50 [1, 10]	6.04±3.00 [1.95, 10]	3.20×10 <sup>-5</sup>
4	2.03±2.95 [0, 8.5]	4.75±3.00 [1, 8.5]	3.48×10 <sup>-4</sup>
5	1.15±2.00 [0, 5]	1.95±3.00 [0, 8.5]	0.028

<sup>a</sup>Test for normality of data was significance. Using Wilcoxon signed rank test to compare the difference of pain score between donor sites treated with dressing types

<sup>b</sup>Using Friedman test to compare the difference among the pain scores of each dressing in all 5 post-operative day ( $p=3.06 \times 10^{-13}$  in silk sericin dressing-treated group and  $p=6.43 \times 10^{-19}$  in Bactigras<sup>®</sup>-treated group)

Table 11: Comparison of pain score between non-infected and infected donor sites (median±interquartile range) [range].

Post-operative day	Pain score <sup>b</sup>		
	Non-infected donor sites	Infected donor sites	p-value <sup>a</sup>
1	7.53±5.00 [1.85, 10]	10.00±2.25 [7, 10]	0.089
2	7.00±5.00 [2.2, 10]	10.00±0.00 [10, 10]	0.011
3	5.00±4.28 [1, 10]	8.00±3.08 [5.93, 10]	0.045
4	2.18±3.71 [0, 8.03]	6.75±3.50 [5, 8.5]	0.004
5	1.08±2.00 [0, 8.5]	5.00±0.00 [5, 5]	0.001

<sup>a</sup>Test for normality of data was significance. Using Mann-Whitney U test to compare the difference of each laboratory data between patients having infected and non-infected donor sites

<sup>b</sup>Using Friedman test to compare the difference among the pain scores of each dressing in all 5 post-operative day ( $p=1.14 \times 10^{-27}$  in non-infected donor site group and  $p=0.019$  in infected donor site group)

In 5 post-operative days consecutively, pain scores at the STSG donor sites were daily assessed by patients using VAS which was composed of 10-centimeters line equal to 10 points which 0 score located at the left side mean “no pain” and 10 score located at the right side mean “worst intolerable pain”.

In this study, one patient with one donor site was not able to evaluate his wound pain level due to spinal cord injury with quadriplegia. Therefore, pain scores reported in Table 10 and Table 11 were collected from 27 patients and 29 STSG donor sites. At the first post-operative day, median pain score of silk sericin dressing-treated donor sites

was  $5.12 \pm 1.98$  then decrease to  $1.15 \pm 2.00$  on day 5 post-operation. Friedman test analysis found that the change in daily pain score of these STSG donor sites were statistically significant ( $p = 3.06 \times 10^{-13}$ ). Corresponding to silk sericin dressing, pain scores of Bactigras<sup>®</sup>-treated donor sites significantly decreased daily in 5 post-operative days ( $p = 6.43 \times 10^{-19}$ ). Comparison between both dressings; however, showed that median pain scores of the STSG donor sites treated with silk sericin dressing were significantly lower than those of donor sites treated with Bactigras<sup>®</sup> in all 5 post-operative days ( $p < 0.05$ ). Even though; on day 5 post-operation, some patients reported that they could not differentiate pain levels between each half of STSG donor sites treated with silk sericin dressing and Bactigras<sup>®</sup>, VAS pain scores obtained from patients were still statistically significant between both sites.

Table 11 represented pain scores separately analyzed according to signs of infection. The results found that the pain scores of infected-donor sites were slightly higher than non-infected donor sites on the first post-operative day ( $10.00 \pm 2.25$  and  $7.53 \pm 5.00$ , respectively) and they significantly sustained in higher levels than non-infected donor sites on day 2, 3, 4, 5 post operation ( $p < 0.05$ ).

Focusing on the analgesic drugs prescribed for pain management. Normally, either 2 tablets of paracetamol 500 mg or 1 capsule of tramadol 50 mg, or both, were ordered as patients needed. In addition to STSG donor site, severity of the defects at the recipient sites also influenced pain perception of the patients and resulted in difference analgesia requirement. However, in this study, pain assessments by VAS were done daily at the same time of the day prior to analgesia administration or after analgesia administration for 2 hours.

Table 12: Blood biochemistry data of hepatic functions, renal functions, electrolytes levels and blood compositions (median±interquartile range) [range].

Data <sup>a</sup>	Pre-operation	Post-operation	p-value <sup>b</sup>	Normal
Hepatic functions				
- AST (U/L)	21.00±14.50 [8, 161]	19.00±10.00 [8, 37]	0.003	5-35
- ALT (U/L)	21.00±11.50 [10, 165]	16.00±6.50 [10, 85]	0.004	0-40
- ALP (U/L)	74.00±46.25 [40, 280]	69.00±30.75 [45, 128]	0.021	40-120
- Albumin (g/dL)	3.50±1.15 [2.3, 5.1]	3.75±0.82 [2.3, 5.0]	0.140	3.5-5.0
Renal functions				
- BUN (mg/dL)	10.50±9.00 [5, 24]	9.50±3.25 [5, 31]	0.039	7-20
- Scr (mg/dL)	0.71±0.24 [0.28, 1.23]	0.61±0.26 [0.30, 0.98]	0.077	0.50-1.00
FBS (mg/dL)	106.50±19.75 [81, 186]	97.50±9.50 [79, 124]	0.007	70-110
Electrolytes				
- Sodium (mmol/L)	139.00±3.25 [135, 147]	139.50±3.25 [132, 144]	0.800	136-145
- Potassium (mmol/L)	4.00±0.43 [3.0, 4.7]	4.05±0.53 [3.3, 4.8]	0.302	3.5-5.1
- Chloride (mmol/L)	100.50±4.00 [95, 108]	101.50±4.75 [95, 107]	0.040	95-105
- CO <sub>2</sub> (mmol/L)	26.00±4.25 [21, 33]	26.50±3.00 [21, 32]	0.712	22.0-29.0

Table 12: Blood biochemistry data of hepatic functions, renal functions, electrolytes levels and blood compositions (median±interquartile range) [range] (continue).

Data <sup>a</sup>	Pre-operation	Post-operation	p-value <sup>b</sup>	Normal
Complete blood count				
- Hb (g/dL)	12.65±2.75 [4.60, 16.60]	11.70±2.48 [7.90, 15.10]	0.275	12.0-15.0
- Hct (%)	39.00±7.85 [17.30, 48.30]	36.55±6.63 [26.10, 42.80]	0.267	36.0-45.0
- Platelets (x10 <sup>3</sup> /μL)	309.00±75.50 [152, 796]	321.00±136.00 [123, 596]	0.797	150-450
- WBC (x10 <sup>3</sup> /μL)	7.33±4.67 [4.60, 15.19]	7.20±2.26 [4.67, 11.84]	0.289	4.5-11.0

<sup>a</sup>AST = Aspartate aminotransferase, ALT = Alanine aminotransferase, ALP = Alkaline phosphatase, BUN = Blood urea nitrogen, Scr = Serum creatinine, FBS = Fasting blood sugar, Hb = Hemoglobin, WBC = White blood cells

<sup>b</sup>Test for normality of data was significance. Using Wilcoxon signed rank test to compare the difference of each laboratory data pre- and post-operation

Table 13: Comparison of blood biochemistry data between infected and non-infected donor sites (median±interquartile range) [range].

Data <sup>a</sup>	Pre-operation			Post-operation		
	Non-infected	Infected	<i>p</i> -value <sup>b</sup>	Non-infected	Infected	<i>p</i> -value <sup>b</sup>
Hepatic functions						
- AST (U/L)	21.00±15.50 [8, 161]	21.00±0.00 [21, 21]	1.000	19.00±10.00 [8, 37]	19.50±7.00 [16, 23]	0.967
- ALT (U/L)	21.00±8.75 [10, 165]	10.00±0.00 [10, 10]	0.024	16.00±6.75 [10, 85]	13.50±3.00 [12, 15]	0.226
- ALP (U/L)	74.00 ± 45.5 [40, 280]	51.00±10.00 [46, 56]	0.061	71.00±29.00 [45, 128]	53.5±3.00 [52, 55]	0.088
- Albumin (g/dL)	3.55±1.13 [2.3, 5.1]	2.75±0.50 [2.5, 3.0]	0.067	3.80±0.68 [3.0, 5.0]	2.40±0.20 [2.3, 2.5]	0.020
Renal functions						
- BUN (mg/dL)	10.00±6.00 [5, 24]	22.50±1.00 [22, 23]	0.030	9.00±3.75 [5, 14]	25.00±12.00 [19, 31]	0.019
- Scr (mg/dL)	0.66±0.26 [0.28, 1.23]	0.81±0.14 [0.74, 0.88]	0.261	0.60±0.29 [0.30, 0.98]	0.79±0.28 [0.65, 0.93]	0.243
FBS (mg/dL)	104.50±17.00 [81, 186]	132.50±25.00 [120, 145]	0.080	96.00±8.75 [79, 107]	121.00±6.00 [118, 124]	0.020
Electrolytes						
- Sodium (mmol/L)	139.00±3.75 [135, 147]	139.50±1.00 [139, 140]	0.737	139.50±3.75 [132, 144]	139.00±4.00 [137, 141]	0.706
-Potassium (mmol/L)	3.95±0.40 [3.0, 4.7]	4.15±0.30 [4.0, 4.3]	0.336	4.10±0.55 [3.3, 4.8]	3.85±0.10 [3.8, 3.9]	0.260
- Chloride (mmol/L)	100.00±4.00 [95, 108]	102.50±1.00 [102, 103]	0.167	101.50±5.25 [95, 107]	103.50±5.00 [101, 106]	0.452
- CO <sub>2</sub> (mmol/L)	26.00±4.00 [21, 32]	27.00±12.00 [21, 33]	0.933	27.00±3.00 [21, 32]	26.00±0.00 [26, 26]	0.673

Table 13: Comparison of blood biochemistry data between patients having infected and non-infected donor sites (Median±interquartile range) [range] (continue)

Data <sup>a</sup>	Pre-operation			Post-operation		
	Non-infected	Infected	<i>p</i> -value <sup>b</sup>	Non-infected	Infected	<i>p</i> -value <sup>b</sup>
Complete blood count						
- Hb (g/dL)	12.80±2.78 [4.6, 16.6]	11.25±0.10 [11.2, 11.3]	0.244	11.70±2.48 [7.9, 15.1]	10.85±1.90 [9.9, 11.8]	0.360
- Hct (%)	39.30±8.05	34.1±0.60	0.228	36.90±6.58	33.95±5.90	0.318
- Platelets (x10 <sup>3</sup> /μL)	[17.3, 48.3]	[33.8, 34.4]		[26.1, 42.8]	[31.0, 36.9]	
- WBC (x10 <sup>3</sup> /μL)	297.50±96.50 [152, 796]	333.50±1.00 [333, 334]	0.505	321.00±140.75 [123, 596]	293.50±73.00 [257, 330]	0.618
	7.33±3.78 [4.60, 15.19]	7.19±2.15 [6.11, 8.26]	0.777	7.19±2.26 [4.67, 8.62]	11.23±1.63 [10.21, 11.84]	0.005*

<sup>a</sup>AST = Aspartate aminotransferase, ALT = Alanine aminotransferase, ALP = Alkaline phosphatase, BUN = Blood urea nitrogen, Scr = Serum creatinine, FBS = Fasting blood sugar, Hb = Hemoglobin, WBC = White blood cells

<sup>b</sup>Test for normality of data was significance. Using Mann-Whitney U test to compare the difference of each laboratory data between patients having infected and non-infected donor sites

To study the systemic safety profile of silk sericin dressing, blood biochemistry data of the patients at baseline and 7-14 days post-operation were evaluated. Hepatic function represented by AST, ALT, ALP and albumin level while renal function represented by BUN and Scr. In addition, FBS, blood electrolytes and complete blood count were also measured as shown in Table 12.

For hepatic function, AST, ALT and ALP were elevated on pre-operative day (21.00±14.50 U/L, 21.00±11.50 U/L and 74.00±46.25 U/L respectively) which further decreased during the next week of post-operation (19.00±10.00 U/L, 16.00±6.50 U/L and 69.00±30.75 U/L, respectively). However median of albumin levels were slightly raised during study period (3.50±1.15 g/dL at pre-operation and 3.75±0.82 g/dL at 7-14 days post-operation).



For renal function, BUN and Scr were elevated in the first operative day ( $10.50\pm 9.00$  mg/dL and  $0.71\pm 0.24$  mg/dL respectively) and then decrease thereafter ( $9.50\pm 3.25$  mg/dL and  $0.61\pm 0.26$  mg/dL respectively).

FBS levels at baseline significantly higher than at 7-14 days post-operation ( $106.50\pm 19.75$  mg/dL and  $97.50\pm 9.50$  mg/dL respectively,  $p=0.007$ ) while blood electrolytes and complete blood count did not significantly changed during the study period. All median of blood biochemistry data of the patients included in the study fell within the normal range of King Chulalongkorn Memorial Hospital laboratory value.

Table 13 showed blood biochemistry data separately analyzed by infection criteria. In contrast to data from all patients, albumin levels of patients who had infected STSG donor sites were lower than those of others at pre-operation ( $2.75\pm 0.50$  g/dL and  $3.55\pm 1.13$  g/dL respectively) and post-operation ( $2.40\pm 0.20$  g/dL and  $3.80\pm 0.68$  g/dL respectively). According to pre- and post-operative measurements, BUN and Scr levels as well as FBS of the patients with infected STSG donor sites were higher than those with non-infected one. During the study, blood electrolytes and complete blood count of both groups were not statistically significant except WBC level which was significantly high on day 7-14 post-operation in patients who had infected donor sites ( $p=0.005$ ).

Table 14: IL-6 and TNF- $\alpha$  levels in patients' serum.

Data		Median concentration (pg/mL) of pro-inflammatory cytokines in patients' serum			
		Pre-operation	Post-operation day1	Post-operation day(7-14)	<i>p</i> -value <sup>a</sup>
IL-6	All patients	15.68±11.31 [5.42, 39.95]	31.65±16.71 <sup>b</sup> [8.94, 128.07]	13.75±10.00 [4.37, 48.58]	1.13x10 <sup>-10</sup>
	- Patients with non-infected donor site	15.95±11.31 [5.42, 39.95]	30.83±18.72 <sup>b,c</sup> [8.94, 61.95]	13.02±9.59 <sup>c</sup> [4.37, 32.75]	1.21x10 <sup>-9</sup>
	- Patients with infected donor site	13.32±11.84 [10.68, 26.47]	117.56±2.87 <sup>b,c</sup> [98.58, 128.07]	34.89±28.82 <sup>c</sup> [18.58, 48.58]	0.018
TNF- $\alpha$	All patients	Not detect	9.25±31.81 <sup>b</sup> [-8.53, 23.28]	Not detect	9.84x10 <sup>-6</sup>
	- Patients with non-infected donor site	Not detect	8.24±27.96 <sup>b,c</sup> [-15.81, 51.45]	Not detect	1.02x10 <sup>-4</sup>
	- Patients with infected donor site	Not detect	95.23±45.28 <sup>b,c</sup> [52.95, 107.48]	1.17±11.56 [-8.21, 3.35]	0.039

<sup>a</sup>Test for normality of data was significance. Using Friedman test to compare the difference of pro-inflammatory cytokines within patients at overall period of the study

<sup>b</sup>Using Wilcoxon signed ranks test to compare the difference of pro-inflammatory cytokines within patients at each time point to the baseline value and statistically significance ( $p < 0.05$ )

<sup>c</sup>Using Mann-Whitney U test to compare the difference of pro-inflammatory cytokines between patients having infected and non-infected donor sites at the same time point and statistically significance ( $p < 0.05$ )

IL-6 and TNF- $\alpha$  as pro-inflammatory cytokines were measured in patients' serum collected at pre-operative, first and 7-14 post-operative days using ELISA kit with the sensitivity of IL-6 and TNF- $\alpha$  equal to 2 pg/mL and 4 pg/mL, respectively. According to pre-operative data, the results from the measurement of all patients found that IL-6 were  $15.68 \pm 11.31$  pg/mL while TNF- $\alpha$  were below the detectable level. Both cytokines were significantly elevated on the first-operative day and then decreased to the baseline level at 7-14 days post-operation as shown in Table 14. Considering signs of infection, IL-6 and TNF- $\alpha$  of the patients with infected donor sites increased on the first operative day at higher levels than those of non-infected donor sites. Even though both cytokines decreased in the 7-14 day post-operation, IL-6 and TNF- $\alpha$  of the patients with infected donor sites were still higher than those of non-infected donor sites owners.

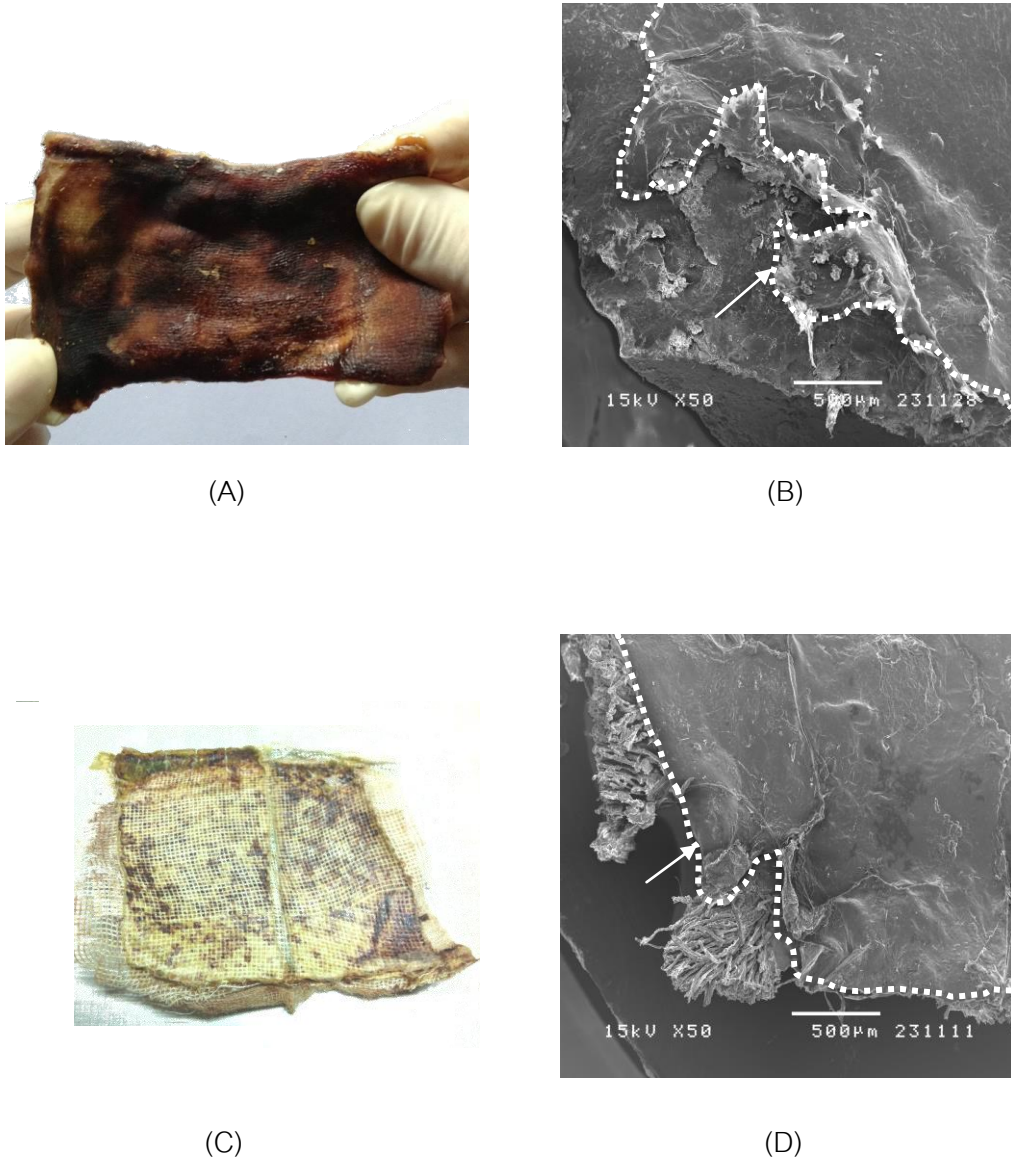


Figure 12: Silk sericin dressing and Bactigras<sup>®</sup> after peeling off as visual observation

(A) (C), scanning electron microscopic observation (B), (D), respectively.

( ↑ indicated adhesion of the epithelial cells)

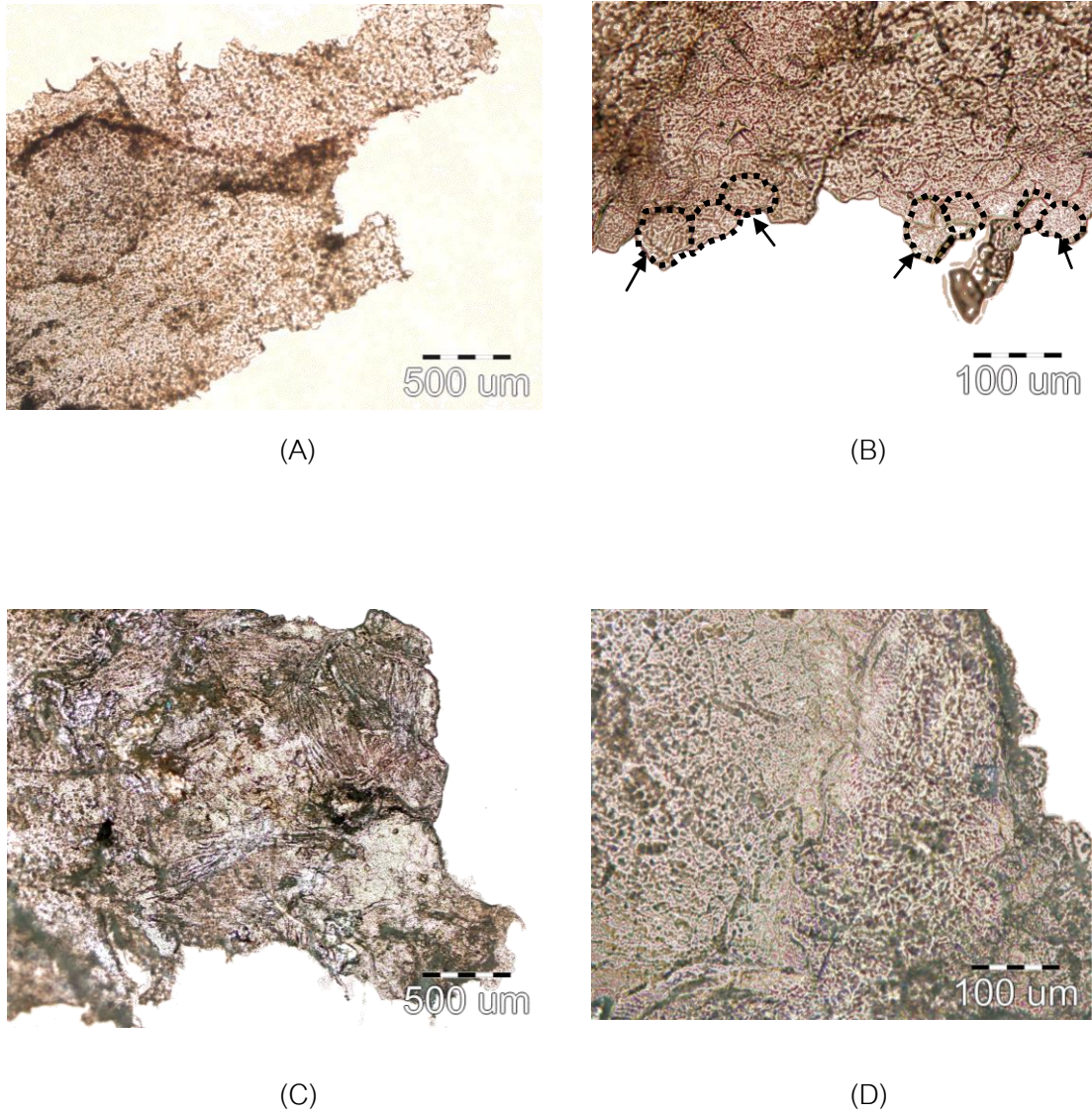


Figure 13: Epithelial cells appearance under polarized light microscope which found on silk sericin dressing (A) (B) and Bactigras<sup>®</sup> (C) (D) after peeling off at 4x and 20x magnification, respectively.

( ↑ indicated healthy cells on silk sericin dressing (86) while unable to detect the border of cells in Bactigras<sup>®</sup>)

Wound dressing characteristics after peeling off, both silk sericin dressing and Bactigras<sup>®</sup>, were observed for epithelial cells residues left on the dressing by visual observation, scanning electron microscope and polarized light microscope as shown in Figure 12 and Figure 13. At the time of spontaneously peeling off, silk sericin dressing had more stiffness and became black in color which was totally different from newly soft and white-yellow colored silk sericin dressing. Used Bactigras<sup>®</sup> were tightly stuck together to the several layers of absorbent gauzes. Moreover, cells remaining on the Bactigras<sup>®</sup> were likely to exhibit more tight attachment than those on silk sericin dressing. In addition, those epithelial cells residues were carefully removed and then observed under polarized light microscope. Thin layer of cells with obvious boundary with approximate cell diameter of 20-50  $\mu\text{m}$  and area of 500-1,000  $\mu\text{m}^2$  were noticed from silk sericin dressing samples. In contrast, cells from Bactigras<sup>®</sup> showed thick layers, irregular shape with some small blood occlusion spread on cell sheets.

## CHAPTER V

### DISCUSSION

This study conducted 2 experiments consists of phase I preliminary study to investigate the safety profile of the silk sericin dressing in healthy volunteers using patch test and phase II clinical efficacy and safety of this dressing for STSG donor site treatment compared with a fine mesh gauze impregnated with petrolatum and 0.5% chlorhexidine acetate, Bactigras<sup>®</sup>. The results from patch test indicated that silk sericin dressing was well-tolerated and safe to be used in clinical practice according to changes in healthy volunteers' skin colors, both erythema and melanin level, and HRIPT score comparable to Bactigras<sup>®</sup>. Clinical study in patients found that the length of time for complete healing of STSG donor sites treated with silk sericin dressing were significantly shorter than those treated with Bactigras<sup>®</sup>. All daily pain scores during 5 post-operative days were also statistically significant lower in STSG donor sites treated with silk sericin dressing than those treated with Bactigras<sup>®</sup>. Even though there were 2 STSG donor sites treated with silk sericin dressings showed some signs of infection and revealed microbial identification as *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*, these 2 donor sites healed in the duration comparable to other sites treated with Bactigras<sup>®</sup>. During the study period, the median of blood biochemistry data from patients including hepatic function, renal function, blood electrolytes and complete blood counts fell within the normal range of the laboratory value of King Chulalongkorn Memorial Hospital. Pro-inflammatory cytokines, IL-6 and TNF- $\alpha$ , were elevated on the first post-operative day and decreased to the baseline levels on 7-14 days thereafter. Epithelial cells found on the used silk sericin dressing after peeling off were likely to exhibit well-shaped border with thin layers.

Patch test has been developed to predict the potential of topical product to cause irritation or any local side effects on human skin (87). After such product pass the *in vitro* and *in vivo* safety test, it is important to apply directly on healthy human volunteers' skin to proof its safety profile. Silk sericin dressing which was verified for cytocompatibility in *in vitro* human keratinocyte cell culture and *in vivo* on rat skin in the previous study (25) was continued to investigate in the safety profile using human patch test. In this study, a total of 112 healthy volunteers aged 20-57 years were enrolled and 110 completed the test protocol which mean 98.21% success rate. This number corresponded with the recommendation of the Research Institute for Fragrance Materials that required at least 100 participants complete the patch testing procedure to ensure reliable data interpretation to larger population (81, 88). This number was also relatively high compared to many previous studies (89-92) which included only 10-30 healthy volunteers to test natural extract-containing preparations and concluded that those products were safe.

Diversity of patch test designs and assessments were mentioned (87). This study used 2 combined evaluation methods to quantify the irritation response including the noninvasively objective assessment by a skin colorimetric instrument (Mexameter MX18<sup>®</sup>) and subjective HRIPT score of skin irritation by 3 clinical dermatologists. All assessments for objective and subjective methods were performed at baseline and after 3 dressing patch attachments. Previous studies (93-96) reported that erythema and melanin index from the instrument showed well correlation with hemoglobin and melanin concentration under the skin which relatively reflected skin irritation response. Mechanism of skin irritation was still unclear. Andersen *et al.* (93) suggested multifactorial causes influenced in temporary local vasodilation, increase in hemoglobin infiltration and edema formation at the irritated area. Lisby S. *et al.* (97) indicated that skin irritation was a nonimmunological reaction. No immunological memory seems to be involved in eliciting irritant which differed from allergic skin reactions. Therefore, the development of skin irritation mostly occurred after the first patch was done and no



significantly increase in response to the following patches. Exposure of the skin to irritants often induces keratinocytes morphological changes, increased epidermal turnover and blood flow under the skin layers (97). Therefore, the patch outcome required not only objective skin colorimetric measurement but also subjective methods to detect any change in skin characteristics after applying with test product.

Our results indicated that mean erythema and melanin levels of healthy volunteers' skin at baseline were  $251.01 \pm 80.50$  and  $219.00 \pm 91.95$ , respectively which were comparable to those in the study by Maenthaisong *et al.* in 2009 (92) which were equal to  $228.60 \pm 48.54$  and  $220.22 \pm 40.35$ , respectively. However, these levels were slightly different from the results by Firooz *et al.* in 2012 (98) which indicated that erythema and melanin level of the human healthy volunteers at the age of 20-30 years were  $370.36 \pm 113.74$  and  $235.95 \pm 82.15$ . It may due to difference in ethnicity of the participants and difference in body location of measurement. Our study found that change in erythema and melanin levels of the back areas applied with silk sericin dressing and Bactigras<sup>®</sup> were insignificantly different with respect to time. The percentages of change in those values fell in 0.8-2.1% compared to baseline. Comparison between change in erythema and melanin level of areas applied with silk sericin dressing and Bactigras<sup>®</sup> also did not showed statistically significant ( $p > 0.05$ ). This result was comparable to the results by Akhtar *et al.* in 2008 (99) which studied the skin irritation potential of vitamin C and wheat protein emulsion compared with emulsion base and measured skin response on weekly basis. At the end of this study, the percentages of change in erythema and melanin levels from Mexameter MX18<sup>®</sup> did not exceed 2% from baseline level. Similar results also mentioned by Mahmood *et al.* in 2013 (90) that studied acute human skin irritation response to 4 botanical extracts emulsion. The results showed that the percentages of change in erythema and melanin index were 0.1-3.4% and 0.04-10.7%; respectively, from baseline. Both studies concluded that those formulations were safe and able to use as cosmetic products.

In addition to Mexameter MX18<sup>®</sup>, HRIPT scoring scale by 3 independent clinical dermatologists were done as the subjective evaluation. To eliminate the possibility of errors from recalling exactly how changes in skin characteristics, photos of the skin taken before treatment and at various intervals during the study period were provided as a series of the reactions (100). This current study found that HRIPT scores of the skin applied with silk sericin dressing were not significantly different from those applied with Bactigras<sup>®</sup> ( $p>0.05$ ). Percentage of skin irritation evaluations, calculated by the frequency of responses at every visit from 3 independent clinical dermatologists, of the skin applied with silk sericin dressing showed moderate erythema 0.9-5.2%, severe erythema 0-0.3%, moderate edema 0.6-1.5%, papules 2.1-7.3% with no existence of vesicle and bullae. These results were comparable to the study by Ibarra de Palacios *et al.* in 2002 (101). This study investigated the skin irritation potential of estradiol transdermal patch (Climara<sup>®</sup>, USA) in the size of 12.5 cm<sup>2</sup> in 99 healthy postmenopausal women. At the end of this study, the results indicated skin irritation responses scored as moderate erythema 3.0%, severe erythema 1.0% and mild edema 1.0%. Papules occurred in 34.3% of subjects which much higher incidence than current study. Even though the skin irritation responses were detected, the investigator concluded that this transdermal patch was well tolerated and now continues to use as a hormone replacement therapy for postmenopausal women. According to our present data from patch testing, both objective and subjective assessment, it can confirm in the safety of silk sericin dressing to be applied in clinic.

Clinically, the efficacy of silk sericin dressing on wound healing was verified in 28 patients with 30 STSG donor sites. STSG donor site represented an ideal wound model as it was uniform thickness with smooth surface and occurred under the sterilized environment. This study used side-by-side matched pair design by equally dividing STSG donor site within same patient for silk sericin dressing and Bactigras<sup>®</sup> application as similar to the protocol of many previous studies (102-105) in order to diminish confounding factors from underlying diseases and medications of the patients on wound

healing. In current study, average thickness of STSG harvesting was  $0.0110\pm 0.0018$  inch ( $0.280\pm 0.004$  mm) which was categorized in thin STSG according to the criteria of Andreassi *et al* (36). STSG donor site was matched with second degree burn or partial thickness wound which normally spontaneous heal within 14-21 days if there was no complication (106).

The goals of the ideal wound dressing for STSG donor sites were promotion of re-epithelialization, minimization of pain, and reduction of patient discomfort. Silk sericin dressing exhibited the promotion of re-epithelialization in current study. Our results indicated that overall wound healing, as determined as duration from the operative day to the day that the dressing spontaneously peeled off without causing pain (107), was significantly faster with silk sericin dressing than Bactigras<sup>®</sup> ( $12.00\pm 5.00$  and  $14.00\pm 5.25$  days, respectively). Silk sericin dressing properties were quite similar to foam combined with hydrocolloid which was classified as closed wound dressing (11). It provided occlusive moist environment for wound healing acceleration better than Bactigras<sup>®</sup> which classified as semi-opened dressing. This result conformed to completely healing time of STSG donor sites as found by Angspatt *et al* in 2011. In this study, time to completely heal of carboxymethyl chitosan-treated STSG donor sites was  $11.32\pm 2.55$  days while Bactigras<sup>®</sup>-treated donor sites required longer duration ( $15.03\pm 2.93$  days). Muangman *et al*. (65) also reported that the day of re-epithelialization was significantly shorter in patients treated with Telfa AMD<sup>®</sup> (polyhexamethylene biguanide-containing wound dressing in poly (ethylene terephthalate) polymer) compared to those treated with Bactigras<sup>®</sup> ( $9.25\pm 1.88$  and  $14.00\pm 3.05$  days, respectively). Similarly, the results found in the study by Demirtas *et al*. (60) and Brolmann *et al*. (108) also confirmed that occlusive close wound dressing achieved more rapid STSG donor site repair than fine mesh gauze due to providing moist environment with effective oxygen evaporation and facilitating epithelial cells migration from wound edges (109). The explanations of silk sericin dressing influence in promotion of re-epithelialization were not only providing optimal moist environment but also healing effect of silk sericin itself. Tsubouchi *et al*.

(72) proved that silk sericin increased *in vitro* cultured fibroblast cell proliferation and collagen production. Teramoto *et al.* (73) also showed that silk sericin elastic gel film effectively provided moist on wound surface and compatible to fibroblast cells. The study by Aramwit *et al.* (20) showed that silk sericin cream accelerate re-epithelialization and promoted collagen formation in full-thickness wound in rats which consistent with the study of silk sericin dressing by Siritienthong *et al.* (25). In addition, serial clinical studies of silver zinc sulfadiazine cream containing silk sericin showed wound healing acceleration and safe to be used in burn patients as found in the study by Namviriyachote *et al.* (76) and Palapinyo *et al.* (77). Recent study by Aramwit *et al.* (110) reported that time for complete healing of second-degree burn wounds treated with silver zinc sulfadiazine cream containing silk sericin was  $22.42 \pm 6.33$  days significantly lower than time for complete healing of those treated with silver zinc sulfadiazine cream without silk sericin ( $29.28 \pm 9.27$  days). According to the literature, silk sericin itself showed effective wound healing acceleration. Interestingly, we noticed that Bactigras<sup>®</sup>-treated STSG donor sites showed slightly darker skin color than silk sericin dressing-treated donor sites after complete healing. The darker skin after treated with Bactigras<sup>®</sup> may indicate the more inflammation and consequently increased epidermal melanocytes activity, occurred higher than the donor sites treated with silk sericin dressing. The darkening skin as a result of inflammation called postinflammatory hyperpigmentation was reported in previous studies (111, 112). Danielsen *et al.* in 2012 (113) indicated that skin hyperpigmentation may persist for 3 month post-operative period together with persistence of erythema of the skin after completely healing of STSG donor site. However, we did not follow the long-term post healed STSG donor site appearance. Further prospective study may continue the skin observation after complete STSG donor site treatment.

Apart from promotion of re-epithelialization, silk sericin dressing also showed obvious minimization of pain at STSG donor sites during the treatment course. On the first operative day, pain score of STSG donor sites, both treated with silk sericin

dressing and Bactigras<sup>®</sup>, were high because of environmental exposure of nociceptive nerve under the remaining dermis. However, significantly lower of pain score at STSG donor sites treated with silk sericin dressing was able to detect on the first operative day. Pain scores at the STSG donor site treated with silk sericin dressing continued to decrease with time to the lower level than those treated with Bactigras<sup>®</sup>, on overall 5 days post-operation. Similar results also found in the many previous studies that pain scores of STSG donor sites applied with fine mesh gauze were significantly higher than those applied with closed wound dressing (3, 60, 64, 65). World Union of Wound Healing Societies (114) suggested that dressing selection is one of the important factors in wound pain control. Moisture balanced dressings were recommended due to evidences reported that particularly reduced wound pain better than non-moist dressings. Non-moist dressing, including Bactigras<sup>®</sup>, rapidly dried out in a short period of time and aggressive attached on wound bed which participated in pain exacerbation. In contrast, moist dressing such as silk sericin dressing was able to maintain moisture balance with low adherence on wound which was favorable in pain minimization.

Unexpectedly, silk sericin dressing failed to protect wound microbial contamination in 2 donor sites. There were signs of infection defined as excessive purulent exudate, wound or wound edge discoloration, edema, redness and inflammation in combination with clinical examination (8) as shown in Figure 14 concomitant with microbial identification reported *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. Similar results found in STSG donor sites treated with polyurethane foam (Allevyn<sup>®</sup>, Smith&Nephew, UK) in the study by Argirova *et al.* in 2007 (115). Two wound infections were observed on the fourth day of treatment of which *S. aureus* and *P. aeruginosa* were identified. The microbial numbers were below the critical values of infection ( $<10^5$  colony forming unit/mL). The investigator also mentioned that the first polyurethane foam dressing was saturated with blood in 2 patients, and that required change after 24 hours of the application. Higgins *et al.* in 2012 (116) also observed that exudate collected under the polyurethane dressing lifted it from the

wound bed. Clinical observation of infection occurred in 2 wounds (11.1%) which were swabbed for microbial culture. Isolated microorganisms were methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) and *P. aeruginosa*. Again, the microbial numbers were below the critical values of infection ( $<10^5$  colony forming unit/mL); therefore, no additional treatment required for the patients. Generally, STSG donor site produced moderate amounts of exudate according to local inflammation response in the first few post-operative days to provide cells nutrient supply and enhance cells migration (117). In case of much heavily exudative production exceeded the fluid holding capacity of silk sericin dressing, the dressing were then oozy and displaced which increased risk of infection. The leakage of exudate may cause wound edge maceration and moisture-associated skin damage. Silk sericin itself was unlikely to cause infection due to some antimicrobial activity as shown in the previous studies (118, 119). In contrast, fine meshing feature of Bactigras<sup>®</sup> allowed fluid drainage to several layers of secondary absorbent gauzes which could be changed in case of leakage. Moreover, Bactigras<sup>®</sup> contained chlorhexidine which limited the bacterial colonization and minimized bacterial load on wound better than non-mediated dressing (120). Therefore, after STSG donor sites were detected signs of infection, Bactigras<sup>®</sup> were immediately chosen to cover all donor sites regardless microbial identification results. It was then noted that silk sericin dressing was appropriate for low to moderate exudative wound in order to achieve effective wound repair; otherwise, dressing changes were required to avoid leakage of excessive exudate.



Figure 14: STSG donor sites with signs of infection.

(Left treated with Bactigras<sup>®</sup> and right treated with silk sericin dressing)

As the results of infection, time for complete healing of STSG donor sites required longer time to heal, approximately double duration compared to non-infected donor sites. Pain scored of infected STSG donor sites significantly sustained in higher levels than non-infected donor sites after the first post-operative day. Mudge *et al.* (121) mentioned about a connection between wound infection, the occurrence of pain and wound healing impairment. The inflammatory response stimulated by the invading microorganisms leads to the expression of free radicals and release of inflammatory mediators from immune cells. The inflammation and tissue damage may also increase the sensitivity of the pain receptors increasing the overall perception of pain that interfere wound healing.

To confirm the systemic safety profile of silk sericin dressing, blood biochemistry data of the patients at baseline and 7-14 days post-operation were evaluated. Hepatic

function, renal function, FBS, blood electrolytes and complete blood count were measured to monitor patient status during surgery. Both pre- and post-operation, all median of blood biochemistry data of the patients included in the study fell within the normal range of King Chulalongkorn Memorial Hospital laboratory value. Concerning signs of infection, WBC of the patients with infected STSG donor sites were significantly higher than other patients after surgery. This result indicated immune response of the patient against pathogens or foreign bodies which conformed to what found in the study by Takahashi et al. in 2001 (122). The investigator showed that WBC levels increased immediately after spinal posterior decompression surgery but found significantly higher level in the surgery with instrumentation ( $12,226 \pm 882/\mu\text{L}$  in the instrumentation group and  $9,302 \pm 473/\mu\text{L}$  in the group with no instrumentation). The same investigator also reported that average WBC counts in the patient who developed postoperative surgical infection (123) were  $8,858 \pm 707/\mu\text{L}$  which significantly higher in non-infected patients (approximately  $6,000/\mu\text{L}$ ). Other than WBC count, albumin level of the patients with infected STSG donor sites also significantly lower than other patients which may infer poor nutritional status of these patients. Legendre *et al.* (124) found that the patients who had serum albumin level less than 3.5 g/dL exhibited poor healing prognosis and increase risk of infection. However, it must be noted that these parameters were also affected by not only STSG donor sites but severity of the defect at recipient sites as well.

In addition to the blood biochemistry data, systemic pro-inflammatory cytokines was also evaluated. Many studies have been interested in IL-6 and TNF- $\alpha$  measurement as predictive parameters for disease progression or consequence of inflammatory response in the patients undergoing any surgical procedures (125-127). Martin *et al.* (83) reported high concentrations of circulating IL-6 and TNF- $\alpha$  in patients with septic shock ( $15,627 \pm 4,336$  pg/mL and  $42 \pm 7$  pg/mL, respectively). Changes in both IL-6 and TNF- $\alpha$  were correlated with outcome, higher values being found in patients likely to die. In the study by Damas *et al.* (84), critically ill patients with documented infections were included. The mean peak value of TNF- $\alpha$  during septic shock was  $735.9 \pm 873$  pg/mL



while it was  $67.1 \pm 63.7$  pg/mL in patients without septic shock. Serum TNF- $\alpha$  was less than 100 pg/mL considered as normal level of the patient with no systemic infection. IL-6 serum levels were in the range of 10 and 1000 pg/mL during acute graft rejection or after surgery. The higher in serum IL-6 level, the higher mortality rate of the patients. Likewise, other studies indicated that these pro-inflammatory cytokines elevation correlated with high risk of mortality in burn patient with inhalation injuries (128) and increase risk of infection in patient undergoing cardiac surgery (129). In this study, we found relatively low levels of serum IL-6 and TNF- $\alpha$  than those found in the study by Martin *et al.* and Damas *et al* (83, 84). However, serum IL-6 and TNF- $\alpha$  elevation at the first post-operative day indicated inflammatory response to surgical trauma and then decreased to the baseline level within 7-14 days post-operation similar to what found in the previous studies (126, 130). We also detected higher elevated levels of IL-6 and TNF- $\alpha$  in the patients with infected donor sites compared with patients who had non-infected wounds. Again, these parameters were also affected by the severity of the defect at recipient sites in addition to STSG donor sites.

Interestingly, this study also observed wound dressing characteristics after peeling off, both silk sericin dressing and Bactigras<sup>®</sup>, for epithelial cell residues left on the dressing. Those cell residues on silk sericin dressing exhibited thin layer of cells with approximate cell area of  $500-1,000 \mu\text{m}^2$  while cells from Bactigras<sup>®</sup> showed thick layers, unclear border, and irregular shape with some small blood occlusion spread on cell sheets. According to the study by Holzle in 1977 (86), normal skin mostly showed obvious outline of cell border with symmetrical hexagonal or pentagonal regular shape. Average normal cell sizes were  $980 \mu\text{m}^2$  at scapular region and  $1000 \mu\text{m}^2$  at hip area. While skin from patients with allergic contact dermatitis showed 15% smaller than normal with irregular shape and asymmetrical trabeculae. 0.1% tretinoin solution contact induce dermatitis also exhibited irregular shaped cells and returned to normal within 3 weeks after stop tretinoin. Similar results were found by Kashibuchi *et al.* in 2002 (131). This study collected normal skin from cheek and upper arm and observed in three-

dimensional mannered under atomic force microscope. Healthy cells were flat and regular shape while cells from atopic dermatitis and psoriasis were thicker and uneven shape related to impair skin barrier function, reduce water-holding capacity and further increased in skin turnover rate. In addition, Guz *et al.* in 2009 (132) observed corneocytes in the skin flakes adhered to the tape used in the stripping method. Normal cell shapes were similar to what mentioned in the study by Holzle (86). The investigator also reported that corneocytes from backhand areas of the 8-year old participants were  $600\text{--}850\ \mu\text{m}^2$  and  $800\text{--}1,050\ \mu\text{m}^2$  of 81-year old participants. The area distributions for forearm corneocytes ranged from  $600\text{--}1,000\ \mu\text{m}^2$  in young subjects to  $1,000\text{--}1,300\ \mu\text{m}^2$  in old subjects. In our study, cell residues on silk sericin dressing showed comparable size and shape to the healthy corneocytes inferred better quality of renew skin tissues at the donor sites. On the other hand, cells on used Bactigras<sup>®</sup> cannot identify definite size and shape with thick layers which may be a result from damage of new skin formation by strongly wound adherence. Moreover, it can be noticed from current study that at the time of complete healing and wound dressing spontaneously peeling off, new skin coverage at STSG donor sites showed dry rough scales which easy to cracked or fissured due to incomplete formation of underlying skin appendages and these can cause itching sensation to the patients (133). The itch greatly induces scratching of the skin followed by damage the wound which was just completely healing. Therefore, itching evaluation after complete healing of STSG donor sites should be assessed in further study to provide information about the quality of new skin tissue formation result from different wound dressings.

## CHAPTER VI

### CONCLUSION

This prospective randomized-controlled study investigated the safety profile of silk sericin dressing by patch test in healthy volunteers from April 2011 to January 2012 at the Department of Pharmacy Practice, Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University and Police General Hospital, Bangkok, Thailand and the clinical efficacy of this dressing for STSG donor site treatment compared with petrolatum-impregnated fine mesh gauze, Bactigras<sup>®</sup> from March to December 2012 at the Division of plastic and reconstructive surgery, Department of Surgery, King Chulalongkorn Memorial Hospital, Bangkok, Thailand.

Data from 110 healthy volunteers who complied with patch testing protocol were analyzed regardless of 1.72% drop-out rate. Patch testing was done by randomly applying silk sericin dressing and Bactigras<sup>®</sup> on the back for 3 days, done for 2 times in the induction phase. Seven and ten days later, both dressings were repeat applied on the same areas and left for another 3 days in the challenge phase. At the time of enrollment and every visit, erythema and melanin values were repeat measured 10 times per area by Mexameter MX18<sup>®</sup> together with photos of the back were taken within 30 minutes after dressing removal. The results showed that the levels of erythema and melanin of the skin at baseline and changes in skin colors after contacting with silk sericin dressing were comparable to those of the skin contacted with Bactigras<sup>®</sup> during the study procedure. Statistically testing by repeated measures ANOVA found that there was no significant difference of erythema and melanin values between the testing materials ( $p=0.906$  and  $0.820$ , respectively). Moreover, visual local irritations occurred on the back area were separately evaluated with HRIPT scoring scale by 3 independent

clinical dermatologists through photos taken during the study. All dermatologists mainly reported skin responses of the volunteers as mild erythema, slightly edema and few percentages of papule occurrences with no existence of vesicle and bullae. No considerable irritation on the skins contacted with silk sericin dressing compared to those contacted with Bactigras<sup>®</sup>. Thus, it can be concluded that silk sericin dressing was well-tolerated and safe to be used in patients.

Clinical study was conducted to determine the efficacy of silk sericin dressing compared to Bactigras<sup>®</sup> for STSG donor site treatment. Twenty-eight patients with 30 STSG donor sites were enrolled into the study with no drop-out. Donor sites were predominantly indicated for acute trauma treatment such as car crash and open fracture. Average STSG donor site area was  $124.74 \pm 86.72 \text{ cm}^2$  and the depth was  $0.0110 \pm 0.0018$  inch, respectively. After harvesting, the donor sites were equally divided into two parts as the cephalic half and caudal half to determine the efficacy and safety of silk sericin dressing compared with Bactigras<sup>®</sup>. Both dressings were then covered with several layers of sterile gauzes and elastic bandages. The time for complete healing of the donor sites defined as the duration from the operative day to the day that the dressing material spontaneously peeled off without causing pain, and wound underneath exhibited complete epithelialization without fluid leakage were equal to  $12.00 \pm 5.00$  and  $14.00 \pm 5.25$  days of the donor sites treated with silk sericin dressing and Bactigras<sup>®</sup>, respectively ( $p=1.99 \times 10^{-4}$ ). Considering the position of the treatment, donor sites treated with silk sericin dressing also showed significant shorter time for complete healing than those treated with Bactigras<sup>®</sup> ( $p=0.033$ ).

In this study, 2 silk sericin dressing-treated donor sites (6.7%) showed signs of infection including excessive purulent exudate, wound edema and redness while no sign of infection in Bactigras<sup>®</sup>-treated sites. Wound swabs at the suspected area were performed by surgeons and found *Staphylococcus aureus* in one donor's exudate along with *Pseudomonas aeruginosa* in another donor's exudate without indicated

quantification. After clean up by 10% povidone-iodine solution and normal saline solution, all infected wounds were covered with Bactigras<sup>®</sup> instead of silk sericin dressing because silk sericin dressing has no antimicrobial agent. The results exhibited that these donor sites required longer time to heal to be 25.00±14.00 days of the donor sites treated with silk sericin dressing and 24.00±12.00 days of the donor sites treated with Bactigras<sup>®</sup> ( $p=0.317$ ). In 5 postoperative days consecutively, pain scores of donor sites treated with silk sericin dressing were significantly lower than those treated with Bactigras<sup>®</sup> ( $p<0.05$  at every evaluations). Regarding the signs of infections, pain scores of infected donor sites increase and sustained higher than non-infected sites.

For safety profiles, blood biochemistry of the patients enrolled in study were analyzed. Hepatic and renal function parameters including AST, ALT, ALP and BUN were elevated at the time of enrollment and significant decrease in the next week of treatment. However, the median of all blood biochemistry data including hepatic functions, renal functions, electrolytes levels and blood compositions fell in the normal range of King Chulalongkorn Memorial Hospital's laboratory protocol. Moreover, systemic pro-inflammatory cytokines of the patients and cells attached to wound dressing characteristics were also investigated. The results found that IL-6 and TNF- $\alpha$  levels increased at the first post-operative day but then obviously decreased 7-14 days later which indicated the inflammatory response of the patients to the surgical procedure. Observation of cells attached to the silk sericin dressing under the microscope revealed definite border of the epithelial cells while cells on Bactigras<sup>®</sup> showed irregular shapes.

In summary, all results described above suggest that silk sericin dressing shows minimum local adverse events and gets acceptable safety profile by undergoing human patch test in healthy volunteers. Moreover, silk sericin dressing can accelerate wound healing process in STSG donor sites and reduce pain level compared to those treated with Bactigras<sup>®</sup>, a standard dressing. Even though we found 2 infected donor sites in

silk sericin dressing group but time for complete healing of these wounds were comparable to Bactigras<sup>®</sup> treatment. From blood biochemistry data, no significant adverse event was found in all study patients.

#### **Limitations of the present study**

1. Retentive tapes may interfere the patch test results which can infer to be false positive if tapes cause skin irritation itself or false negative if tapes detach too early and let the dressings away from the test area.
2. All healthy volunteers and patients included in the study were 18-65 years old which may not extrapolate to other groups.
3. This clinical study in Phase II assigned silk sericin dressing and Bactigras<sup>®</sup> to apply on the STSG donor sites in the same patients to avoid confounding factors from underlying diseases of the patients and STSG characteristics. However, it was difficult to obviously separate signs of infection, pain assessment and side effect of the two test dressings.

#### **Recommendations**

1. Further prospective studies to examine the efficacy and safety of silk sericin dressing in STSG donor site from separate individual patients are warranted.
2. Nutritional status of the patients before and during enrolling in the study should be assessed. Surgery increases the patient's body need for energy and nutrients. It may be contributed to clinical problems during the wound repair such as poor healing and infection.
3. Silk sericin dressing is appropriate for dry wound or low to moderate exudative wound in order to achieve the most effective wound repair; otherwise, dressing changes are required to avoid leakage of excessive exudate.

## References

- (1) Andreassi A., Bilenchi R., Biagioli M., D'Aniello C. Classification and pathophysiology of skin grafts. Clinics in Dermatology 23,4 (2005): 332-7.
- (2) Hierner R., Degreef H., Vranckx JJ., Garmyn M., Massagé P., van Brussel M. Skin grafting and wound healing--the "dermato-plastic team approach". Clinics in Dermatology 23,4 (2005): 343-52.
- (3) Voineskos S.H., Ayeni O.A., McKnight L., Thoma A. Systematic Review of Skin Graft Donor-Site Dressings. Plastic and Reconstructive Surgery 124,1 (2009): 298-306.
- (4) Maitra A.K. Use of the split-skin graft in casualty practice. Resuscitation 5,3 (1976): 205-9.
- (5) Valencia I.C., Falabella A.F., Eaglstein W.H. Skin grafting. Dermatologic Clinics 18,3 (2000): 521-32.
- (6) MedMarket Diligence L. Prevalence of dermal applications for sealants and glues. Worldwide Surgical Sealants, Glues and Wound closure 2009-2013.
- (7) Siritientong T. Prevalence and treatment of split-thickness skin graft in King Chulalongkorn Memorial Hospital. 3345703 Special problems in pharmaceutical care, Department of Pharmacy Practices, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, 2010.
- (8) Kornhaber R. Skin Graft Management Guidelines. Northern Sydney Central Coast Health (2010): 1-20.
- (9) วิจิตรา กุสุมภ์. การพยาบาลผู้ป่วยที่มีบาดแผล. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพมหานคร: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2546.
- (10) Wound Donor Site Management Guideline. Northern Sydney Central Coast Health. (2008): 1-13.
- (11) Feldman D.L. Which Dressing for Split-Thickness Skin Graft Donor Sites? Annals of Plastic Surgery 27,3 (1991): 288-91.

- (12) Watanasit Y., Jitsurong S., Wansu F., Chichareon V. The application of cellulose (Thainanocell<sup>®</sup>) wound dressing on acute wound with partial thickness loss. Songkla Med J 27,3 (2009): 235-47.
- (13) Shevchenko R.V., James S.L., James S.E. A review of tissue-engineered skin bioconstructs available for skin reconstruction. J R Soc Interface 7 (2010): 229-58.
- (14) Harding K., Cutting K., Price P. The cost-effectiveness of wound management protocols of care. Br J Nurs 9,19 (2000): 6-10.
- (15) Fabiani C., Pizzichini M., Spadoni M., Zeddita G. Treatment of waste water from silk degumming processes for protein recovery and water reuse. Desalination 105,1-2 (1996): 1-9.
- (16) Vaithanomsat P., Kitpreechavanich V. Sericin separation from silk degumming wastewater. Separation and Purification Technology. 2008;59(2):129-33.
- (17) Padamwar M.N., Pawar A.P., Daithankar A.V., Mahadik K.R. Silk sericin as a moisturizer: an in vivo study. Journal of Cosmetic Dermatology 4,4 (2005): 250-7.
- (18) Terada S., Yanagihara K., Kaito K., Miki M., Sasaki M., Tsujimoto K., et al. Silk Protein Sericin Accelerates Proliferation of Various Mammalian Cells. In: Gòdia F., Fussenegger M. (ed.), Animal Cell Technology Meets Genomics ESACT Proceedings 2, pp. 585-7. Netherlands: Springer, 2005.
- (19) Dash R., Acharya C., Bindu P., Kundu S. Antioxidant potential of silk protein sericin against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in skin fibroblasts. BMB Rep 41,3 (2008): 236-41.
- (20) Aramwit P., Sangcakul A. The Effects of Sericin Cream on Wound Healing in Rats. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry 71,10 (2007): 2473-7.
- (21) Aramwit P., Kanokpanont S., De-Eknamkul W., Srichana T. Monitoring of inflammatory mediators induced by silk sericin. Journal of Bioscience and Bioengineering 107,5 (2009): 556-61.



- (22) Palapinyo S., Muangman P., Aramwit P. Systemic Safety of Silver Zinc Sulfadiazine with Silk Sericin Cream for Burn Wound Treatment. KKU Res J 16,8 (2011): 1014-24.
- (23) Chen G., Ushida T., Tateishi T. Scaffold Design for Tissue Engineering. Macromolecular Bioscience 2,2 (2002): 67-77.
- (24) Siritientong T., Srichana T., Aramwit P. The Effect of Sterilization Methods on the Physical Properties of Silk Sericin Scaffolds. AAPS PharmSciTech 12,2 (2011): 771-81.
- (25) Siritienthong T., Ratanavaraporn J., Aramwit P. Development of ethyl alcohol-precipitated silk sericin/polyvinyl alcohol scaffolds for accelerated healing of full-thickness wounds. International Journal of Pharmaceutics 439,1-2 (2012): 175-86.
- (26) Hattingh J. The relationship between skin structure and transepidermal water loss. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology 45,3 (1973): 685-8.
- (27) Berardesca E., Maibach H. Ethnic skin: Overview of structure and function. Journal of the American Academy of Dermatology 48,6, Supplement 1 (2003): S139-S42.
- (28) Williams C.A. Structure and functions of human skin. In: Williams C.A., (ed), Transdermal and Topical Drug Delivery 1 ed. pp. 1-25. London: Pharmaceutical Press; 2003.
- (29) Streilein J.W. Skin-associated lymphoid tissue. Immunology series 46 (1989): 73-96.
- (30) Lazarus G. Definitions and guidelines for assessment of wounds and evaluation of healing. Archives of Dermatology 130,4 (1994): 489-93.
- (31) Velnar T., Bailey T., Smrkolj V. The Wound Healing Process: An Overview of the Cellular and Molecular Mechanisms. Journal of International Medical Research 37,5 (October 2009): 1528-42.

- (32) Boateng J.S., Matthews K.H., Stevens H.E., Eccleston G.M. Wound healing dressings and drug delivery systems: A review. Journal of Pharmaceutical Sciences 97,8 (2008): 2892-923.
- (33) Li J., Chen J., Kirsner R. Pathophysiology of acute wound healing. Clinics in Dermatology 25,1 (2007): 9-18.
- (34) Broughton G., Janis J.E., Attinger C.E. The basic science of wound healing. Plastic and reconstructive surgery 117,7 Suppl (2006): 12S-34S.
- (35) Nauta A., Gurtner G., Longaker M.T. Wound healing and regenerative strategies. Oral diseases 17,6 (2011): 541-9.
- (36) Korting H.C., Schöllmann C., White R.J. Management of minor acute cutaneous wounds: importance of wound healing in a moist environment. Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology 25,2 (2011): 130-7.
- (37) Visse R., Nagase H. Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases: Structure, Function, and Biochemistry. Circulation Research. 92,8 (May 2003): 827-39.
- (38) Chen X., Chen H., Zhang G. Management of wounds with exposed bone structures using an artificial dermis and skin grafting technique. Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery 63,6 (2010): e512-e8.
- (39) Rodriguez P.G., Felix F.N., Woodley D.T., Shim E.K. The Role of Oxygen in Wound Healing: A Review of the Literature. Dermatologic Surgery 34,9 (2008): 1159-69.
- (40) Edwards R., Harding K.G. Bacteria and wound healing. Current Opinion in Infectious Diseases 17,2 (2004): 91-6.
- (41) Holt D.R., Kirk S.J., Regan M.C., Hurson M., Lindblad W.J, Barbul A. Effect of age on wound healing in healthy human beings. Surgery 112,2 (1992) :293-7; discussion 7-8.
- (42) Gosain A., DiPietro L.A. Aging and Wound Healing. World J Surg 28,3 (March 2004): 321-6.

- (43) Anaya D., Dellinger E. The obese surgical patient: a susceptible host for infection. Surgical Infection 7,5 (2006): 473-80.
- (44) Gary Sibbald R, Woo KY. The biology of chronic foot ulcers in persons with diabetes. Diabetes/Metabolism Research and Reviews 24,S1 (2008): S25-S30.
- (45) Walburn J., Vedhara K., Hankins M., Rixon L., Weinman J. Psychological stress and wound healing in humans: A systematic review and meta-analysis. Journal of Psychosomatic Research 67,3 (2009): 253-71.
- (46) Franz M., Steed D., Robson M. Optimizing healing of the acute wound by minimizing complications. Current Problem in Surgery 44 (2007): 691-763.
- (47) Radek K.A., Matthies A.M., Burns A.L., Heinrich S.A., Kovacs E.J., DiPietro L.A. Acute ethanol exposure impairs angiogenesis and the proliferative phase of wound healing. American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology. 289,3 (September 2005): H1084-H90.
- (48) Sørensen L.T. Wound Healing and Infection in Surgery: The Pathophysiological Impact of Smoking, Smoking Cessation, and Nicotine Replacement Therapy: A Systematic Review. Annals of Surgery 255,6 (2012): 1069-79.
- (49) Wild T., Rahbarnia A., Kellner M., Sobotka L., Eberlein T. Basics in nutrition and wound healing. Nutrition 26,9(2010): 862-6.
- (50) Stechmiller J.K. Understanding the Role of Nutrition and Wound Healing. Nutrition in Clinical Practice 25,1 (February 2010): 61-8.
- (51) Benichou G., Yamada Y., Yun S.H., Lin C., Fray M., Tocco G. Immune recognition and rejection of allogeneic skin grafts. Immunotherapy 3,6 (2011): 757-70.
- (52) McGregor A.D., McGregor I.A. Free skin grafts. In: McGregor AD, McGregor IA, (ed). Fundamental techniques of plastic surgery and their surgical applications. 10th ed. pp. 35-59. London: Churchill Livingstone, 2000.
- (53) Leung J.J., Fish J. Skin Grafts; review. University of Toronto Medical Journal 86,2 (2009): 61-4.

- (54) Rudolph R.B., Donald L. Skin Grafts. In: Saunders W (ed), Plastic surgery pp. 221-74. Philadelphia: Saunders W.B. Company, 1990.
- (55) Geary P.M., Tiernan E. Management of split skin graft donor sites – results of a national survey. Journal of Plastic, Reconstructive Aesthetic Surgery 62,12 (2009): 1677-83.
- (56) Sarabahi S. Recent advances in topical wound care. Indian Journal of Plastic Surgery. 45,2 (2012): 379-87.
- (57) Muengman P. Benefit and cost effectiveness of various wound dressing. Frontier in Wound Care. 2010: 80-97.
- (58) JBI. Split Skin Graft Donor Sites: Post Harvest Management. Best Practice. 6,2 (2002): 1-5.
- (59) Murphy P.S., Evans G.D. Advances in Wound Healing: A Review of Current Wound Healing Products. Plastic Surgery International (2012): 1-8.
- (60) Demirtas Y., Yagmur C., Soylemez F., Ozturk N., Demir A. Management of split-thickness skin graft donor site: A prospective clinical trial for comparison of five different dressing materials. Burns 36,7 (2010): 999-1005.
- (61) Stojadinovic A., Carlson J.W., Schultz G.S., Davis T.A., Elster E.A. Topical advances in wound care. Gynecologic Oncology 2, Supplement (2008): S70-S80.
- (62) Okan D., Woo K., Ayello E.A., Sibbald G. The Role of Moisture Balance in Wound Healing. Advances in Skin & Wound Care 20,1 (2007): 39-53.
- (63) Bactigras [online] 2011. Available from: <http://wound.smith-nephew.com/uk/Product.asp?NodeId=1786>. [2011, December 5].
- (64) Barnea Y., Amir A., Leshem D., Zaretski A., Weiss J., Shafir R., et al. Clinical Comparative Study of Aquacel and Paraffin Gauze Dressing for Split-Skin Donor Site Treatment. Annals of Plastic Surgery 53,2(2004): 132-6.
- (65) Muangman P., Nitimonton S., Aramwit P. Comparative Clinical Study of Bactigras and Telfa AMD for Skin Graft Donor-Site Dressing. International Journal of Molecular Sciences 12 (2011): 5031-8.

- (66) Angspatt A., Taweerattanasil B., Janvikul W., Chokrungvaranont P., Wimon S. Carboxymethylchitosan, alginate and tulle gauze wound dressings: a comparative study in the treatment of partial-thickness wounds. Asian Biomedicine 5,3 (2011): 413-6.
- (67) Kundu S.C., Dash B.C., Dash R., Kaplan D.L. Natural protective glue protein, sericin bioengineered by silkworms: Potential for biomedical and biotechnological applications. Progress in Polymer Science 33,10 (2008): 998-1012.
- (68) Padamwar M., Pawar A. Silk sericin and its applications: a review. Journal of Scientific and Industrial Research 63 (2004): 323-9.
- (69) Zhang Y-Q. Applications of natural silk protein sericin in biomaterials. Biotechnology Advances 20,2 (2002): 91-100.
- (70) Mondal M., Trivedy K., Kumar N.S. The silk proteins, sericin and fibroin in silkworm, *Bombyx mori* Linn., - A review. Caspian Journal of Environmental Science 5,2 (2007): 63-76.
- (71) Aramwit P., Kanokpanont S., Nakpheng T., Srichana T. The Effect of Sericin from Various Extraction Methods on Cell Viability and Collagen Production. International Journal of Molecular Sciences 11.5 (2010): 2200-11.
- (72) Tsubouchi K., Igarashi Y., Takasu Y., Yamada H. Sericin Enhances Attachment of Cultured Human Skin Fibroblasts. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry 69,2 (2005): 403-5.
- (73) Teramoto H., Kameda T., Tamada Y. Preparation of Gel Film from *Bombyx mori* Silk Sericin and Its Characterization as a Wound Dressing. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry 72,12 (2008): 3189-96.
- (74) Teramoto H., Nakajima K-i, Takabayashi C. Preparation of Elastic Silk Sericin Hydrogel. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry 69,4 (2005): 845-7.
- (75) Panilaitis B., Altman G.H., Chen J., Jin H-J, Karageorgiou V., Kaplan D.L. Macrophage responses to silk. Biomaterials 24,18 (2003): 3079-85.

- (76) Namviriyachote N., Aramwit P., Palapinyo S., Muengman P. Case report: Topical silver zinc sulfadiazine for treatment of deep partial thickness burn wounds. Thai Journal of Burn Injury 4,7 (2010): 5-13.
- (77) Palapinyo S. Efficacy of silver zinc sulfadiazine cream containing silk sericin for burn wound therapy. Master's thesis, Department of Pharmacy Practices, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, 2011.
- (78) Tao W., Li M., Xie R. Preparation and Structure of Porous Silk Sericin Materials. Macromolecular Materials and Engineering 290,3 (2005): 188-94.
- (79) Aramwit P., Siritientong T., Kanokpanont S., Srichana T. Formulation and characterization of silk sericin-PVA scaffold crosslinked with genipin. International Journal of Biological Macromolecules 47,5 (2010): 668-75.
- (80) Aramwit P., Siritientong T., Srichana T., Ratanavaraporn J. Accelerated Healing of Full-Thickness Wounds by Genipin-Crosslinked Silk Sericin/PVA Scaffolds. Cells Tissues Organs 197 (2013): 224-38.
- (81) McNamee P., Api A., Basketter D., Gerberick G., Gilpin D., Hall B., et al. A review of critical factors in the conduct and interpretation of the human repeat insult patch test. Regulatory Toxicology and Pharmacology 52 (2008): 24-34.
- (82) Henderson C.R., Riley E.C. Certain statistical considerations in patch testing. Journal of Investigative Dermatology 6 (1945): 227-32.
- (83) Martin C., Boisson C., Haccoun M., Thomachot L., Mege J-L. Patterns of cytokine evolution (tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6) after septic shock, hemorrhagic shock, and severe trauma. Critical Care Medicine 25,11 (1997): 1813-9.
- (84) Damas P., Ledoux D., Nys M., Vrindts Y., Groote D., Franchimont P., et al. Cytokine Serum Level During Severe Sepsis in Human IL-6 as a Marker of Severity. Ann Surg 215,4 (1992): 356-62.
- (85) Guidance for industry. skin irritation and sensitization testing of generic transdermal drug product, (1999).

- (86) Hölzle E., Plewig G. Effects of dermatitis, stripping, and steroids on the morphology of corneocytes. A new bioassay. The Journal of investigative dermatology 68,6 (1977): 350-6.
- (87) Wahlberg J., Lindberg M. Patch Testing. In: Frosch P, Menné T, Lepoittevin J-P, (ed), Contact Dermatitis, pp. 365-90. Berlin Heidelberg: Springer, 2006..
- (88) Politano V.T., Api A.M. The Research Institute for Fragrance Materials' human repeated insult patch test protocol. Regulatory Toxicology and Pharmacology 52,1 (2008): 35-8.
- (89) Ali A., Akhtar N., Mumtaz A.M., Khan M.S., Iqbal F.M., Zaidi S.S. In vivo skin irritation potential of a cream containing Moringa oleifera leaf extract. African Journal of Pharmacy and Pharmacology 7,6 (2013): 289-93.
- (90) Mahmood T., Akhtar N. Short term study of human skin irritation by single application closed patch test: assessment of four multiple emulsion formulations loaded with botanical extracts. Cutaneous and Ocular Toxicology 32,1 (2013): 35-40.
- (91) Lai J., Xin C., Zhao Y., Feng B., He C., Dong Y., et al. Study of Active Ingredients in Black Soybean Sprouts and Their Safety in Cosmetic Use. Molecules 17 (2012): 11669-79.
- (92) Maenthaisong R., Chaiyakunapruk N., Warnnissorn P., Viyoch J. Cleansing lotion containing tamarind fruit pulp extract. III. Study of lightening efficacy and skin irritation on Asian skin type. ScienceAsia 35 (2009): 24-31.
- (93) Andersen P.H., Nangia A., Bjerring P., Maibach H.I. Chemical and pharmacologic skin irritation in man. Contact Dermatitis 25,5 (1991): 283-9.
- (94) Andersen P.H., Maibach H.I. Skin irritation in man: a comparative bioengineering study using improved reflectance spectroscopy. Contact Dermatitis 33,5 (1995): 315-22.
- (95) Yamamoto T., Takiwaki H., Arase S., Ohshima H. Derivation and clinical application of special imaging by means of digital cameras and Image J freeware for

- quantification of erythema and pigmentation. Skin Research and Technology 14,1 (2008): 26-34.
- (96) Taylor S.C. Skin of color: Biology, structure, function, and implications for dermatologic disease. Journal of the American Academy of Dermatology 46, 2, Supplement 2 (2002): S41-S62.
- (97) Lisby S., Baadsgaard O. Mechanisms of Irritant Contact Dermatitis. In: Frosch P, Menné T, Lepoittevin J-P, (ed), Contact Dermatitis, pp. 69-82. Berlin Heidelberg: Springer , 2006.
- (98) Firooz A., Sadr B., Babakoohi S., Sarraf-Yazdy M., Fanian F., Kazerouni-Timsar A., et al. Variation of Biophysical Parameters of the Skin with Age, Gender, and Body Region. The Scientific World Journal (2012): 5.
- (99) Akhtar N., Yazan Y. Formulation and in-vivo evaluation of a cosmetic multiple emulsion containing vitamin C and wheat protein. Pak J Pharm Sci 21,1 (2008): 45-50.
- (100) Runghava T. Formulation and evaluation of facial-patch containing asiaticoside using polysaccharide gel from fruit-hulls of durian. Master's Thesis, Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, 2005.
- (101) Ibarra de Palacios P., Schmidt G., Sergejew T., Quebe-Fehling E., Lockhart L., Krinsky L. Comparative study to evaluate skin irritation and adhesion of Estradot<sup>®</sup> and Climara<sup>®</sup> in healthy postmenopausal women. Climacteric 5,4 (2002): 383-9.
- (102) Hassanpour S.E., Moosavizadeh S.M., Yavari M., Mofrad H.H., Alireza F. Comparison of Three Different Methods of Dressing for Partial Thickness Skin Graft Donor Site. World J Plast Surg 2,1 (2013): 26-32.
- (103) Dornseifer U., Lonic D., Gerstung T.I., Herter F., Fichter A.M., Holm C., et al. The Ideal Split-Thickness Skin Graft Donor-Site Dressing: A Clinical Comparative Trial of a Modified Polyurethane Dressing and Aquacel. Plastic and Reconstructive Surgery 128,4 (2011): 918-24.



- (104) Melandri D., De Angelis A., Orioli R., Ponzelli G., Lualdi P., Giarratana N., et al.  
Use of a new hemicellulose dressing (Veloderm®) for the treatment of split-thickness skin graft donor sites: A within-patient controlled study. Burns 32,8 (2006): 964-72.
- (105) Innes M.E., Umraw N., Fish J.S., Gomez M., Cartotto R.C. The use of silver coated dressings on donor site wounds: a prospective, controlled matched pair study. Burns 27,6 (2001): 621-7.
- (106) Greenhalgh D.G. Wound healing. In: Herndon DN, (ed), Total Burn Care. 4 ed, pp. 578-95. New York: WB Saunders Co, 2007.
- (107) Ferreira L.M., Blanes L., Gragnani A., Veiga D.F., Veiga F.P., Nery G.B., et al.  
Hemicellulose dressing versus rayon dressing in the re-epithelialization of split-thickness skin graft donor sites: a multicenter study. Journal of Tissue Viability 18,3 (2009): 88-94.
- (108) Brolmann F.E., Eskes A.M., Goslings J.C., Niessen F.B., Bree R.D., Vahl A.C., et al.  
Randomized clinical trial of donor-site wound dressings after split-skin grafting. British Journal of Surgery 100 (2013): 619-27.
- (109) Wiechula R. The use of moist wound-healing dressings in the management of split-thickness skin graft donor site: a systematic review. International Journal of Nursing Practice 9 (2003): S9-S17.
- (110) Aramwit P., Palapinyo S., Srichana T., Chottanapund S., Muangman P. Silk sericin ameliorates wound healing and its clinical efficacy in burn wounds. Archives of Dermatological Research (2013): 1-10.
- (111) Epstein J.H. Postinflammatory Hyperpigmentation. Clinics in Dermatology 7,2 (1989): 55-65.
- (112) Lacz N.L., Vafaie J., Kihiczak N.I., Schwartz R.A. Postinflammatory hyperpigmentation: a common but troubling condition. International Journal of Dermatology 43,5 (2004): 362-5.

- (113) Danielsen P.L., Jorgensen L.N., Jørgensen B., Karlsmark T, S. Å. Erythema Persists Longer than One Year in Split-thickness Skin Graft Donor Sites. Acta Dermato Venereologica 92,3 (2012): 281-5.
- (114) World Union of Wound Healing Societies. Principles of best practice: Minimising pain at wound dressing-related procedures [online]. © WoundPedia Inc. 2007. Available from: [http://www.molnlycke.com/Old/Global/NewsAndEvents\\_Local/CA-EN/Best\\_Practice.pdf](http://www.molnlycke.com/Old/Global/NewsAndEvents_Local/CA-EN/Best_Practice.pdf). [2013, July 1]
- (115) Argirova M., Hadjiski O., Victorova A. Acticoat Versus Allevyn as a Split-Thickness Skin Graft Donor-Site Dressing: A Prospective Comparative Study. Annals of Plastic Surgery 59,4 (2007): 415-22.
- (116) Higgins L., Wasiak J., Spinks A., Cleland H. Split-thickness skin graft donor site management: a randomized controlled trial comparing polyurethane with calcium alginate dressings. International Wound Journal 9,2 (2012): 126-31.
- (117) Spear M. Wound Exudate—The Good, the Bad, and the Ugly. Plastic Surgical Nursing 32,2 (2012): 77-9.
- (118) Senakoon W., Nuchadomrong S., Sirimungkararat S., Senawong T., Kitikoon P. Antibacterial action of eri (samia ricini) sericin against escherichia coli and staphylococcus aureus. Asian Journal of Food and Agro-Industry. (2009) (Special Issue): S222-S8.
- (119) Sarovart S., Sudatis B., Meesilpa P., Grady B. The use of sericin as an antioxidant and antimicrobial for polluted air treatment. Review of Advanced Material Science 5 (2003): 193-8.
- (120) Andrews J.K., Buchan I.A., Horlington M. An experimental evaluation of a chlorhexidine medicated tulle gras dressing. 3 (1982) :149-57.
- (121) Mudge E., Orsted H. Wound infection & Pain management. Wounds International 1,3 (2010): 1-6.
- (122) Takahashi J., Ebara S., Kamimura M., Kinoshita T., Itoh H., Yuzawa Y., et al. Early-Phase Enhanced Inflammatory Reaction After Spinal Instrumentation Surgery. Spine 26,15 (2001): 1698-704.

- (123) Takahashi J., Shono Y., Hirabayashi H., Kamimura M., Nakagawa H., Ebara S., et al. Usefulness of White Blood Cell Differential for Early Diagnosis of Surgical Wound Infection Following Spinal Instrumentation Surgery. Spine 31,9 (2006): 1020-5.
- (124) Legendre C., Debure C., Meaume S., Lok C., Golmard J.L., Senet P. Impact of protein deficiency on venous ulcer healing. Journal of vascular surgery 48,3 (2008): 688-93.
- (125) Hao W., Chan I.Y., Liu X., Tang P.Y., Tam P.H., Wong K.Y. Early post-operative interleukin-6 and tumor necrosis factor- $\alpha$  levels after single-port laparoscopic varicocelectomy in children. Pediatr Surg Int 28 (2012): 281-6.
- (126) Esme H., Kesli R., Apiliogullari B., Duran F.M., Yoldas B. Effects of Flurbiprofen on CRP, TNF- $\alpha$ , IL-6, and Postoperative Pain of Thoracotomy. International Journal of Medical Sciences 8,3 (2011): 216-21.
- (127) Zelzer S., Aigner R.M., Khoschsorur G., Hofer H.P., Schaur R.J., Foldes-Papp Z. Comparative Study of the Immunological Marker IL-6 and the Non-Immunological Marker PCT in Surgery Patients with Infections and Multiple Trauma. The Open Pathology Journal 3 (2009): 124-30.
- (128) Gauglitz G.G., Finnerty C.C., Herndon D.N., Mlcak R.P., Jeschke M.G. Are serum cytokines early predictors for the outcome of burn patients with inhalation injuries who do not survive? Critical Care 12 (2008): R81.
- (129) Sander M., Heymann C.V., Dossow V.V., Spaethe C., Konertz W.F., Jain U., et al. Increased Interleukin-6 After Cardiac Surgery Predicts Infection. Anesth Analg 102 (2006): 1623-9.
- (130) Thomas D.R. Age-Related Changes in Wound Healing. Drugs & Aging 18,8 (2001): 607-20.
- (131) Kashibuchi N., Hirai Y., O'Goshi K., Tagami H. Three-dimensional analyses of individual corneocytes with atomic force microscope: morphological changes related to age, location and to the pathologic skin conditions. Skin Research and Technology 8,4 (2002): 203-11.

- (132) Guz N.V., Gaikwad R.M., Dokukin M.E., Sokolov I. A novel in vitro stripping method to study geometry of corneocytes with fluorescent microscopy: example of aging skin. Skin Research and Technology 15 (2009): 379-83.
- (133) Tagami H. Location-related differences in structure and function of the stratum corneum with special emphasis on those of the facial skin. International Journal of Cosmetic Science 30,6 (2008): 413-34.

## APPENDICES

## Appendix A



โรงพยาบาลตำรวจ  
สำนักงานแพทย์ใหญ่  
492/1 ถนนพระรามที่ 1 แขวงวังใหม่  
เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

เอกสารรับรองโครงการวิจัย  
โดย  
คณะกรรมการจริยธรรมและวิจัยของโรงพยาบาลตำรวจ

เลขที่หนังสือรับรอง วจ. 20 / 2114

ชื่อโครงการ/ภาษาไทย	- ความปลอดภัยของแผ่นเนื้อเยื่อปิดแผลผสมโปรตีนการไหมในอาสาสมัครสุขภาพดี
ชื่อโครงการ/ภาษาอังกฤษ	- SAFETY OF THE SILK SERICIN/PVA SCAFFOLD IN HEALTHY VOLUNTEERS
ชื่อหัวหน้าโครงการ / หน่วยงานที่สังกัด	นางสาวทิพวรรณ ศรีเกียรติทอง นิสิตหลักสูตรเภสัชศาสตรบัณฑิต สาขา วิชาการบริบาลทางเภสัชกรรม (นานาชาติ) คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย
รหัสโครงการ	-
สถานที่ทำการวิจัย	โรงพยาบาลตำรวจ
เอกสารรับรอง	1. แบบเสนอโครงการวิจัยเพื่อรับการพิจารณาจากคณะกรรมการจริยธรรมและ วิจัยของโรงพยาบาลตำรวจ Version 1.0 Dated 8 April 2011 2. ใบยินยอมเข้าร่วมในการวิจัย Version 1.0 Dated 8 April 2011 3. แบบสอบถามในการวิจัย Version 1.0 Dated 8 April 2011
รับรองโดย	คณะกรรมการจริยธรรมและวิจัยในมนุษย์โรงพยาบาลตำรวจ
วันที่รับรอง	8 เมษายน 2554
วันหมดอายุ	7 เมษายน 2555

หนังสือรับรองฉบับนี้ออกโดยความเห็นชอบในการพิจารณาจากคณะกรรมการจริยธรรมและวิจัยของ  
โรงพยาบาลตำรวจ ตามกฎเกณฑ์สากล

พลตำรวจตรี   
(ทรงชัย สิมะโรจน์)  
ประธานคณะกรรมการจริยธรรมและวิจัยของโรงพยาบาลตำรวจ

## Appendix B

### Stability test of wound dressing containing silk sericin

To determine the shelf-life of wound dressing containing silk sericin, such products in each batch were tested a number of characteristics according to ASEAN Guideline on Stability Study of Drug Product (2005) (1) and International Conference Harmonization (ICH) guideline (2006) (2) prior to be used practically. Sterilized wound dressings containing silk sericin were packed in tightly sterile plastic bags and kept under  $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  with  $75\% \pm 5\%$  relative humidity according to the recommendation in the topic of storage condition for new drug substances and products for patch or devices applied on the skin (1). After completion of desired days of incubation; day 7, 14, 30, 60 and 90, 9 wound dressings containing silk sericin at each time point were sampling for physical and chemical characterization compared to dressing at day 0 (sample before keeping in storage condition). The details of characterization test were provided as following:

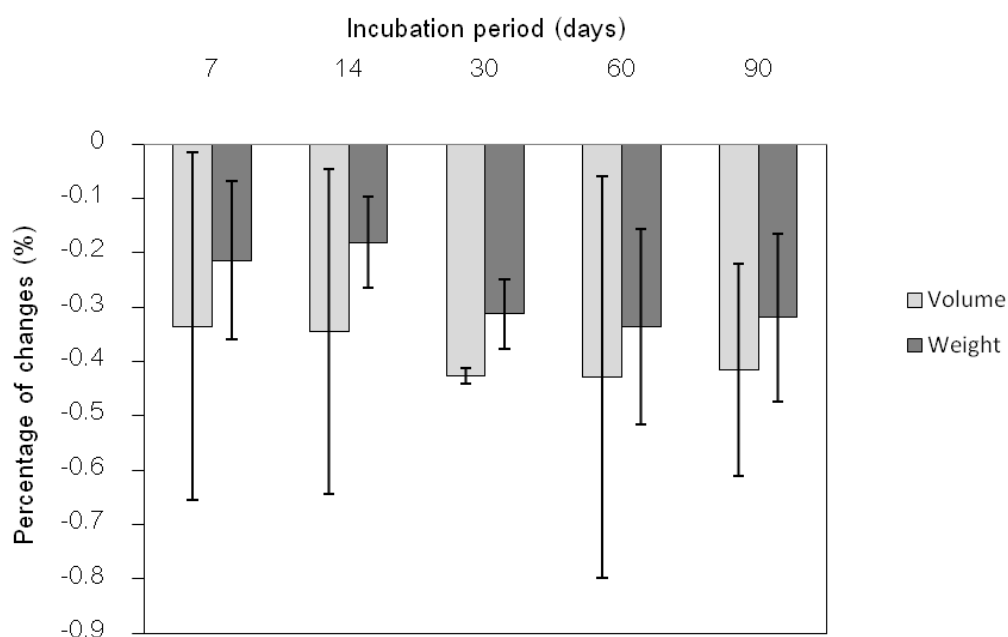
#### 1. Appearance

The characteristics of wound dressing containing silk sericin after 7, 14, 30, 60 and 90 days incubation were examined. All samples were measured the outer dimension with micrometer (Mitutoyo Corporations, Japan) for volume changes calculation compared to the beginning volume at baseline. Moreover, incubated wound dressing containing silk sericin were weighed on an electronic precision balance model AB204-S (Mettler Toledo Inc., US). Weight changes of each sample were calculated by percentage of different between initial and final weight of samples.

The results of volume and weight changes after each time of incubation was shown in Figure 1. All samples had slightly decreased in both volume and weight. All

final volume and weight of samples decreased less than 1% and 0.5% from their initial values, respectively. These may be the results of small amount of water inside the sample loss during incubation and let their dimensions altered slightly.

Comparing between at each sampling time; however, volume and weight of the samples did not significantly change among these incubation periods.



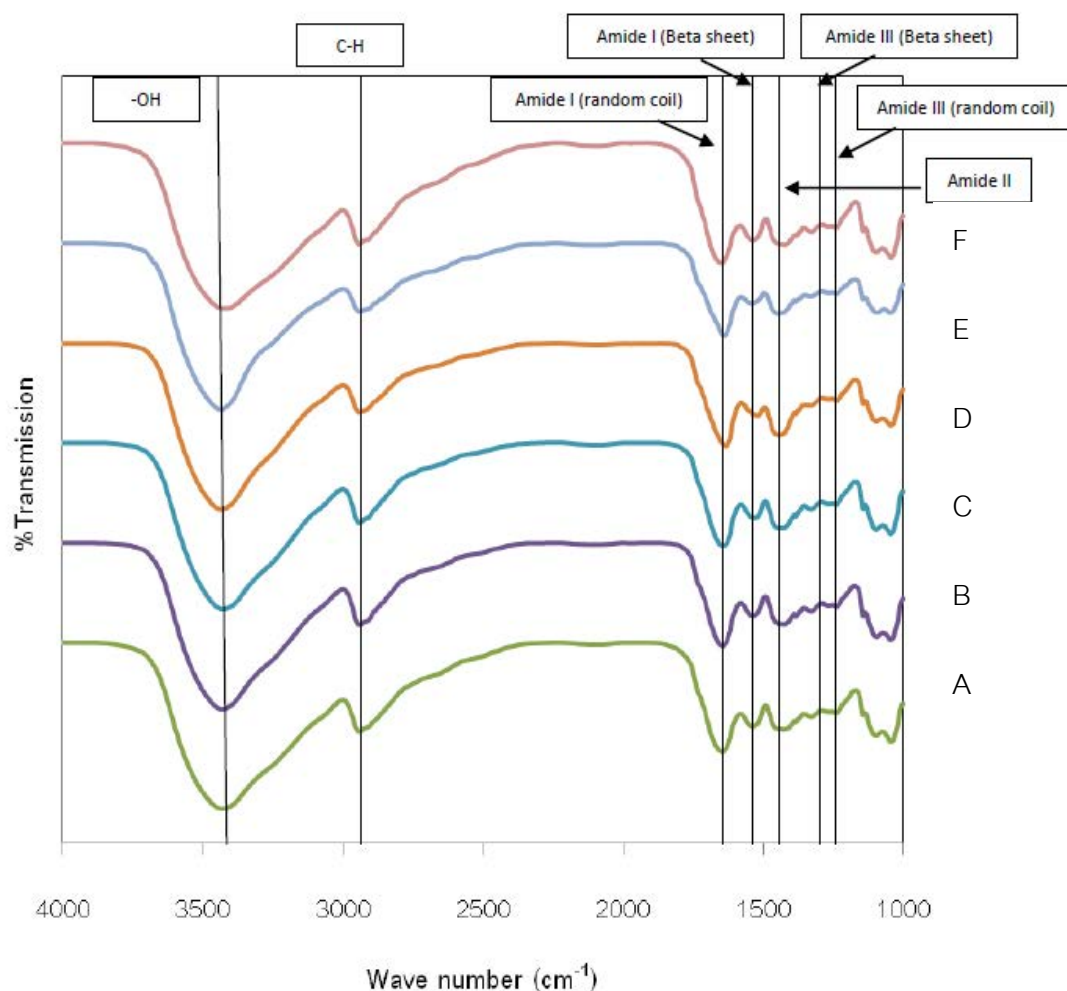
**Figure 1.** Changes in volume and weight of wound dressing containing silk sericin after 7, 14, 30, 60 and 90 days of incubation. (□) represented volume changes and (■) represented weight changes of samples.

## 2. Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)

FTIR spectra were performed to identify the functional groups found in sample and to detect any change by storage condition. FTIR analysis of wound dressing containing silk sericin was recorded using a Perkin Elmer spectrometer with Potassium Bromide (KBr) pellet technique. Samples of such wound dressings were carefully ground into fine powder and mixed with KBr. Infrared spectra were carried out with a



resolution of  $4.0\text{ cm}^{-1}$  and a scan range of  $4,000\text{-}1,000\text{ cm}^{-1}$ . Peaks were acquired by subtracting sample areas by background measurements.



**Figure 2.** FTIR spectra of lyophilized silk sericin powder (A), wound dressing containing silk sericin after incubation for 7 days (B), 14 days (C), 30 days (D), 60 days (E), and 90 days (F).

FTIR spectra of all samples were shown in Figure 2. All peaks were interpreted according to Interpretation of Infrared Spectra, a practical approach (2000) (3). A broad absorption seen at  $3,430\text{ cm}^{-1}$  was represented the hydrogen bonding O-H group which consisted in the hydrophilic side chain of silk sericin. The peak at  $2,940\text{ cm}^{-1}$  corresponds to C-H asymmetrical stretching found in the aliphatic organic compound.

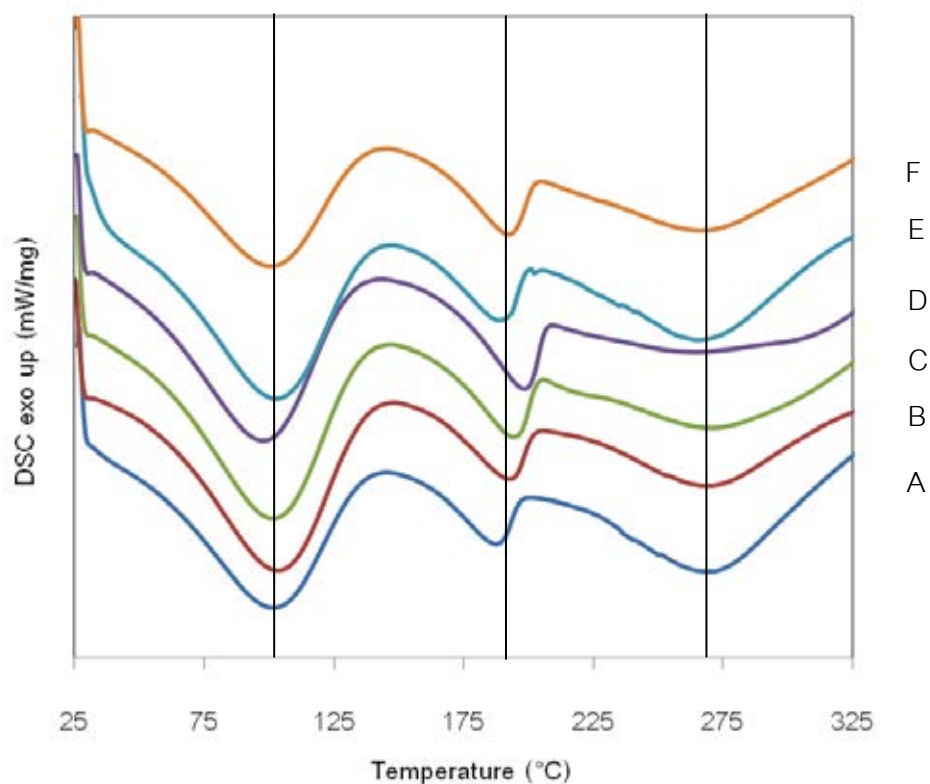
FTIR spectra showed the characteristics of proteins attributing to the C=O group in the amide I band in range of  $1,680 - 1,550 \text{ cm}^{-1}$ , the amide II band in range of  $1,460 - 1,410 \text{ cm}^{-1}$  and the amide III band in range of  $1,300 - 1,200 \text{ cm}^{-1}$ . There were two different peaks in the amide I region,  $1,640$  and  $1,540 \text{ cm}^{-1}$ , were attributed to random-coil and  $\beta$ -sheet conformation, respectively. The band at  $1,045$  and  $1,099 \text{ cm}^{-1}$  were assigned to be C–OH stretching of primary and secondary alcohol, respectively. The spectra of each sample were similar to one another. It was postulated that the chemical structure of wound dressing containing silk sericin did not change during the storage period.

### 3. Differential Scanning Calorimetry (DSC)

DSC analysis was carried out using a Netzsch DSC204 F1 Phoenix to determine thermal stability of material by measuring the heat of a sample at elevated temperatures relatively to a reference. The higher temperature in which peaks occurred suggested the stronger intermolecular force and higher temperature for thermal decomposition of samples. Approximately 9 mg of wound dressing containing silk sericin were heated with constant rate of  $10 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$  from  $25^\circ\text{C}$  to  $325^\circ\text{C}$  and the nitrogen gas flow rate was controlled at  $30 \text{ mL}/\text{min}$ .

To detect phase change of wound dressing containing silk sericin through thermal degradation, DSC was conducted and found 3 endothermic peaks as shown in Figure 3. All peaks were interpreted according to Principles and Applications of Thermal Analysis (2008) (4). The endothermic peaks centered around  $100^\circ\text{C}$  considered as water loss from the structure of samples. The second peak near  $190^\circ\text{C}$  was attributed to thermal-induced molecular mobility and melting of sericin and polyvinyl alcohol (PVA) consisted in the wound dressing. The last heat exchange in wound dressing containing silk sericin was observed as a peak near  $270^\circ\text{C}$  corresponded to the thermal decomposition of all wound dressing compositions. All DSC curves showed similar

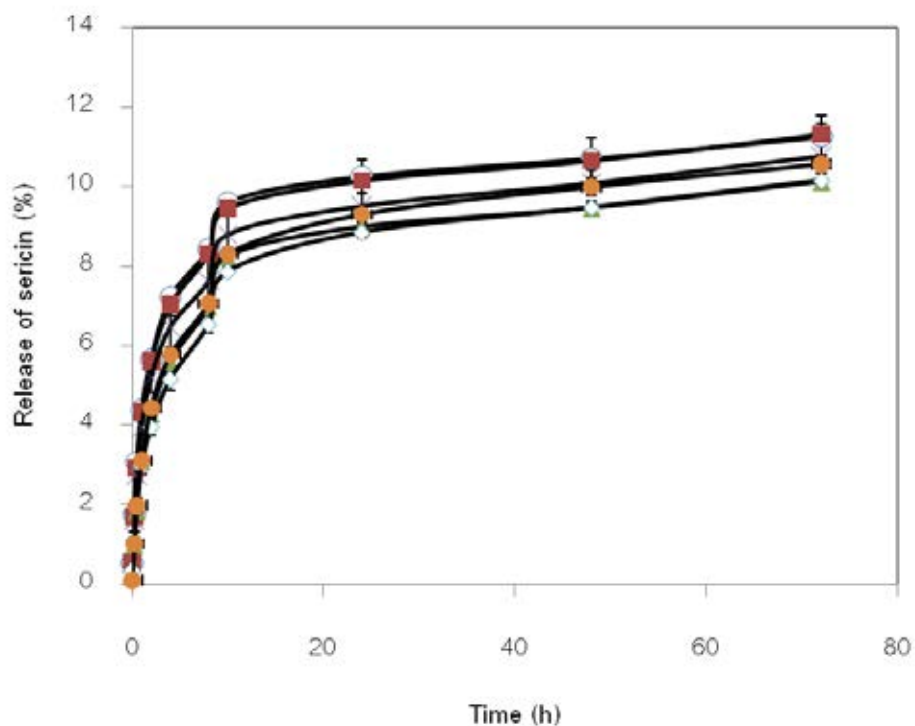
endothermic peak which implied that thermal degradation profiles of the samples did not change during storage and consequently thermal stability remain unchanged.



**Figure 3.** DSC curve of lyophilized silk sericin powder (A), wound dressing containing silk sericin after incubation for 7 days (B), 14 days (C), 30 days (D), 60 days (E), and 90 days (F).

#### 4. Protein release

The protein release patterns of the wound dressing containing silk sericin after completion of desired days of incubation were evaluated by measuring the release of proteins in phosphate buffer pH 7.4 in tightly close containers. The fractions of the solution were collected at certain intervals and determined the amount of protein in triplicate by BCA<sup>TM</sup> Protein Assay Kit (Pierce, USA) for protein concentration calculation. The absorbance was measured at 562 nm using a UV spectrophotometer (Lambda 25, PerkinElmer Ltd., Germany). Bovine albumin was used to create a standard curve.



**Figure 4.** Release of sericin from wound dressing containing silk sericin after incubation for 0 day or control (O), 7 days (■), 14 days (▲), 30 days (x), 60 days (⊕), and 90 days (●) .

The protein release profile of wound dressing containing silk sericin was shown in figure 4. The protein released from the samples occurred around 10% of sericin composition without any sudden burst of protein levels. Comparing among the samples from each storage period, sericin was released in the similar sustained-released manner which referred to its chemical stability.

##### 5. Microbial contamination

Sterility of wound dressing is very important for clinical use. To assure that the wound dressing containing silk sericin were still free from microorganisms during the storage condition, there were two methods to test for its sterility; agar plate method and bioburden test. Wound dressing containing silk sericin were sterilized by gamma


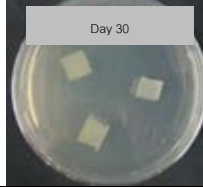










irradiation at a dose of 25 kGray  $^{60}\text{Co}$  at 55°C prior to incubation and 3 samples were randomly tested for stability on day 30, 60 and 90.

For agar plate method, Mueller Hinton agar (Himedia Laboratories Ltd., India) was weighed out 38 g and slowly add to deionized water 1,000 mL. Then the agar solution was sterilized by autoclaving at 121°C with pressure 15 pound/inch<sup>2</sup> for 15 minutes. This sterile agar solution was allowed to cool to 50°C before pouring onto sterile petri dishes and left it dry for 1 hour. Samples at each sampling time were cut into 1x1 cm<sup>2</sup> and put them carefully on the agar plate. All agar plates were incubated in 37°C for 7 days and examined by investigator every day. The growth of microorganisms was determined by any kind of microbial colony growth on or surrounding samples at any time of incubation using agar plate without sample as a negative control.

Along with agar plate method, bioburden test was also investigated. Sterile broth solution was prepared by weighing 30 g of tryptic soya broth (Himedia Laboratories Ltd, India), adding into 1,000 mL of deionized water and autoclaving at 121°C with pressure 15 pound/inch<sup>2</sup> for 15 minutes to obtain clear light-yellow solution. This sterile broth was then filled in sterile test tubes with aseptic techniques. After sampling, samples were immersed in sterile broth, sealed tightly and incubated under agitation at 25°C for 7 days. The growth of microorganisms was determined by turbidity of incubated broth measuring by UV spectrophotometer at wavelength 600 nm using broth without sample as a negative control.

During incubation period, the results found that there was no microbial colony growth on samples in agar plate method and no broth turbidity in bioburden test which referred that there was no microbial contamination in samples at each sampling time. It can confirm the sterility of wound dressing containing silk sericin during this 3-month storage condition.

**Table 1.** Sterility test during the storage periods

Test Sample	Agar plate method		Bioburden test	
	Baseline	7-day incubation	Baseline	7-day incubation
Day 30				
Day 60				
Day 90				

## References

- (1) ASEAN Guideline on Stability Study of Drug Product Guideline on Stability Study of Drug Product 22 February; 9th ACCSQ-PPWG Meeting (2005).
- (2) Note for Guidance on Stability Testing: Stability Testing of New Drug Substances and Products, ICH Topic Q1A (R2) Stability Testing of new Drug Substances and Products (2006).
- (3) Coates J. Interpretation of Infrared Spectra, A Practical Approach. In: Meyers RA, (ed), Encyclopedia of Analytical Chemistry pp. 10815–37. Chichester: John Wiley & Sons Ltd; 2000.
- (4) Gabbott P. A Practical Introduction of Differential Scanning Calorimetry. In: Gabbott P, (ed), A Principles and Applications of Thermal Analysis pp. 1-49. 1st ed. Oxford: Blackwell Publishing; 2008.

## Appendix C

Data entry sheet/ Case record form

Title: SAFETY OF THE SILK SERICIN/PVA SCAFFOLD IN HEALTHY VOLUNTEERS

Data	
Demographic data	
Volunteer's number .....	
1. Sex	<input type="checkbox"/> Male <input type="checkbox"/> Female
2. Age	<input type="text"/> <input type="text"/> years
3. Body weight	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> kg
4. Height	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> cm
5. BMI	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> kg/m <sup>2</sup>
6. Occupation .....	
7. Underlying disease(s)	
<input type="checkbox"/> Yes, specify.....	
Medication use.....	
<input type="checkbox"/> No	
8. Drinking	<input type="checkbox"/> Yes, how much and how often.....
	<input type="checkbox"/> No
	<input type="checkbox"/> Quit, how long.....
	how much and how often before you quit.....
9. Smoking	<input type="checkbox"/> Yes, how much and often.....
	<input type="checkbox"/> No
	<input type="checkbox"/> Quit, how long.....
	how much and how often before you quit.....
10. Use any oral or topical antihistamines or steroids within a week before?	
<input type="checkbox"/> Yes, specify indication.....	
Medication use.....	
<input type="checkbox"/> No	



## Human Repeat Insult Patch Test Scoring Scale

(McNamee, 2008) (5)

### Erythema scale:

This scale is used only for grading degree of erythema (redness). A score on this scale will be assigned following every application of a patch.

- 0 No visible erythema.
- 1 Mild erythema (faint pink to definite pink).
- 2 Moderate erythema (definite redness).
- 3 Severe erythema (very intense redness).

### Designations for elevated responses:

Edema, papules, vesicles, and bullae, if present, are graded as independent responses.

E Edema - definite swelling. (0-3 ; no edema – severe edema)

P Papules - many small, red, solid elevations; surface of reaction has granular feeling.

V Vesicles - small, circumscribed elevations having translucent surfaces so that fluid is visible (blister-like). Vesicles are no larger than 0.5 cm in diameter.

B Bullae - vesicles with a diameter > 0.5 cm; vesicles may coalesce to form one or a few large blisters that fill the patch site.

## Evaluation scores by dermatologists

Volunteer's no.....

Position 1	Score compared to baseline skin characteristics				Criteria
	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5	
Erythema					0-3
Edema					0-4
Papules					present/absent
Vesicles					present/absent
Bullae					present/absent

Position 2	Score compared to baseline skin characteristics				Criteria
	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5	
Erythema					0-3
Edema					0-4
Papules					present/absent
Vesicles					present/absent
Bullae					present/absent

Position 3	Score compared to baseline skin characteristics				Criteria
	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5	
Erythema					0-3
Edema					0-4
Papules					Present/Absent
Vesicles					Present/Absent
Bullae					Present/Absent

Position 4	Score compared to baseline skin characteristics				Criteria
	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5	
Erythema					0-3
Edema					0-4
Papules					present/absent
Vesicles					present/absent
Bullae					present/absent





















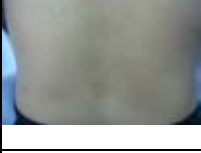
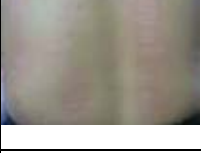



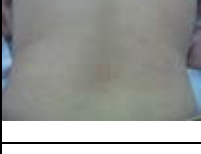
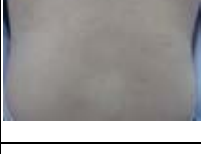
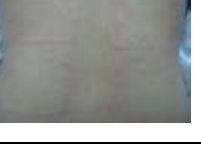
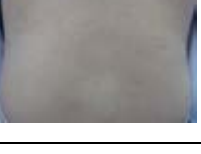
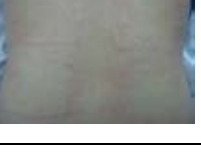

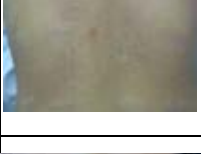
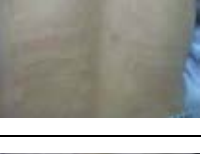





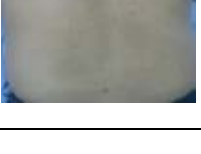

Skin erythema and melanin score from Mexameter® MX 18



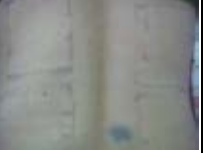































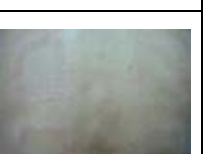
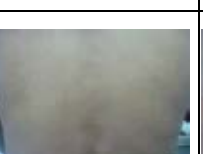

Position  1       2       3       4      Volunteer's no.....

Score       Erythema       Melanin








































No. of measurement	Date	Baseline	1	2	3
	.../.../...	.../.../...	.../.../...	.../.../...	.../.../...
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					
Mean					
SD					


Participants' skins at the back area during the experiment procedure

No of volunteer	1 <sup>st</sup> visit (Baseline)	2 <sup>nd</sup> visit (Induction phase)	3 <sup>rd</sup> visit (Induction phase)	4 <sup>th</sup> visit (Challenge phase)	5 <sup>th</sup> visit (Challenge phase)
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					














No of volunteer	1 <sup>st</sup> visit (Baseline)	2 <sup>nd</sup> visit (Induction phase)	3 <sup>rd</sup> visit (Induction phase)	4 <sup>th</sup> visit (Challenge phase)	5 <sup>th</sup> visit (Challenge phase)
9					
10					
11					
12					
13					
14					
15					
16					

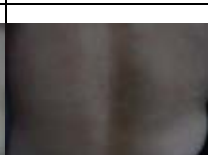
No of volunteer	1 <sup>st</sup> visit (Baseline)	2 <sup>nd</sup> visit (Induction phase)	3 <sup>rd</sup> visit (Induction phase)	4 <sup>th</sup> visit (Challenge phase)	5 <sup>th</sup> visit (Challenge phase)
17					
18					
19					
20					
21					
22					
23					
24					

No of volunteer	1 <sup>st</sup> visit (Baseline)	2 <sup>nd</sup> visit (Induction phase)	3 <sup>rd</sup> visit (Induction phase)	4 <sup>th</sup> visit (Challenge phase)	5 <sup>th</sup> visit (Challenge phase)
25					
26					
27					
28					
29					
30					
31					
32					

No of volunteer	1 <sup>st</sup> visit (Baseline)	2 <sup>nd</sup> visit (Induction phase)	3 <sup>rd</sup> visit (Induction phase)	4 <sup>th</sup> visit (Challenge phase)	5 <sup>th</sup> visit (Challenge phase)
33					
34					
35					
36					
37					
38					
39					
40					





No of volunteer	1 <sup>st</sup> visit (Baseline)	2 <sup>nd</sup> visit (Induction phase)	3 <sup>rd</sup> visit (Induction phase)	4 <sup>th</sup> visit (Challenge phase)	5 <sup>th</sup> visit (Challenge phase)
41					
42					
43					
44					
45					
46					
47					
48					

No of volunteer	1 <sup>st</sup> visit (Baseline)	2 <sup>nd</sup> visit (Induction phase)	3 <sup>rd</sup> visit (Induction phase)	4 <sup>th</sup> visit (Challenge phase)	5 <sup>th</sup> visit (Challenge phase)
49					
50					
51					
52					
53					
54					
55					
56					

No of volunteer	1 <sup>st</sup> visit (Baseline)	2 <sup>nd</sup> visit (Induction phase)	3 <sup>rd</sup> visit (Induction phase)	4 <sup>th</sup> visit (Challenge phase)	5 <sup>th</sup> visit (Challenge phase)
57					
58					
59					
60					
61					
62					
63					
64					















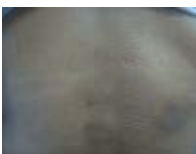





















No of volunteer	1 <sup>st</sup> visit (Baseline)	2 <sup>nd</sup> visit (Induction phase)	3 <sup>rd</sup> visit (Induction phase)	4 <sup>th</sup> visit (Challenge phase)	5 <sup>th</sup> visit (Challenge phase)
65					
66					
67					
68					
69					
70					
71					
72					

No of volunteer	1 <sup>st</sup> visit (Baseline)	2 <sup>nd</sup> visit (Induction phase)	3 <sup>rd</sup> visit (Induction phase)	4 <sup>th</sup> visit (Challenge phase)	5 <sup>th</sup> visit (Challenge phase)
73					
74					
75					
76					
77					
78					
79					
80					





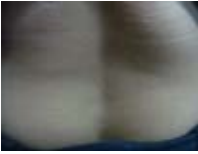


No of volunteer	1 <sup>st</sup> visit (Baseline)	2 <sup>nd</sup> visit (Induction phase)	3 <sup>rd</sup> visit (Induction phase)	4 <sup>th</sup> visit (Challenge phase)	5 <sup>th</sup> visit (Challenge phase)
81					
82					
83					
84					
85					
86					
87					
88					

No of volunteer	1 <sup>st</sup> visit (Baseline)	2 <sup>nd</sup> visit (Induction phase)	3 <sup>rd</sup> visit (Induction phase)	4 <sup>th</sup> visit (Challenge phase)	5 <sup>th</sup> visit (Challenge phase)
89					
90					
91					
92					
93					
94					
95					
96					

No of volunteer	1 <sup>st</sup> visit (Baseline)	2 <sup>nd</sup> visit (Induction phase)	3 <sup>rd</sup> visit (Induction phase)	4 <sup>th</sup> visit (Challenge phase)	5 <sup>th</sup> visit (Challenge phase)
97					
98					
99					
100					
101					
102					
103					
104					



No of volunteer	1 <sup>st</sup> visit (Baseline)	2 <sup>nd</sup> visit (Induction phase)	3 <sup>rd</sup> visit (Induction phase)	4 <sup>th</sup> visit (Challenge phase)	5 <sup>th</sup> visit (Challenge phase)
105					
106					
107					
108					
109					
110					

Note: The color of skin may slightly difference due to the light intensity and camera used.

## Original document for healthy volunteers

### แบบรายงานโครงร่างวิจัย

#### ชื่อ-นามสกุล

นางสาวทิพวรรณ ศิริเกียรติทอง

#### ชื่อหัวข้องานวิจัย

ความปลอดภัยของแผ่นเนื้อเยื่อปิดแผลผสมโปรตีนกาวไหมในอาสาสมัครสุขภาพดี

SAFETY OF THE SILK SERICIN/PVA SCAFFOLD IN HEALTHY VOLUNTEERS

#### วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาความปลอดภัยของแผ่นเนื้อเยื่อปิดแผลผสมโปรตีนกาวไหมในอาสาสมัครสุขภาพดีจำนวน 112 คน

#### แนวเหตุผล ทฤษฎีที่สำคัญ หรือสมมุติฐาน

(โปรดดูรายละเอียดตามเอกสารประกอบหมายเลข 1 และ 3)

#### วิธีดำเนินการวิจัย

(โปรดดูรายละเอียดตามเอกสารประกอบหมายเลข 2, 3 และ 4)

## เอกสารประกอบหมายเลข 1

### แนวเหตุผล และ ทฤษฎีที่สำคัญ

การปลูกถ่ายผิวหนังที่หนาบางส่วน (split-thickness skin graft) คือ การตัดผิวหนังปกติซึ่งประกอบไปด้วยชั้นหนังกำพร้าทั้งหมดร่วมกับชั้นหนังแท้เพียงบางส่วนมาปิดให้กับเนื้อบริเวณที่ไม่มีผิวหนังปกคลุม (6, 7) เป็นเทคนิคหนึ่งของการทำศัลยกรรมตกแต่งและเสริมสร้าง (plastic and reconstructive surgery) ซึ่งมีความจำเป็นในการรักษาบาดแผลที่มีขนาดใหญ่ หรือบาดแผลที่ไม่สามารถหายเองได้โดยกระบวนการสร้างเซลล์ผิว (epithelialization) ตามธรรมชาติของร่างกาย มีจุดประสงค์เพื่อเร่งการหายของบาดแผลโดยเร็วที่สุดและลดการเกิดภาวะแทรกซ้อนที่อาจเกิดขึ้นกับผู้ป่วย (8-10) ในประเทศสหรัฐอเมริกา มีผู้ป่วยแผลไฟไหม้ น้ำร้อนลวกประมาณ 24,000 คนในทุก ๆ ปีที่จำเป็นต้องได้รับการรักษาด้วยการปลูกถ่ายผิวหนังเพื่อลดอัตราการตายจากการเสียเลือดและการติดเชื้อบริเวณแผล (11) ยังมีผู้ป่วยที่ทุกข์ทรมานจากแผลกดทับประมาณ 1.5 ล้านคน และผู้ป่วยแผลเรื้อรังจากโรคเบาหวานอันมีสาเหตุการเกิดมาจากความผิดปกติของกระบวนการ เมแทบอลิซึมในร่างกายประมาณ 800,000 คนที่ได้รับการรักษาด้วยการปลูกถ่ายผิวหนังที่หนาบางส่วนในปี ค.ศ. 2008 (11) อย่างไรก็ตาม เมื่อมีการผ่าตัดปลูกถ่ายผิวหนังโดยใช้ผิวหนังจากบริเวณปกติของร่างกาย จะทำให้ผู้ป่วยเกิดบาดแผลใหม่ที่บริเวณให้ (donor site) เพิ่มจากแผลเดิมที่ต้องการการรักษา ซึ่งบาดแผลจากการปลูกถ่ายผิวหนังนี้มีความเสี่ยงในการเกิดการติดเชื้อของแผล ก่อความเจ็บปวดและภาวะแทรกซ้อนต่าง ๆ เช่น การหดรั้งของแผล ความไม่สมดุลของสารน้ำและเกลือแร่ การติดเชื้อในระบบต่าง ๆ ของร่างกายได้เช่นเดียวกับบาดแผลที่เกิดจากสาเหตุอื่น นอกจากนี้หากผู้ป่วยไม่ได้รับการดูแลอย่างเหมาะสม บาดแผลจากการปลูกถ่ายผิวหนังที่หนาบางส่วนอาจทวีความรุนแรงเป็นบาดแผลลึกที่ทำให้ผู้ป่วยมีความจำเป็นต้องพักรักษาตัวในโรงพยาบาลนานขึ้น สูญเสียอวัยวะ หรือแม้กระทั่งความพิการถาวรได้ ดังนั้นหลังจากที่ผู้ป่วยเข้ารับการผ่าตัดปลูกถ่ายผิวหนังจึงต้องการการดูแลอย่างต่อเนื่องโดยการใช้น้ำปิดแผล และมีการประเมินการหายของบาดแผลอย่างเหมาะสม (7, 12)

วัตถุประสงค์ของการปิดแผล คือ เพื่อส่งเสริมการหายของบาดแผล ลดความเจ็บปวด ลดการสูญเสียเลือดหรือสารน้ำออกจากร่างกาย และป้องกันการติดเชื้อบริเวณแผล การเลือกชนิดของแผ่นปิดแผลในการดูแลบาดแผลจากการปลูกถ่ายผิวหนังที่หนาบางส่วนเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญต่อการหายของบาดแผล ปัจจุบันมีผลิตภัณฑ์รักษาบาดแผลชนิดต่าง ๆ ออกมาจำหน่าย

มากมาย แต่แผ่นปิดแผลที่มีขายตามท้องตลาดเป็นเพียงแผ่นปิดแผลเปล่าที่ไม่มีสารกระตุ้นการหายของบาดแผล หรืออาจมีเพียงสารฆ่าเชื้อแบคทีเรียเพียงเล็กน้อย โดยยังไม่มีส่วนประกอบที่มีประสิทธิภาพในการเร่งการหายของบาดแผล นอกจากนี้แผ่นปิดแผลรุ่นใหม่ที่มีการพัฒนาการผลิตให้มีองค์ประกอบของสารกระตุ้นการหายของบาดแผลนั้นยังมีราคาแพง เนื่องจากประเทศไทยยังต้องนำเข้ามาจากต่างประเทศ (13-15) ทำให้ผู้ป่วยส่วนใหญ่ไม่สามารถใช้แผ่นปิดแผลดังกล่าวได้ แม้จะมีข้อบ่งใช้ ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีแนวคิดในการพัฒนาผลิตภัณฑ์ปิดแผลที่ผลิตได้เองในประเทศ โดยใช้วัตถุดิบในท้องถิ่น

โปรตีนกาวไหมเป็นโปรตีนธรรมชาติชนิดหนึ่งที่ได้จากรังไหมของหนอนไหม *Bombyx mori* ซึ่งปกติแล้วจะถูกแยกออกและทิ้งไปกับน้ำที่ใช้ในกระบวนการต้มและสาวเส้นไหมเพื่อการทอผ้าไหมไทย (16, 17) แต่จากการศึกษาที่ผ่านมาพบคุณสมบัติต่าง ๆ ของโปรตีนกาวไหมที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ มีการวิจัยพบว่า โปรตีนกาวไหมประกอบด้วยโปรตีนที่มีลักษณะคล้ายเคอราติน (keratin) ที่มีในผิวหนังมนุษย์ สามารถเกิดเป็นฟิล์มบาง ๆ เคลือบปกป้องผิวจากแสงแดดและมลภาวะ เก็บกักรักษาความชุ่มชื้นของผิวได้ดี โดยไม่ก่อให้เกิดอาการไม่พึงประสงค์ (18) โปรตีนกาวไหมยังมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระและกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์ผิวหนัง (19, 20) นอกจากนี้ยังพบว่าครีมที่มีโปรตีนกาวไหมสามารถกระตุ้นการเจริญของเซลล์ผิวหนัง เพิ่มการสร้างคอลลาเจนในหนูทดลองโดยไม่ก่อการแพ้ (21) มีคุณสมบัติในการลดการสร้างสารก่อการอักเสบ (proinflammation cytokine) (22) และยังพบว่าครีมที่มีโปรตีนสามารถเร่งอัตราการหายของบาดแผลในผู้ป่วยแผลไฟไหม้ที่มีความลึกบางส่วนได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยไม่ก่อให้เกิดการระคายเคืองผิว (23) ในการศึกษาล่าสุดมีการพัฒนาแผ่นเนื้อเยื่อปิดแผลที่มีโปรตีนกาวไหมร่วมกับพอลิเมอร์และใช้วิธีเชื่อมข้ามทั้งทางกายภาพและทางเคมี (crosslinking method) (24) พบว่าแผ่นเนื้อเยื่อปิดแผลดังกล่าวมีคุณสมบัติทางกายภาพ ได้แก่ การรับแรงกดทับ การดูดซึมของเหลวและความชื้น การปลดปล่อยโปรตีนกาวไหมในอัตราที่เหมาะสมแก่การนำไปใช้ จากคุณลักษณะอันเป็นประโยชน์หลายประการของโปรตีนกาวไหมร่วมกับคุณสมบัติของแผ่นเนื้อเยื่อที่พัฒนาขึ้น จึงนำมาสู่จุดประสงค์ของการศึกษาวิจัยนี้ที่ต้องการศึกษาความปลอดภัยของแผ่นเนื้อเยื่อปิดแผลผสมโปรตีนกาวไหมในอาสาสมัครสุขภาพดี โดยเปรียบเทียบกับแผ่นปิดแผลที่ขายในท้องตลาด

## ทฤษฎี สมมติฐาน หรือกรอบแนวคิด

### ทฤษฎีที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย

ผิวหนังเป็นอวัยวะที่มีขนาดใหญ่ที่สุดของร่างกาย ประกอบด้วย 3 ชั้น (25, 26) ได้แก่ ชั้นหนังกำพร้า (epidermis) เป็นส่วนที่อยู่บนสุดของผิวหนัง ชั้นนี้ประกอบด้วยเซลล์ที่เรียกว่า keratinocytes มากกว่าร้อยละ 80 ซึ่งมีการตายลอกหลุดออกไปจากผิวหนังตลอดเวลา และมีเซลล์สร้างเม็ดสี (melanocytes) เซลล์เกี่ยวกับการรับความรู้สึก (markel cells) และเซลล์เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของผิวหนัง (langerhans cells) อีกเป็นส่วนน้อย ความหนาของชั้นหนังกำพร้านี้จะแตกต่างกันไปในแต่ละบริเวณของร่างกาย โดยเฉลี่ยแล้วประมาณ 0.1 - 0.3 มิลลิเมตร เทียบกับความหนาทั้งหมดของผิวหนังซึ่งมีความหนาเฉลี่ยโดยประมาณ 1.5 - 4.0 มิลลิเมตร ชั้นของผิวหนังที่อยู่ติดลงไปจากชั้นหนังกำพร้า คือ ชั้นหนังแท้ (dermis) อยู่ใต้ชั้นหนังกำพร้า ผิวหนังชั้นนี้ประกอบด้วยเส้นใยชนิดต่าง ๆ และโปรตีน ได้แก่ คอลลาเจนและอีลาสติน มีคุณสมบัติในการช่วยอุ้มน้ำ ทำหน้าที่เป็นโครงสร้างสำหรับให้ความแข็งแรงและความยืดหยุ่นแก่ผิวหนัง ชั้นหนังแท้ยังมีหลอดเลือดซึ่งนำสารอาหารและออกซิเจนมาเลี้ยงเซลล์ผิวหนัง มีเส้นประสาทรับความรู้สึกสัมผัส รับรู้อุณหภูมิ ความเจ็บปวด หรือแรงสั่นสะเทือนและยังเป็นที่พักตัวของรากของเส้นผม ขน ต่อมไขมัน ต่อมเหงื่อและเซลล์ต้นกำเนิดของผิวหนัง ชั้นที่สาม คือ ชั้นใต้หนังแท้ (subcutaneous tissues) ประกอบด้วยเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่อยู่กันอย่างหลวม ๆ (loose connective tissues) และไขมัน (adipose tissues) เป็นหลัก ในชั้นนี้ทำหน้าที่เป็นฉนวน ป้องกันแรงกระทบกระเทือนจากภายนอก และช่วยเก็บสะสมพลังงานไว้ใช้ในเวลาจำเป็น

เมื่อผิวหนังได้รับบาดเจ็บ ส่วนประกอบในแต่ละชั้นจะถูกทำลาย ก่อความเจ็บปวดแก่ผู้ป่วยขณะที่ปลายประสาทบริเวณผิวหนังสัมผัสกับสิ่งแวดล้อม เพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดอาการแทรกซ้อน ได้แก่ การสูญเสียเลือด หรือสารน้ำออกจากร่างกายผู้ป่วย จนกระทบต่อสมดุลอิเล็กโทรไลต์และเกลือแร่ การติดเชื้อบริเวณบาดแผลและอาจกระจายไปในกระแสเลือดทั่วร่างกายของผู้ป่วย ดังนั้นการดูแลรักษาบาดแผลด้วยการใช้แผ่นปิดแผลที่เหมาะสมกับลักษณะบาดแผลของผู้ป่วยตั้งแต่เริ่มต้นเป็นสิ่งจำเป็น

การเลือกชนิดของแผ่นปิดแผลในการรักษาควรคำนึงถึงลักษณะของบาดแผลที่ผู้ป่วยได้รับ ดังเช่น ขนาดความกว้างของบาดแผล ความลึกของบาดแผล ปริมาณเลือดหรือสารคัดหลั่งบริเวณบาดแผล นอกจากนี้ควรพิจารณาการยอมรับของผู้ป่วยและความสามารถในการจัดการกับ

ค่าใช้จ่ายที่เกิดขึ้นหลังการรักษาอีกด้วย แผ่นปิดแผลในอุดมคติควรมีคุณสมบัติดังต่อไปนี้ คือ สามารถกระตุ้นการหายของบาดแผลและเก็บกักรักษาความชุ่มชื้นบริเวณพื้นที่ว่างที่เป็นรอยต่อระหว่างบาดแผลกับแผ่นปิดแผลได้ดี เป็นดังฉนวนที่สามารถรักษาสมดุลของอุณหภูมิบริเวณบาดแผลไม่ให้ร้อนหรือเย็นเกินไป สามารถระบายสารคัดหลั่งต่าง ๆ และให้อากาศผ่านเข้าออกได้ ในขณะที่ปกป้องบาดแผลจากการติดเชื้อจุลินทรีย์หรือการสัมผัสกับสารพิษจากสิ่งแวดล้อมภายนอก สามารถเปลี่ยนแผ่นปิดแผลและทำความสะอาดแผลได้ง่ายโดยไม่รบกวนกระบวนการสร้างเซลล์ผิวใหม่ที่กำลังเกิดขึ้นบริเวณแผล รวมถึงผู้ป่วยสามารถเข้าถึงการรักษาและได้รับประโยชน์อย่างคุ้มค่าเมื่อเทียบกับค่าใช้จ่ายที่เสียไป (8) ตัวอย่างของแผ่นปิดแผลในท้องตลาดในปัจจุบัน ได้แก่ ผ้ากอซตาข่าย (mesh gauze) และผ้าบางรูละเอียดที่ทำด้วยใยสังเคราะห์ (tulle gras) เช่น Jelonet<sup>®</sup>, Bactigras<sup>®</sup>, Sofra-tulle<sup>®</sup>, Xeroform<sup>®</sup> และ Scarlet red<sup>®</sup> แผ่นฟิล์มหรือเมมเบรน (Tegaderm<sup>®</sup>, Opsite<sup>®</sup>) แผ่นปิดแผลไฮโดรคอลลอยด์ (DuoDERM<sup>®</sup>, Urgotul<sup>®</sup>) แผ่นปิดแผลอัลจีเนต (Algisite<sup>®</sup>, Sorbsan<sup>®</sup>, Curasorb<sup>®</sup>, Urgosorb<sup>®</sup>) แผ่นปิดแผลไฮโดรไฟเบอร์ (Aquacel<sup>®</sup>) แผ่นโฟมพอลิยูรีเทน (Allevyn<sup>®</sup>, Askina<sup>®</sup>) แผ่นปิดแผลที่มีโลหะเงินเป็นสารฆ่าเชื้อ (Acticoat<sup>®</sup>) และแผ่นแปะซิลิโคน (Mepitel<sup>®</sup>, Mepilex<sup>®</sup>) ฯลฯ (27, 28) อย่างไรก็ตามปัจจุบันยังไม่มีแผ่นปิดแผลที่มีคุณสมบัติครบทุกข้อดังที่กล่าวมาข้างต้น จึงยังมีความจำเป็นที่ต้องมีการศึกษาวิจัย พัฒนาแผ่นปิดแผลชนิดใหม่ ๆ อย่างต่อเนื่อง

โปรตีนกาวไหมเป็นโปรตีนธรรมชาติชนิดหนึ่งที่ได้จากรังไหมของหนอนไหม *Bombyx mori* รังไหมประกอบด้วยโปรตีนธรรมชาติ 2 ส่วน คือ โปรตีนกาวไหม (sericin) ร้อยละ 25 - 30 และเส้นใยไฟโบรอิน (fibroin) ร้อยละ 70- 75 โดยโปรตีนกาวไหมจะทำหน้าที่เป็นสารยึดเส้นใยไฟโบรอินให้คงสภาพเป็นรังไหมไว้ได้ (29, 30) โปรตีนกาวไหมมีโมเลกุลขนาดใหญ่ ละลายน้ำได้ดี มีน้ำหนักโมเลกุลระหว่าง 10-300 กิโลดาลตัน ประกอบด้วยกรดอะมิโนถึง 18 ชนิด กรดอะมิโนที่พบมาก ได้แก่ เซอรีน (serine) และ กรดแอสปาร์ติก (aspartic acid) ซึ่งมีปริมาณร้อยละ 33.4 และ 16.7 ตามลำดับ โดยกระบวนการผลิตมีผลต่อขนาดโมเลกุลของโปรตีนกาวไหม เนื่องจากเป็นโปรตีนที่ไวต่อสภาวะกรดต่าง อุณหภูมิ และระยะเวลาที่ใช้ในกระบวนการผลิต โปรตีนกาวไหมที่สกัดด้วยความร้อนภายใต้ความดันสูงจะมีขนาดโมเลกุลเล็ก คือ มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่าหรือเท่ากับ 20 กิโลดาลตัน สามารถใช้เป็นส่วนประกอบในเครื่องสำอางต่าง ๆ เช่น ผลิตภัณฑ์บำรุงผิวและเส้นผม ผลิตภัณฑ์สุขภาพและเวชภัณฑ์ทางการแพทย์ (21, 29) เป็นต้น

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าโปรตีนกาวใหม่มีคุณสมบัติที่เป็นประโยชน์ทางการแพทย์ (31) ผลการศึกษาของ Padamwar และคณะในปี ค.ศ. 2005 พบว่าโปรตีนกาวใหม่มีคุณสมบัติเพิ่มความชุ่มชื้นให้แก่ผิวหนังจากผลของการเก็บกักกรดอะมิโนในชั้นผิวหนังได้มากขึ้น ซึ่งกรดอะมิโนในโปรตีนกาวใหม่มีลักษณะคล้ายกับกรดอะมิโนตามธรรมชาติที่พบในชั้นผิวหนัง (18) มีหลายการศึกษาที่แสดงให้เห็นว่าโปรตีนกาวใหม่มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ สามารถปกป้องเซลล์ผิวจากการถูกทำลายด้วยรังสี อัลตราไวโอเล็ต และยังกระตุ้นการสร้างเซลล์ผิวในระดับห้องทดลองได้ (19, 20, 32-34) สารละลายของโปรตีนกาวใหม่ในความเข้มข้น 0.01 – 0.5% สามารถเร่งการสมานแผลที่กระจกตาของหนูทดลองได้เร็วกว่าการใช้น้ำเกลือ และมีรอยแผลที่เหลือหลังรักษาเล็กกว่าการใช้น้ำเกลือซึ่งเป็นกลุ่มควบคุม (35, 36) นอกจากนี้ในการศึกษาของ Aramwit และคณะในปี ค.ศ. 2007 ศึกษาเกี่ยวกับครีมที่มีโปรตีนกาวใหม่ปริมาณร้อยละ 8 ในการรักษาบาดแผลที่หนาทั้งหมดในหนูทดลอง โดยเปรียบเทียบกับครีมพื้น (cream base) พบว่าครีมที่มีโปรตีนกาวใหม่สามารถกระตุ้นให้เซลล์ผิวหนังเจริญได้ดีกว่าครีมพื้น ลดอาการบวมแดงของผิวหนังได้ดีกว่า และสามารถกระตุ้นการสร้างคอลลาเจนได้อย่างมีประสิทธิภาพโดยไม่ก่อให้เกิดการแพ้หรือระคายเคืองผิวหนัง (21) นอกจากนี้ ในปี ค.ศ. 2009 คณะวิจัยกลุ่มดังกล่าวยังศึกษาเพิ่มเติมและพบว่าครีมที่มีโปรตีนกาวใหม่มีคุณสมบัติในการลดการสร้างสารก่อการอักเสบ ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับการสมานตัวของบาดแผลได้ (22) จากรายงานกรณีศึกษาของ Namviriyachote และคณะในปี ค.ศ. 2010 เกี่ยวกับการใช้ครีมผสมโปรตีนกาวใหม่ในการรักษาบาดแผลไฟไหม้ที่มีความลึกบางส่วนในผู้ป่วยชายอายุ 14 ปี พบว่าครีมผสมโปรตีนกาวใหม่ดังกล่าวทำให้บาดแผลไฟไหม้มีเซลล์ผิวหนังปกคลุมอย่างสมบูรณ์ภายใน 14 วัน และไม่พบการแพ้หรือระคายเคืองผิว (23) นอกจากนี้แล้ว ยังมีการพัฒนาการเตรียมแผ่นเจลปิดแผลโปรตีนกาวใหม่ และทดสอบประสิทธิภาพการกระตุ้นการสร้างเซลล์ผิวหนังของมนุษย์ในระดับห้องทดลองโดย Teramoto และคณะ ผลการศึกษาพบว่าแผ่นเจลปิดแผลที่เตรียมจากโปรตีนกาวใหม่สามารถเก็บกักความชุ่มชื้นให้แก่ผิวหนังได้ดี ทำให้เซลล์ผิวหนังสามารถเจริญได้โดยไม่เกิดพิษต่อเซลล์ (37) การศึกษาล่าสุดในปี ค.ศ. 2010 Aramwit และคณะยังพัฒนาแผ่นเนื้อเยื่อปิดแผลที่มีโปรตีนกาวใหม่ความเข้มข้น 3 % ร่วมกับ พอลิเมอร์และสารเชื่อมข้ามโดยวิธีทางกายภาพหรือทางเคมี (24) พบว่าแผ่นเนื้อเยื่อปิดแผลดังกล่าวมีคุณสมบัติทางกายภาพ ได้แก่ การรับแรงกดทับ การดูดซึ่มของเหลวและความชื้น การปลดปล่อยโปรตีนกาวใหม่ในอัตราที่เหมาะสมแก่การนำไปใช้ รวมถึงมีการศึกษาเบื้องต้นในการรักษาบาดแผลที่มีความหนาทั้งหมดในหนูทดลอง พบว่า บาดแผลที่รักษาด้วยแผ่นเนื้อเยื่อที่มีโปรตีนกาวใหม่ดังกล่าว มีการสร้างเซลล์ผิวใหม่ได้ตั้งแต่วันที่ 3 และบาดแผลหายสนิท

ทั้งหมดในวันที่ 14 ในขณะที่บาดแผลที่รักษาด้วยแผ่นปิดแผลไฮโดรคอลลอยด์ซึ่งใช้เป็นกลุ่มควบคุมต้องใช้ระยะเวลา 21 วัน บาดแผลทั้งหมดจึงหายสนิท

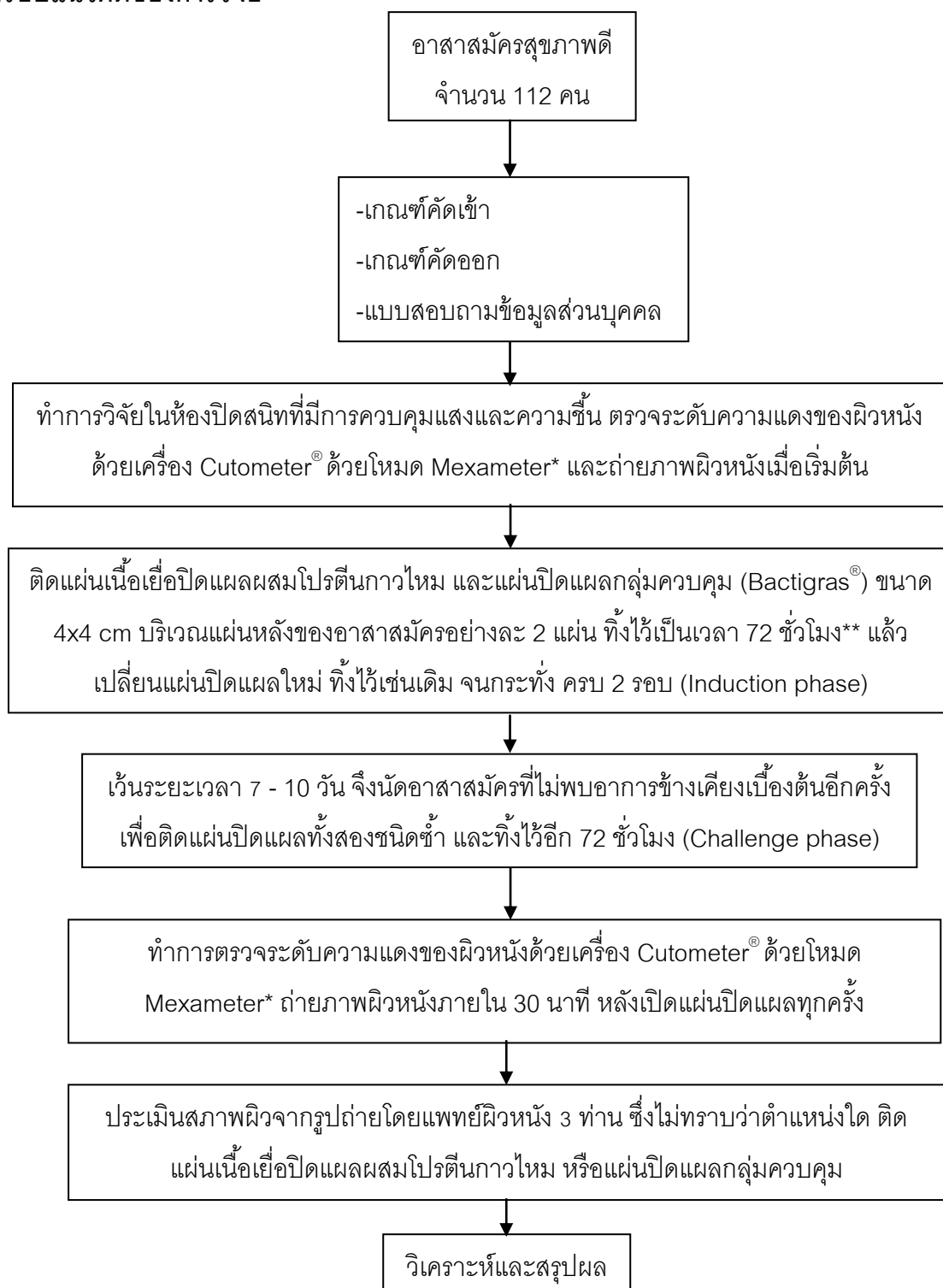
จากคุณลักษณะอันเป็นประโยชน์หลายประการของโปรตีนกาวไหมในการกักเก็บความชุ่มชื้นของผิว ลดการสร้างสารก่อการอักเสบ ผลข้างเคียงน้อย สามารถสกัดได้ง่ายภายในประเทศไทย ร่วมกับคุณสมบัติของแผ่นเนื้อเยื่อปิดแผลที่พัฒนาขึ้น แต่ยังไม่มีการศึกษาด้านความปลอดภัยของแผ่นเนื้อเยื่อผสมโปรตีนกาวไหมในอาสาสมัครสุขภาพดี ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการวิจัยนี้เพื่อศึกษาความปลอดภัยของแผ่นเนื้อเยื่อปิดแผลผสมโปรตีนกาวไหมในอาสาสมัครสุขภาพดี ซึ่งหากมีผลทางคลินิกที่แสดงให้เห็นว่า แผ่นเนื้อเยื่อปิดแผลผสมโปรตีนกาวไหมมีความปลอดภัยในมนุษย์จะเป็นข้อมูลเบื้องต้นถึงประโยชน์สำหรับผู้ป่วยที่มีความจำเป็นต้องได้รับการรักษาด้วยการปลูกถ่ายผิวหนังหรือผู้ป่วยที่ได้รับบาดเจ็บที่ผิวหนังเป็นบริเวณกว้าง แต่ไม่สามารถเข้าถึงแผ่นปิดแผลชนิดใหม่ ๆ ที่ต้องนำเข้าจากต่างประเทศ แผ่นเนื้อเยื่อที่มีโปรตีนกาวไหมดังกล่าวจะเป็นอีกทางเลือกหนึ่งให้กับผู้ป่วย นอกจากนี้หากสามารถนำโปรตีนกาวไหมซึ่งเดิมเคยเป็นสิ่งเหลือใช้ทางการเกษตรให้กลับมาใช้ประโยชน์ได้อีก ก็จะเป็นการเพิ่มมูลค่าทั้งทางเศรษฐกิจ สังคมและสิ่งแวดล้อมของประเทศไทยอย่างมาก

### สมมติฐานการวิจัย

แผ่นเนื้อเยื่อปิดแผลผสมโปรตีนกาวไหมมีความปลอดภัยในมนุษย์ โดยไม่มีผลก่อให้เกิดอาการบวม แดง ผื่น ผื่นคันหรือตุ่มน้ำบริเวณผิวหนังที่สัมผัสกับแผ่นเนื้อเยื่อดังกล่าวเมื่อเทียบกับแผ่นปิดแผลในท้องตลาด คือ Bactigras® (บริษัท Smith & Nephew) ซึ่งเป็นแผ่นปิดแผลมาตรฐานในการรักษาบาดแผลที่เกิดจากการผ่าตัดที่หนาบางส่วน



### กรอบแนวคิดของการวิจัย



\*เครื่องมือสำหรับวัดปริมาณฮีโมโกลบินบริเวณผิวหนังโดยอาศัยหลักการสะท้อนของแสงจากผิวหนังเข้า  
เครื่องตรวจรับแสง

\*\*เป็นระยะเวลามาตรฐานในการเปลี่ยนแผ่นปิดแผล

## เอกสารประกอบหมายเลข 2

### วิธีดำเนินการวิจัย

#### รูปแบบการวิจัย

การวิจัยนี้เป็นการศึกษาแบบทดลองทางคลินิกแบบปิดบังทางเดียว และมีกลุ่มควบคุม (single-blinded active-controlled clinical trial)

#### ระยะเวลาดำเนินการวิจัย

ตั้งแต่เดือนเมษายน 2554 ถึงเดือนกันยายน พ.ศ. 2554

#### วิธีดำเนินการวิจัย

วิธีดำเนินการวิจัยแบ่งเป็น 3 ขั้นตอน คือ

ขั้นตอนที่ 1: การเตรียมการก่อนดำเนินการวิจัย

ขั้นตอนที่ 2: การดำเนินการวิจัย

ขั้นตอนที่ 3: การวิเคราะห์ข้อมูลและอภิปรายผล

ขั้นตอนที่ 1: การเตรียมการก่อนดำเนินการวิจัย

1.1 ทบทวนเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1.2 คัดเลือกสถานที่ที่จะดำเนินการวิจัย

โรงพยาบาลตำรวจ

1.3 ประชากร กลุ่มตัวอย่าง และเกณฑ์การคัดเลือกตัวอย่างเข้าร่วมการวิจัย

#### ประชากรเป้าหมาย

อาสาสมัครสุขภาพดีเพศชายหรือหญิงที่มีอายุตั้งแต่ 18 - 65 ปี

#### ประชากรตัวอย่าง

อาสาสมัครสุขภาพดีเพศชายหรือหญิงที่มีอายุตั้งแต่ 18 - 65 ปี ณ โรงพยาบาลตำรวจ

#### เกณฑ์การคัดเลือกตัวอย่างเข้าร่วมการวิจัย (Inclusion criteria)

1. อายุ 18 - 65 ปี
2. สามารถปฏิบัติตามแผนงานวิจัยได้ สามารถพบแพทย์และผู้วิจัยตามนัดหมายได้  
สม่ำเสมอ
3. อาสาสมัครยินยอมเข้าร่วมในโครงการวิจัย

#### เกณฑ์การคัดตัวอย่างออกจากการวิจัย (Exclusion criteria)

1. เป็นโรคผิวหนังเรื้อรัง เช่น สะเก็ดเงิน โรคผิวหนังอักเสบเรื้อรัง โรคภูมิแพ้

2. เป็นโรคภูมิคุ้มกันบกพร่อง หรือใช้ยากดภูมิคุ้มกัน ใช้ยาต้านฮีสตามีน หรือใช้ยาแก้ชักเสบชนิด สเตียรอยด์ภายใน 2 สัปดาห์ก่อนเข้าร่วมการวิจัย
3. มีประวัติแพ้โปรตีนกาวไหม
4. ไม่สามารถพบแพทย์และผู้วิจัยตามนัดหมายได้ หรือไม่มาตามนัดหมายตั้งแต่หนึ่งครั้งขึ้นไป

#### การคำนวณขนาดตัวอย่าง :

ใช้ข้อมูลจากบทความทบทวนวรรณกรรมเกี่ยวกับกระบวนการวิจัยและแปลผลการทดสอบแผ่นปิดแผลของ McNamee และคณะ ในปี 2008 (5) จากการศึกษาพบว่า การทดสอบแผ่นปิดแผลควรมีอาสาสมัครที่เข้าร่วมตลอดจนจบการวิจัยอย่างน้อย 100 คน เพื่อให้ได้มีโอกาส 0.99 (99%) ที่จะพบอาการไม่พึงประสงค์ทางผิวหนังที่มีอุบัติการณ์ 5% ในประชากรได้

และเมื่อประมาณการว่าอาสาสมัครร้อยละ 10 จำเป็นต้องออกจากการศึกษาในระหว่างการวิจัย ต้องใช้จำนวนตัวอย่างอย่างน้อย 112 คน)

#### วิธีการแบ่งกลุ่มตัวอย่าง (Random allocation)

การศึกษานี้แบ่งผิวหนังบริเวณแผ่นหลังส่วนล่างในผู้ป่วยที่ผ่านเกณฑ์คัดกรองเข้าร่วมงานวิจัยแล้วโดยสุ่มตำแหน่งการติดแผ่นเนื้อเยื่อปิดแผลผสมโปรตีนกาวไหม และแผ่นปิดแผลในห้องทดลอง ด้วยวิธี blocked randomization ด้วยขนาด block เท่ากับ 4

#### 1.4 จัดเตรียมอุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

1. แบบฟอร์มบันทึกข้อมูลอาสาสมัคร (ว.1)
2. แบบฟอร์มบันทึกคะแนนประเมินอาการไม่พึงประสงค์ทางผิวหนัง (ว.2)
3. เอกสารชี้แจงผู้เข้าร่วมโครงการวิจัย (ว.3)
4. เอกสารแสดงความยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัย (ว.4)
5. แผ่นเนื้อเยื่อปิดแผลผสมโปรตีนกาวไหม ซึ่งทำการผลิตและควบคุมคุณภาพโดยห้องปฏิบัติการวิจัยทางวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และแผ่นปิดแผลในห้องทดลอง (Bactigras®; บริษัท Smith & Nephew)

#### ขั้นตอนที่ 2: การดำเนินการวิจัย

1. ชี้แจงรายละเอียดของการวิจัยแก่ผู้ที่เกี่ยวข้อง  
ชี้แจงและอธิบายให้ผู้ที่เกี่ยวข้องในจุดที่ดำเนินการเก็บข้อมูลทราบรายละเอียดของการวิจัย (ว.3) เพื่อสร้างความเข้าใจในทีมและปรับความสะดวกในการเก็บข้อมูล
2. การดำเนินการวิจัย

## 2.1 การรับอาสาสมัครเข้าร่วมการดำเนินการวิจัย

- 2.1.1 ผู้วิจัยคัดเลือกอาสาสมัครเข้าร่วมการวิจัยตามเกณฑ์การคัดเลือกตัวอย่างตามที่ระบุไว้ในหัวข้อประชากร กลุ่มตัวอย่าง และเกณฑ์การคัดเลือกตัวอย่างเข้าร่วมการวิจัย อาสาสมัครทุกรายจะได้รับทราบวัตถุประสงค์ของการวิจัย วิธีวิจัย อันตรายหรืออาการข้างเคียงที่อาจเกิดขึ้นจากแผ่นปิดแผลตัวอย่างที่ทดสอบ และการปฏิบัติตัวในระหว่างที่เข้าร่วมการวิจัย พร้อมกับลงนามในเอกสารยินยอมเข้าร่วมการวิจัย (ว.4)
- 2.1.2 บันทึกข้อมูลพื้นฐานของอาสาสมัครแต่ละรายลงในแบบบันทึกข้อมูลพื้นฐานของอาสาสมัคร
- 2.1.3 ทำการวิจัยในห้องปิดสนิทที่มีการควบคุมแสงและความชื้น ตรวจระดับความแดงของผิวหนังด้วยเครื่อง Cutometer® ด้วยโหมด Mexameter และถ่ายภาพผิวหนังเมื่อเริ่มต้นการวิจัยด้วยกล้อง Canon EOS 400D เลนส์ซูม EF 35 มิลลิเมตร/f 2.0
- 2.1.4 ติดแผ่นเนื้อเยื่อปิดแผลผสมโปรตีนกาวไหม และแผ่นปิดแผลกลุ่มควบคุม (Bactigras®) ขนาด 4x4 cm อย่างละ 2 แผ่น โดยสุ่มตำแหน่งบริเวณแผ่นหลังของอาสาสมัคร (ดังรูปที่ 1) ทิ้งไว้เป็นเวลา 72 ชั่วโมง แล้วเปลี่ยนแผ่นปิดแผลใหม่ในตำแหน่งเดิม ทิ้งไว้อีก 72 ชั่วโมง จนกระทั่ง ครบ 2 รอบ ขั้นตอนนี้จะเรียกว่า Induction phase
- 2.1.5 เมื่อทำการปิดผิวหนังด้วยแผ่นปิดแผลตัวอย่างครบ 2 รอบแล้ว เว้นระยะเวลา 7 - 10 วัน จึงนำอาสาสมัครที่ไม่พบอาการข้างเคียงในขั้นตอน induction phase มาเพื่อติดแผ่นปิดแผลทั้งสองชนิดซ้ำ และทิ้งไว้อีก 72 ชั่วโมง เรียกขั้นตอนนี้ว่า Challenge phase
- 2.1.6 ทุกครั้งที่มีการเปลี่ยนแผ่นปิดแผล จะตรวจระดับความแดงของผิวหนังด้วยเครื่อง Cutometer® ด้วยโหมด Mexameter และถ่ายภาพผิวหนังภายใน 30 นาที หลังเปิดแผ่นปิดแผลทุกครั้ง
- 2.1.7 ประเมินสภาพผิวจากรูปถ่ายโดยแพทย์ผู้เชี่ยวชาญด้านผิวหนังจำนวน 3 ท่าน ซึ่งแต่ละท่านไม่ทราบว่าตำแหน่งใด ติดแผ่นเนื้อเยื่อปิดแผลผสมโปรตีนกาวไหม หรือแผ่นปิดแผลกลุ่มควบคุม
- 2.1.8 รวบรวมข้อมูล วิเคราะห์ข้อมูล และสรุปผลการวิจัย

### **ขั้นตอนที่ 3:วิเคราะห์ข้อมูลและอภิปราย**

การทดสอบสมมติฐานกำหนดระดับนัยสำคัญที่ 0.05 (one-sided) โดยใช้โปรแกรมสถิติ SPSS for windows (version 13.0, SPSS Inc. Bangkok, Thailand) การวิเคราะห์มีรายละเอียดดังนี้

3.1 ลักษณะทั่วไปของกลุ่มตัวอย่าง ได้แก่ เพศ อายุ น้ำหนัก ทำการวิเคราะห์โดยใช้สถิติเชิงพรรณนา คือ ร้อยละ ค่ามัธยฐานเลขคณิต และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

3.2 การเปรียบเทียบค่าความแดงจากเครื่อง Cutometer<sup>®</sup> คะแนนประเมินการเกิดอาการข้างเคียง โดยแพทย์ผู้เชี่ยวชาญด้านผิวหนัง ใช้สถิติ Paired-Samples t-test และ Repeated Measured ANOVA

#### **ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ**

1. ได้ข้อมูลเบื้องต้นในด้านอาการไม่พึงประสงค์ทางผิวหนังของแผ่นเนื้อเยื่อปิดแผลผสมโปรตีน กาวใหม่
2. แผ่นเนื้อเยื่อผสมโปรตีนกาวใหม่จะเป็นอีกทางเลือกหนึ่งให้กับผู้ป่วยที่ต้องได้รับการรักษาด้วยการผ่าตัดผิวหนัง

### เอกสารประกอบหมายเลข 3

#### เอกสารอ้างอิง

1. Andreassi A, Bilenchi R, Biagioli M, D'Aniello C. Classification and pathophysiology of skin grafts. *Clinics in Dermatology*. 2005;23(4):332-7.
2. Hierner R, Degreef H, Vranckx JJ, Garmyn M, Massagé P, van Brussel M. Skin grafting and wound healing--the "dermato-plastic team approach". *Clinics in Dermatology*. 2005;23(4):343-52.
3. Voineskos SH, Ayeni OA, McKnight L, Thoma A. Systematic Review of Skin Graft Donor-Site Dressings. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 2009;124(1):298-306
4. Maitra AK. Use of the split-skin graft in casualty practice. *Resuscitation*. 1976;5(3):205-9.
5. Valencia IC, Falabella AF, Eaglstein WH. SKIN GRAFTING. *Dermatologic Clinics*. 2000;18(3):521-32.
6. MedMarket Diligence L. Prevalence of dermal applications for sealants and glues. *Worldwide Surgical Sealants, Glues and Wound closure*. [Report #S175]. 2009-2013.
7. Kornhaber R. Skin Graft Management Guidelines. Northern Sydney Central Coast Health. 2010:1-20.
8. Feldman DL. Which Dressing for Split-Thickness Skin Graft Donor Sites? *Annals of Plastic Surgery*. 1991;27(3):288-91.
9. Barnett A, Berkowitz RL, Mills R, Vistnes LM. Comparison of synthetic adhesive moisture vapor permeable and fine mesh gauze dressings for split-thickness skin graft donor sites. *The American Journal of Surgery*. 1983;145(3):379-81.
10. Barnea Y, Amir A, Leshem D, Zaretski A, Weiss J, Shafir R, et al. Clinical Comparative Study of Aquacel and Paraffin Gauze Dressing for Split-Skin Donor Site Treatment. *Annals of Plastic Surgery*. 2004;53(2):132-6.
11. Rakel BA, Bermel MA, Abbott LI, Baumler SK, Burger MR, Dawson CJ, et al. Split-thickness skin graft donor site care: a quantitative synthesis of the research. *Applied Nursing Research*. 1998;11(4):174-82.

12. Cihantimur B, Kahveci R, Özcan M. Comparing Kaltostat with Jelonet in the treatment of split-thickness skin graft donor sites. *European Journal of Plastic Surgery*. 1997;20(5):260-3.
13. Steenfos H, Partoft S, Timshel S, Balslev E. Comparison of SureSkin®, DuoDerm E® and Jelonet® Gauze in split skin donor sites -- a clinical and histological evaluation. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. 1997;8(1):18-22.
14. Wiechula R. The use of moist wound-healing dressings in the management of split-thickness skin graft donor site: a systematic review. *International Journal of Nursing Practice*. 2003;9:S9-S17.
15. Watanasit Y, Jitsurong S, Wansu F, Chichareon V. The application of cellulose (Thainanocell®) wound dressing on acute wound with partial thickness loss. *Songkla Med J*. 2009;27(3):235-47.
16. Shevchenko RV, James SL, James SE. A review of tissue-engineered skin bioconstructs available for skin reconstruction. *J R Soc Interface*. 2010;7:229-58.
17. Harding K, Cutting K, Price P. The cost-effectiveness of wound management protocols of care. *Br J Nurs* 2000;9(19):6-10.
18. Fabiani C, Pizzichini M, Spadoni M, Zeddita G. Treatment of waste water from silk degumming processes for protein recovery and water reuse. *Desalination*. 1996;105(1-2):1-9.
19. Vaithanomsat P, Kitpreechavanich V. Sericin separation from silk degumming wastewater. *Separation and Purification Technology*. 2008;59(2):129-33.
20. Padamwar MN, Pawar AP, Daithankar AV, Mahadik KR. Silk sericin as a moisturizer: an in vivo study. *Journal of Cosmetic Dermatology*. 2005;4(4):250-7.
21. Terada S, Yanagihara K, Kaito K, Miki M, Sasaki M, Tsujimoto K, et al. Silk Protein Sericin Accelerates Proliferation of Various Mammalian Cells. In: Gòdia F, Fussenegger M, editors. *Animal Cell Technology Meets Genomics*: Springer Netherlands; 2005. p. 585-7.

22. Dash R, Acharya C, Bindu P, Kundu S. Antioxidant potential of silk protein sericin against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in skin fibroblasts BMB Rep. 2008;41(3):236-41.
23. Aramwit P, Sangcakul A. The Effects of Sericin Cream on Wound Healing in Rats. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. 2007;71(10):2473-7.
24. Aramwit P, Kanokpanont S, De-Eknamkul W, Srichana T. Monitoring of inflammatory mediators induced by silk sericin. Journal of Bioscience and Bioengineering. 2009;107(5):556-61.
25. Namviriyachote N, Aramwit P, Palapinyo S, Muengman P. Case report: Topical silver zinc sulfadiazine for treatment of deep partial thickness burn wounds. Thai Journal of Burn Injury. 2010;4(7):5-13.
26. Aramwit P, Siritientong T, Kanokpanont S, Srichana T. Formulation and characterization of silk sericin-PVA scaffold crosslinked with genipin. International Journal of Biological Macromolecules. 2010;47(5):668-75.
27. Hattingh J. The relationship between skin structure and transepidermal water loss. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology. 1973;45(3):685-8.
28. Berardesca E, Maibach H. Ethnic skin: Overview of structure and function. Journal of the American Academy of Dermatology. 2003;48(6, Supplement 1):S139-S42.
29. Muengman P. Benefit and cost effectiveness of various wound dressing. Frontier in Wound Care. 2010:80-97.
30. JBI. Split Skin Graft Donor Sites: Post Harvest Management. Best Practice. 2002;6(2):1-5.
31. Zhang Y-Q. Applications of natural silk protein sericin in biomaterials. Biotechnology Advances. 2002;20(2):91-100.
32. Mondal M, Trivedy K, Kumar NS. The silk proteins, sericin and fibroin in silkworm, *Bombyx mori* Linn., - A review Caspian Journal of Environmental Science. 2007;5(2):63-76.
33. Padamwar M, Pawar A. Silk sericin and its applications: a review. Journal of Scientific and Industrial Reserach. 2004;63:323-9.



34. Sehnal F. Prospects of the practical use of silk sericins. *Entomological Research*. 2008;38:S1-S8.
35. Kato N, Sato S, Yamanaka A, Yamada H, Fuwa N, Nomura M. Silk Protein, Sericin, Inhibits Lipid Peroxidation and Tyrosinase Activity. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 1998;62(1):145-7.
36. Kundu SC, Dash BC, Dash R, Kaplan DL. Natural protective glue protein, sericin bioengineered by silkworms: Potential for biomedical and biotechnological applications. *Progress in Polymer Science*. 2008;33(10):998-1012.
37. Nagai N, Murao T, Ito Y, Okamoto N, Sasaki M. Enhancing Effects of Sericin on Corneal Wound Healing in Rat Debrided Corneal Epithelium. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 2009;32(5):933-6.
38. Nagai N, Murao T, Ito Y, Okamoto N, Sasaki M. Enhancing Effects of Sericin on Corneal Wound Healing in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty Rats as a Model of Human Type 2 Diabetes. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 2009;32(9):1594-9.
39. Teramoto H, Kameda T, Tamada Y. Preparation of Gel Film from Bombyx mori Silk Sericin and Its Characterization as a Wound Dressing. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2008;72(12):3189-96.
40. McNamee P, Api A, Basketter D, Gerberick G, Gilpin D, Hall B, et al. A review of critical factors in the conduct and interpretation of the human repeat insult patch test. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2008;52:24-34.

#### เอกสารหมายเลข 4

#### ภาคผนวก (Appendix)

- แบบฟอร์มบันทึกข้อมูลอาสาสมัคร
- เกณฑ์คะแนนประเมินอาการไม่พึงประสงค์ทางผิวหนัง
- เอกสารชี้แจงผู้เข้าร่วมโครงการวิจัย
- เอกสารแสดงความยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัย

แบบบันทึกข้อมูลพื้นฐานของอาสาสมัครเรื่อง ความปลอดภัยของแผ่นเนื้อเยื่อปิดแผลผสมโปรตีนกาวไหมในอาสาสมัครสุขภาพดี	
หมายเลขอาสาสมัคร .....	
1. เพศ	<input type="checkbox"/> ชาย <input type="checkbox"/> หญิง
2. อายุ	<input type="text"/> <input type="text"/> ปี
3. น้ำหนัก	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> กิโลกรัม
4. ส่วนสูง	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> เซนติเมตร
5. BMI	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> kg/m <sup>2</sup>
6. อาชีพ.....	.....
7. โรคประจำตัว	<input type="checkbox"/> มี โปรดระบุ..... ยาที่ใช้ประจำ..... <input type="checkbox"/> ไม่มี
8. ต่อมแอดลอกอซัลด์	<input type="checkbox"/> ต่อม โปรดระบุปริมาณและความถี่..... <input type="checkbox"/> ไม่ต่อม <input type="checkbox"/> หยุดต่อมแล้ว นาน..... โปรดระบุปริมาณและความถี่เฉลี่ยก่อนหยุดต่อม.....
9. สูบบุหรี่	<input type="checkbox"/> สูบ โปรดระบุปริมาณและความถี่..... <input type="checkbox"/> ไม่สูบ <input type="checkbox"/> หยุดสูบแล้ว นาน..... โปรดระบุปริมาณและความถี่เฉลี่ยก่อนหยุดสูบ.....
10. มีการใช้ยาแก้แพ้กลุ่มฮีสตามีนหรือสเตียรอยด์ ทั้งรูปแบบรับประทานหรือทาเฉพาะที่ในระยะเวลา 1 สัปดาห์ก่อนเข้าร่วมการวิจัยหรือไม่?	<input type="checkbox"/> ใช่ โปรดระบุสาเหตุที่ใช้..... ชื่อและความแรงของยาที่ใช้..... <input type="checkbox"/> ไม่ใช่

## เกณฑ์คะแนนประเมินอาการไม่พึงประสงค์โดยแพทย์ผิวหนัง

### Erythema scale:

This scale is used only for grading degree of erythema (redness). A score on this scale will be assigned following every application of a patch.

- 0 No visible erythema.
- 1 Mild erythema (faint pink to definite pink).
- 2 Moderate erythema (definite redness).
- 3 Severe erythema (very intense redness).

### Designations for elevated responses:

Edema, papules, vesicles, and bullae, if present, are graded as independent responses.

- E Edema - definite swelling. (0-4 ; no edema – severe edema)
- P Papules - many small, red, solid elevations; surface of reaction has granular feeling.
- V Vesicles - small, circumscribed elevations having translucent surfaces so that fluid is visible (blister-like). Vesicles are no larger than 0.5 cm in diameter.
- B Bullae - vesicles with a diameter > 0.5 cm; vesicles may coalesce to form one or a few large blisters that fill the patch site.

## คะแนนประเมินอาการไม่พึงประสงค์

หมายเลขอาสาสมัคร.....

## ตำแหน่งที่ 1

ลักษณะ	คะแนนประเมินสภาพผิวหนังโดยเปรียบเทียบกับวันที่1				เกณฑ์ประเมิน
	วันที่2	วันที่3	วันที่4	วันที่5	
Erythema					0-3
Edema					0-4
Papules					มี/ไม่มี
Vesicles					มี/ไม่มี
Bullae					มี/ไม่มี

## ตำแหน่งที่ 2

ลักษณะ	คะแนนประเมินสภาพผิวหนังโดยเปรียบเทียบกับวันที่1				เกณฑ์ประเมิน
	วันที่2	วันที่3	วันที่4	วันที่5	
Erythema					0-3
Edema					0-4
Papules					มี/ไม่มี
Vesicles					มี/ไม่มี
Bullae					มี/ไม่มี

## ตำแหน่งที่ 3

ลักษณะ	คะแนนประเมินสภาพผิวหนังโดยเปรียบเทียบกับวันที่1				เกณฑ์ประเมิน
	วันที่2	วันที่3	วันที่4	วันที่5	
Erythema					0-3
Edema					0-4
Papules					มี/ไม่มี
Vesicles					มี/ไม่มี
Bullae					มี/ไม่มี

## ตำแหน่งที่ 4

ลักษณะ	คะแนนประเมินสภาพผิวหนังโดยเปรียบเทียบกับวันที่1				เกณฑ์ประเมิน
	วันที่2	วันที่3	วันที่4	วันที่5	
Erythema					0-3
Edema					0-4
Papules					มี/ไม่มี
Vesicles					มี/ไม่มี
Bullae					มี/ไม่มี

แบบฟอร์มการวัดความแดงของผิวหนังด้วยเครื่อง Mexameter MX18

วันที่ ...../...../.....

หมายเลขอาสาสมัคร.....

ตำแหน่งที่  1

2

3

4

ความแดงของ ผิวหนัง (วัดตำแหน่ง ละ 10 ซ้ำ)	Baseline	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
1				
2				
3				
4				
5				
6				
7				
8				
9				
10				
Mean				
SD				

## เอกสารชี้แจงผู้เข้าร่วมโครงการวิจัย

(Patient or Participant Information Sheet)

ชื่อโครงการศึกษาวิจัยเรื่อง (ภาษาไทย)	ความปลอดภัยของแผ่นเนื้อเยื่อปิดแผลผสมโปรตีนกาวไหมในอาสาสมัครสุขภาพดี
(ภาษาอังกฤษ)	SAFETY OF THE SILK SERICIN/PVA SCAFFOLD IN HEALTHY VOLUNTEERS
ชื่อผู้วิจัยหลัก (ภาษาไทย)	ภ.ญ. ทิพวรรณ ศิริเกียรติทอง
(ภาษาอังกฤษ)	MISS TIPPAWAN SIRITIENTONG, B. Sc.
หน่วยงานที่ทำการศึกษาวิจัย	คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
โทรศัพท์ (สามารถติดต่อได้ 24 ชั่วโมง)	08-1805-5246

ท่านได้รับเชิญให้เข้าร่วมการศึกษาวิจัยเรื่อง ความปลอดภัยของแผ่นเนื้อเยื่อปิดแผลผสมโปรตีนกาวไหมในอาสาสมัครสุขภาพดี ก่อนที่ท่านจะตัดสินใจให้ความยินยอมเข้าร่วมการศึกษาวิจัยนี้ ผู้วิจัยใคร่ขอชี้แจงรายละเอียดของโครงการวิจัยให้ท่านทราบ และขอให้ท่านทำความเข้าใจขั้นตอนที่ผู้วิจัยจะขอให้ท่านปฏิบัติ ขั้นตอนนี้เป็น “กระบวนการให้คำยินยอม” ก่อนเริ่มดำเนินการวิจัย ผู้วิจัยจะขอทำการคัดกรองว่าท่านมีความเหมาะสมที่จะเข้าร่วมการวิจัยหรือไม่ โดยจะตรวจสอบสภาพผิวหนังและซักถามข้อมูลต่าง ๆ เพื่อดูว่าท่านมีคุณสมบัติหรือสุขภาพดีตามเกณฑ์คัดเลือกเข้าร่วมการวิจัย หากท่านผ่านการตรวจคัดกรองแล้วพบว่าท่านมีความเหมาะสมที่จะเข้าร่วมการวิจัย ผู้วิจัยจะดำเนินการเป็นขั้นตอนดังจะชี้แจงให้ทราบต่อไป

กรุณาอ่านข้อมูลต่อไปนี้อย่างรอบคอบ และสอบถามถึงข้อสงสัยต่างๆ โดยไม่ลังเล

### 1. บทนำ

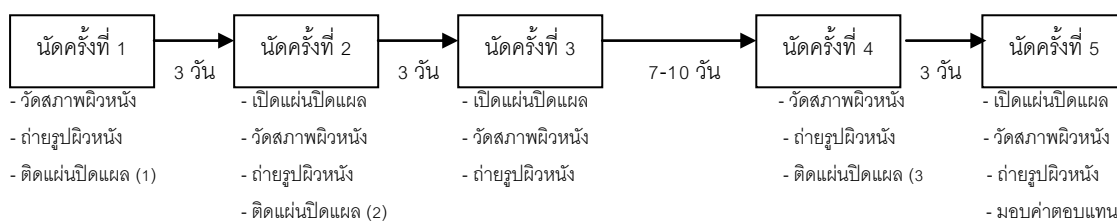
โครงการวิจัยนี้เป็นการศึกษาเชิงคลินิก เพื่อประเมินความปลอดภัยของแผ่นเนื้อเยื่อปิดแผลผสมโปรตีนกาวไหมในอาสาสมัครสุขภาพดี จำนวนผู้เข้าร่วมโครงการวิจัย 112 ราย ซึ่งมีการศึกษาก่อนหน้าที่พบคุณสมบัติของโปรตีนกาวไหมว่าสามารถรักษาความชุ่มชื้นให้แก่ผิวได้ดี โดยไม่ก่อให้เกิดการระคายเคืองผิวหนัง

#### 1. วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อประเมินความปลอดภัยของแผ่นเนื้อเยื่อปิดแผลผสมโปรตีนกาวไหมในอาสาสมัครสุขภาพดี โดยการตรวจวัดระดับความแดงของผิวหนัง และประเมินสภาพผิวหนังที่สัมผัสกับแผ่นเนื้อเยื่อตัวอย่างโดยแพทย์ผิวหนัง ก่อนและหลังใช้

#### 2. วิธีการศึกษาวิจัย

หากท่านตกลงเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้ ผู้วิจัยจะขอบันทึกข้อมูลทั่วไปของท่าน ตรวจระดับความแดงของผิวหนังบริเวณแผ่นหลังด้วยเครื่องมือเฉพาะ และถ่ายภาพผิวหนังก่อนเริ่มการวิจัย ภายในห้องปิดสนิทที่มีการควบคุมแสง จำนวนผู้เข้าร่วมการวิจัยนี้ คาดว่าจะมี 112 คน ซึ่งทุกคนจะได้รับการติดแผ่นเนื้อเยื่อปิดแผลผสมโปรตีนกาวไหมและแผ่นปิดแผลตามท้องตลาดบริเวณแผ่นหลัง อย่างละ 2 แผ่น ทั้งไว้ 72 ชั่วโมง (3 วัน) คิดเป็น 1 รอบ ทำเช่นนี้ 2 รอบ ต่อเนื่องกัน แล้วเว้นระยะประมาณ 7 - 10 วัน ก่อนจะติดแผ่นปิดแผลตัวอย่างดังกล่าวที่ตำแหน่งเดิมซ้ำอีกครั้ง โดยทุกครั้งที่มีการเปลี่ยนแผ่นปิดแผล ผู้วิจัยจะตรวจระดับความแดงของผิวหนังด้วยเครื่องมือเฉพาะ ถ่ายภาพผิวหนังภายใน 30 นาที หลังเปิดแผ่นปิดแผล เพื่อนำไปประเมินสภาพผิวโดยแพทย์ผู้เชี่ยวชาญด้านผิวหนัง



### 3. ความเสี่ยง ความไม่สบาย และผลข้างเคียงที่อาจเกิดขึ้น

ท่านมีโอกาสแพ้โปรตีนกาวไหม อย่างไรก็ตามการศึกษานี้มีการติดตามการรักษาโดยแพทย์ผู้เชี่ยวชาญด้านผิวหนังตลอดระยะเวลาวิจัย จึงมีการเฝ้าระมัดระวังเหตุการณ์ไม่พึงประสงค์อย่างต่อเนื่องและใกล้ชิดจนจบการวิจัย

### 4. ผลประโยชน์ที่อาจจะได้รับ

ท่านจะไม่ได้รับประโยชน์ใดๆ จากการศึกษาโดยตรง แต่ผลการศึกษาจะเป็นการยืนยันความปลอดภัยของแผ่นเนื้อเยื่อ ปิดแผลผสมโปรตีนกาวไหมในการเป็นอีกทางเลือกหนึ่งให้กับผู้ป่วยที่มีบาดแผลบริเวณผิวหนัง เนื่องจากเป็นแผ่นปิดแผลที่สามารถผลิตได้เองโดยวัสดุในประเทศ รวมถึงเพิ่มมูลค่าทั้งทางเศรษฐกิจ สังคมและสิ่งแวดล้อมของประเทศไทยต่อไป

### 5. ค่าใช้จ่ายและค่าชดเชย

เพื่อแสดงความขอบคุณที่ท่านได้เสียสละเข้าร่วมงานวิจัย รวมถึงให้ความร่วมมือตลอดระยะเวลาวิจัย ผู้วิจัยจะขอมอบค่าตอบแทน 200 บาทแก่ท่าน เมื่อสิ้นสุดงานวิจัย

### 6. เงินชดเชยสำหรับการบาดเจ็บหรืออันตรายที่อาจเกิดขึ้น

กรณีที่ท่านเกิดเหตุการณ์ไม่พึงประสงค์ในระหว่างการศึกษา ท่านจะได้รับการดูแลรักษาอย่างใกล้ชิดจากแพทย์ผู้เชี่ยวชาญด้านผิวหนังจนหายสนิท โดยผู้วิจัยจะเป็นผู้รับผิดชอบค่าใช้จ่ายทั้งหมด

### 7. สิทธิในการถอนตัวออกจากการศึกษาวิจัย

ท่านมีสิทธิในการถอนตัวออกจากการศึกษาวิจัยเมื่อใดก็ได้ โดยไม่มีผลกระทบใดๆ ทั้งสิ้น

### 8. การรักษาความลับของบันทึกทางการแพทย์ และข้อมูลการศึกษาวิจัย

ข้อมูลทุกอย่างของท่านจะเก็บเป็นความลับในตู้เอกสารซึ่งคณะผู้วิจัยเท่านั้นที่สามารถนำมาใช้ได้ การรายงานผลการวิจัยจะเป็นภาพรวม และนำเสนอเป็นรหัสรายบุคคล ไม่มีข้อมูลส่วนหนึ่งส่วนใดที่เป็นการระบุถึงตัวท่าน

### 9. การเปิดเผยข้อมูลการศึกษาวิจัย

ผู้ที่มีสิทธิเข้าถึงข้อมูลการวิจัย ได้แก่ ข้าพเจ้าเภสัชกรหญิงทิพวรรณ ศิริเกียรติทอง

### 10. การสอบถามข้อสงสัย

ชื่อผู้วิจัยที่สามารถติดต่อได้ คือ เภสัชกรหญิงทิพวรรณ ศิริเกียรติทอง คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย หมายเลขโทรศัพท์ที่ติดต่อได้สะดวก คือ 08-1805-5246 หรือ 0-2218-8408



## เอกสารแสดงความยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัย

หนังสือแสดงความยินยอม  
(Consent Form)

การศึกษาวิจัยเรื่อง (ภาษาไทย) ความปลอดภัยของแผ่นเนื้อเยื่อปิดแผลผสมโปรตีนกาวไหมในอาสาสมัครสุขภาพดี  
(ภาษาอังกฤษ) SAFETY OF THE SILK SERICIN/PVA SCAFFOLD IN HEALTHY VOLUNTEERS

วันที่ให้คำยินยอม วันที่..... เดือน..... พ.ศ. ....

ข้าพเจ้า (นาย/ นาง/ นางสาว) ..... นามสกุล .....

อยู่บ้านเลขที่ ..... ซอย ..... ถนน ..... แขวง/ ตำบล .....

เขต/ อำเภอ ..... จังหวัด ..... รหัสไปรษณีย์ .....

ก่อนที่จะลงนามในใบยินยอมให้ทำการวิจัยนี้ ข้าพเจ้าได้รับเอกสารข้อมูลคำอธิบาย/ คำชี้แจงสำหรับอาสาสมัครที่เข้าร่วมการวิจัย จากผู้วิจัยให้ทราบถึงวัตถุประสงค์ของการวิจัย วิธีวิจัย อันตรายหรืออาการข้างเคียงที่อาจเกิดขึ้นจากการวิจัยหรือจากแผ่นเนื้อเยื่อผสมโปรตีนกาวไหมที่ใช้ รวมทั้งประโยชน์ที่เกิดขึ้นจากการวิจัยอย่างละเอียด และมีความเข้าใจดีแล้ว ผู้วิจัยได้ตอบคำถามต่างๆ ที่ข้าพเจ้าสงสัยด้วยความเต็มใจ ไม่ปิดบัง ซ่อนเร้น จนข้าพเจ้าพอใจ

ผู้วิจัยรับรองว่า “จะเก็บข้อมูลเฉพาะเกี่ยวกับตัวข้าพเจ้าไว้เป็นความลับ และจะเปิดเผยได้เฉพาะในรูปแบบที่เป็นสรุปผลการวิจัย” เท่านั้น


ในการวิจัยครั้งนี้ ข้าพเจ้ายอมให้ผู้วิจัยติดแผ่นเนื้อเยื่อผสมโปรตีนกาวไหมที่ผิวหนังปกติบริเวณแผ่นหลังของข้าพเจ้า ณ จุดที่กำหนดโดยเปลี่ยนทุก 3 วัน ติดต่อกัน 2 ครั้ง เว้นระยะเวลาประมาณ 1 สัปดาห์ และทำซ้ำอีก 1 รอบ เพื่อประเมินลักษณะของผิวหนังหลังสัมผัสกับแผ่นเนื้อเยื่อดังกล่าว สารชนิดต่าง ๆ ที่อยู่ในแผ่นเนื้อเยื่อผสมโปรตีนกาวไหมนั้นเป็นสารที่อนุญาตให้ใช้ในเครื่องสำอางได้โดยไม่เกิดอันตรายกับผิวหนัง แต่สำหรับบางคนซึ่งมีผิวหนังที่แพ้ง่ายอาจจะเกิดอาการระคายเคืองหรือเกิดผื่นแพ้ได้ ผู้วิจัยรับรองว่า หากเกิดอันตรายใดๆ จากการวิจัยดังกล่าว ข้าพเจ้าจะได้รับการรักษาพยาบาลโดยไม่คิดมูลค่า และจะได้รับการชดเชยรายได้ที่สูญเสียไประหว่างการรักษาพยาบาลดังกล่าว ตลอดจนเงินทดแทนความพิการที่อาจจะเกิดขึ้น หากมีข้อสงสัยใด ๆ ข้าพเจ้าสามารถติดต่อได้ที่ 08-1805-5246 โดยบุคคลที่รับผิดชอบเรื่องนี้เป็น ก.ญ.ทิพวรรณ ศิริเกียรติทอง ตลอดการวิจัย

ข้าพเจ้าเข้าร่วมโครงการนี้ด้วยความสมัครใจและมีสิทธิที่จะบอกเลิกการเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้เมื่อใดก็ได้ โดยการบอกเลิกจะไม่มีผลต่อการรักษาที่ข้าพเจ้าจะได้รับต่อไป

ข้าพเจ้าได้อ่านข้อความข้างต้นแล้ว มีความเข้าใจดีทุกประการ จึงได้ลงนามในใบยินยอมนี้ด้วยความเต็มใจ พร้อมนี้ข้าพเจ้าได้รับสำเนาเอกสารแสดงความยินยอมเข้าร่วมการวิจัยที่ข้าพเจ้าได้ลงนามและวันที่แล้วและเอกสารข้อมูลคำอธิบายสำหรับผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยแล้ว 1 ชุด

ลงนาม .....	ผู้ให้ความยินยอม
(.....) ชื่อตัวบรรจง	
ลงนาม .....	ผู้รับผิดชอบการวิจัย
(.....) ชื่อตัวบรรจง	
ลงนาม .....	พยาน
(.....) ชื่อตัวบรรจง	
ลงนาม .....	พยาน
(.....) ชื่อตัวบรรจง	

## Appendix D



COA No. 129/2012  
IRB No. 004/55

**INSTITUTIONAL REVIEW BOARD**  
**Faculty of Medicine, Chulalongkorn University**  
1873 Rama 4 Road, Patumwan, Bangkok 10330, Thailand, Tel 662-256-4455 ext 14, 15

---

**Certificate of Approval**

The Institutional Review Board of the Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand, has approved the following study which is to be carried out in compliance with the International guidelines for human research protection as Declaration of Helsinki, The Belmont Report, CIOMS Guideline and International Conference on Harmonization in Good Clinical Practice (ICH-GCP)

**Study Title** : Clinical efficacy of wound dressing containing silk sericin for split-thickness skin graft donor site treatment.

**Study Code** : -

**Principal Investigator** : Miss Tippawan Siritientong B.Sc.


**Study Center** : Faculty of Pharmacy, Chulalongkorn University


**Review Method** : Full board

**Continuing Report** : Every 6 months.

**Document Reviewed** :

1. Protocol Version 2.0 Dated 1 Feb 2012
2. Protocol Synopsis Version 1.0 Date Jan 9, 2012
3. Information sheet for research participant Version 2.0 Dated 1 Feb 2012
4. Consent Form Version 2.0 Dated 1 February 2012
5. Data entry sheet/ Case record form Version 1.0 Date Jan 9, 2012

Signature:  (Emeritus Professor Tada Sueblinwong MD)  
Chairperson  
The Institutional Review Board

Signature:  (Assistant Professor Prapapan Rajatapiti MD, PhD)  
Member and Assistant Secretary, Acting  
Secretary The Institutional Review Board

**Date of Approval** : February 23, 2012

**Approval Expire Date** : February 22, 2013

Approval granted is subject to the following conditions: (see back of this Certificate)

All approved investigators must comply with the following conditions:

1. Strictly conduct the research as required by the protocol;
2. Use only the information sheet, consent form (and recruitment materials, if any), interview outlines and/or questionnaires bearing the Institutional Review Board's seal of approval ; and return one copy of such documents of the first subject recruited to the Institutional Review Board (IRB) for the record;
3. Report to the Institutional Review Board any serious adverse event or any changes in the research activity within five working days;
4. Provide reports to the Institutional Review Board concerning the progress of the research upon the specified period of time or when requested;
5. If the study cannot be finished within the expire date of the approval certificate, the investigator is obliged to reapply for approval at least one month before the date of expiration.

\* A list of the Institutional Review Board members (names and positions) present at the meeting of Institutional Review Board on the date of approval of this study has been attached. All approved documents will be forwarded to the principal investigator.



COA No. 129/2012  
IRB No. 004/55

คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน  
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
1873 ถ.พระราม 4 เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330 โทร. 0-2256-4455 ต่อ 14, 15

**เอกสารรับรองโครงการวิจัย**

คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ดำเนินการให้การรับรองโครงการวิจัยตามแนวทางหลักจริยธรรมการวิจัยในคนที่เป็นมาตรฐานสากลได้แก่ Declaration of Helsinki, The Belmont Report, CIOMS Guideline และ International Conference on Harmonization in Good Clinical Practice หรือ ICH-GCP

**ชื่อโครงการ** : ประสิทธิภาพทางคลินิกของแผ่นปิดแผลผสมเซรามิกใหม่ในการรักษาบาดแผลจากการปลูกถ่ายผิวหนังที่มีหนังแท้เหลืออยู่บางส่วน

**เลขที่โครงการวิจัย** : -

**ผู้วิจัยหลัก** : นางสาวพิพรพรรณ ศิริเกียรติทอง

**สังกัดหน่วยงาน** : คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**วิธีทบทวน** : คณะกรรมการเดิมชุด

**รายงานความก้าวหน้า** : ส่งรายงานความก้าวหน้าอย่างน้อยทุก 6 เดือน

**เอกสารรับรอง** :

1. โครงการวิจัย Version 2.0 Dated 1 Feb 2012
2. โครงการวิจัยฉบับแก้ไข Version 1.0 Date Jan 9, 2012
3. เอกสารข้อมูลคำอธิบายสำหรับผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย Version 2.0 Dated 1 Feb 2012
4. เอกสารแสดงความยินยอมเข้าร่วมในโครงการวิจัย Version 2.0 Dated 1 February 2012
5. Data entry sheet/ Case record form Version 1.0 Date Jan 9, 2012

ลงนาม Tim S. W. Wong  
(ศาสตราจารย์กิตติคุณแพทย์หญิงอานา สิมสิงห์วงศ์)

ประธาน  
คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน

ลงนาม Yamwong Kiatkai  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พญ.ประภาพรพรรณ รือตะปิติ)

กรรมการและผู้ช่วยเลขานุการปฏิบัติหน้าที่แทนเลขานุการ  
คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน

**วันที่รับรอง** : 23 กุมภาพันธ์ 2556

**วันหมดอายุ** : 22 กุมภาพันธ์ 2556

ทั้งนี้ การรับรองนี้มีเงื่อนไขดังที่ระบุไว้ด้านหลังทุกข้อ (ดูด้านหลังของเอกสารรับรองโครงการวิจัย)

นักวิจัยทุกท่านที่ผ่านการรับรองจริยธรรมการวิจัยต้องปฏิบัติดังต่อไปนี้

1. ดำเนินการวิจัยตามที่ระบุไว้ในโครงการวิจัยอย่างเคร่งครัด
2. ใช้เอกสารแนะนำอาสาสมัคร ในยินยอม (และเอกสารเชิญเข้าร่วมวิจัยหรือใบโฆษณาถ้ามี) แบบสัมภาษณ์ และหรือ แบบสอบถาม เฉพาะที่มีตราประทับของคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมเท่านั้น และส่งสำเนาเอกสารดังกล่าวที่ใช้กับผู้เข้าร่วมวิจัยจริงรายแรกมาที่ฝ่ายวิจัย คณะแพทยศาสตร์ เพื่อเก็บไว้เป็นหลักฐาน
3. รายงานเหตุการณ์ไม่พึงประสงค์ร้ายแรงที่เกิดขึ้นหรือการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมวิจัยใดๆ ต่อคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัย ภายใน 5 วันทำการ
4. ส่งรายงานความก้าวหน้าต่อคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัย ตามเวลาที่กำหนดหรือเมื่อได้รับการร้องขอ
5. หากการวิจัยไม่สามารถดำเนินการเสร็จสิ้นภายในกำหนด ผู้วิจัยต้องยื่นขออนุมัติใหม่ก่อนอย่างน้อย 1 เดือน
6. หากการวิจัยเสร็จสมบูรณ์ผู้วิจัยต้องแจ้งปิดโครงการตามแบบฟอร์มของคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

\* รายชื่อของคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน (ชื่อและตำแหน่ง) ที่อยู่ในที่ประชุมวันที่รับรองโครงการวิจัยได้แนบมาด้วย เอกสารที่รับรองทั้งหมดจะถูกส่งไปยังผู้วิจัยหลัก

## Appendix E

Data entry sheet/ Case record form

Title: CLINICAL EFFICACY OF WOUND DRESSING CONTAINING SILK SERICIN FOR SPLIT-THICKNESS SKIN GRAFT DONOR SITE TREATMENT

Data		
Demographic data		
1. Sex	<input type="checkbox"/> Male	<input type="checkbox"/> Female
2. Age	<input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> year	
3. Body weight	<input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> kg	
4. Height	<input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> cm	
5. BMI	<input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> kg/m <sup>2</sup>	
6. Marital Status	<input type="checkbox"/> Single	<input type="checkbox"/> Married
	<input type="checkbox"/> Other.....	
7. Occupation	.....	
8. Payment	<input type="checkbox"/> Universal Care Service	<input type="checkbox"/> Social Security
	<input type="checkbox"/> Government Welfare	<input type="checkbox"/> Private Insurance
	<input type="checkbox"/> Cash	<input type="checkbox"/> Other.....
9. Underlying diseases		
Disease	Onset	Treatment
Any known drug allergy.....		
10. Social history		
10.1) Smoking.....		
10.2) Drinking.....		

10.3) IVDU/other drug abuse.....

STSG use and treatment-related data

11. Serial number of admission .....

12. History of previous treatment .....

.....

13. Current Diagnosis .....

.....

14. Operation .....

.....

15. Position of STSG donor site.....

16. Area of STSG donor site ..... cm<sup>2</sup>

17. Depth of STSG donor site ..... inch

18. Date of admission

□	□	/	□	□	/	□	□
---	---	---	---	---	---	---	---

19. Date of STSG harvest

□	□	/	□	□	/	□	□
---	---	---	---	---	---	---	---

20. Date of discharge

□	□	/	□	□	/	□	□
---	---	---	---	---	---	---	---

21. Length of hospital stay

□	□	□	days
---	---	---	------

22. Medication use during admission

Medications	Order / Exp. date	Detail

23. Home medications

.....  
 .....  
 .....





## Blood chemistry data and pro-inflammatory cytokine levels

Lab data	Normal range	Blood sample taking date		
		Pre-op .../.../...	Day(1-3) .../.../...	Day (7-14) .../.../...
BUN				
Creatinine				
Albumin				
AST (SGOT)				
ALT (SGPT)				
Alkaline phosphate				
Sodium				
Potassium				
Chloride				
CO <sub>2</sub>				
Hemoglobin				
Hematocrit				
Platelets counts				
White cell counts				
Pro-inflammatory cytokines				
IL-6				
TNF- $\alpha$				



## Naranjo's algorithm

Question	Yes	No	Don't Know
1.Are there previous conclusive reports on this reaction?	+1	0	0
2.Did the adverse event appear the suspected drug was administered?	+2	-1	0
3.Did the adverse reaction improve when the drug was discontinued or a specific antagonist was administered?	+1	0	0
4.Did the adverse reaction reappear when the drug was readministered?	+2	-1	0
5.Are there alternative causes (other than the drug) that could on their own have caused the reaction?	-1	+2	0
6.Did the reaction reappear when a placebo was given?	-1	+1	0
7.Was the drug detected in the blood (or other fluids) in concentrations known to be toxic?	+1	0	0
8.Was the reaction more severe when the dose was increased, or less severe when the dose was decreased?	+1	0	0
9.Did the patient have a similar reaction to the same or similar drugs in any previous exposure?	+1	0	0
10.Was the adverse event confirmed by any objective evidence?	+1	0	0
Total Score			

The total score calculated from this table defines the category an adverse reaction belongs to. The categories are defined as follows:

- Definite (certain)      (total score >8)
- Probable                (total score 5-8)
- Possible                 (total score 1-4)
- Doubtful (unlikely)    (total score <1)

## Donor site characteristics during study procedure

No. of donor site	On operative day	On operative day with dressings	Wound appearances after healed
1			
2			
3			
4*			
5			
6			Loss follow up

No. of donor site	On operative day	On operative day with dressings	Wound appearances after healed
7			
8			
9			
10			
11			
12			



No. of donor site	On operative day	On operative day with dressings	Wound appearances after healed
13			
14			
15			
16			
17			
18			

No. of donor site	On operative day	On operative day with dressings	Wound appearances after healed
19			
20			
21			
22			
23			
24*			



No. of donor site	On operative day	On operative day with dressings	Wound appearances after healed
25			
26			
27			
28			
29			
30			



## Original document for patients

## แบบรายงานโครงการวิจัย

**ชื่อ-นามสกุล** นางสาวทิพวรรณ ศิริเชียรทอง **เลขประจำตัว** 527 71040 33  
**ภาควิชา** เกสัชกรรมปฏิบัติ **สาขาวิชา** เกสัชกรรมคลินิก **วิทยานิพนธ์จำนวน** 48 **หน่วยกิต**  
**ชื่อหัวข้องานวิจัย**

ประสิทธิศักร์ทางคลินิกของแผ่นปิดแผลผสมเซริซินจากไหมในการรักษาบาดแผลจากการ  
 ปลุกถ่ายผิวหนังที่มีหนังแท้เหลืออยู่บางส่วน

Clinical efficacy of wound dressing containing silk sericin for split-thickness skin  
 graft donor site treatment

**อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์** รศ. ภาณุ. ดร.พรอนงค์ อร่ามวิทย์ โทร. 0-2218-8403

**อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม** รศ. นพ. อภิชัย อังสพัทธ์ โทร. 0-2256-4120

**วัตถุประสงค์**

เพื่อศึกษาผลการรักษาบาดแผลจากการปลุกถ่ายผิวหนังที่มีหนังแท้เหลืออยู่บางส่วนด้วย  
 แผ่นปิดแผลผสมเซริซินโดยเปรียบเทียบกับการรักษาด้วยผ้ากอซตาข่ายเคลือบพาราฟิน

**แนวเหตุผล ทฤษฎีที่สำคัญ หรือสมมุติฐาน**

(โปรดดูรายละเอียดตามเอกสารประกอบหมายเลข 1 และ 3)

**วิธีดำเนินการวิจัย**

(โปรดดูรายละเอียดตามเอกสารประกอบหมายเลข 2, 3 และ 4)

## เอกสารประกอบหมายเลข 1

### แนวเหตุผลและทฤษฎีที่สำคัญ

การปลูกถ่ายผิวหนังที่มีหนังแท้เหลืออยู่บางส่วน (split-thickness skin graft) คือ การตัดผิวหนังปกติซึ่งประกอบไปด้วยชั้นหนังกำพร้าทั้งหมดร่วมกับชั้นหนังแท้เพียงบางส่วนมาปิดให้กับบาดแผลบริเวณที่ไม่มีผิวหนังปกคลุม (6, 7) เป็นเทคนิคหนึ่งของการทำศัลยกรรมตกแต่งและเสริมสร้าง (plastic and reconstructive surgery) ซึ่งมีความจำเป็นในการรักษาบาดแผลที่มีขนาดใหญ่ หรือบาดแผลที่ไม่สามารถหายเองได้โดยกระบวนการสร้างเซลล์ผิว (epithelialization) ตามธรรมชาติของร่างกาย มีจุดประสงค์เพื่อเร่งการหายของบาดแผลโดยเร็วที่สุดและลดการเกิดภาวะแทรกซ้อนที่อาจเกิดขึ้นกับผู้ป่วยให้น้อยที่สุด (8-10) ในประเทศสหรัฐอเมริกา มีผู้ป่วยแผลไฟไหม้น้ำร้อนลวกประมาณ 24,000 คนในทุก ๆ ปีที่จำเป็นต้องได้รับการรักษาด้วยการปลูกถ่ายผิวหนังเพื่อลดอัตราการตายจากการเสียเลือดและการติดเชื้อบริเวณแผล ยังมีผู้ป่วยที่ทุกข์ทรมานจากแผลกดทับประมาณ 1.5 ล้านคน และผู้ป่วยแผลเรื้อรังจากโรคเบาหวานอันมีสาเหตุการเกิดมาจากความผิดปกติของกระบวนการเมแทบอลิซึมในร่างกายประมาณ 800,000 คนที่ได้รับการรักษาด้วยการปลูกถ่ายผิวหนังที่มีหนังแท้เหลืออยู่บางส่วนในปี ค.ศ. 2008 (11) อย่างไรก็ตาม เมื่อมีการผ่าตัดปลูกถ่ายผิวหนังโดยใช้ผิวหนังจากบริเวณปกติของร่างกาย จะทำให้ผู้ป่วยเกิดบาดแผลใหม่ที่บริเวณ donor site เพิ่มจากแผลเดิมที่ต้องการการรักษา ซึ่งบาดแผลจากการปลูกถ่ายผิวหนังนี้มีความเสี่ยงในการเกิดการติดเชื้อของแผล ก่อความเจ็บปวดและภาวะแทรกซ้อนต่าง ๆ เช่น การหดตัวของแผล ความไม่สมดุลของสารน้ำและเกลือแร่ การติดเชื้อในระบบต่าง ๆ ของร่างกายได้เช่นเดียวกับบาดแผลที่เกิดจากสาเหตุอื่น นอกจากนี้หากผู้ป่วยไม่ได้รับการดูแลอย่างเหมาะสม บาดแผลจากการปลูกถ่ายผิวหนังที่มีหนังแท้เหลืออยู่บางส่วนอาจทวีความรุนแรงเป็นบาดแผลลึกที่ทำให้ผู้ป่วยมีความจำเป็นต้องพักรักษาตัวในโรงพยาบาลนานขึ้น สูญเสียอวัยวะหรือแม้กระทั่งความพิการถาวรได้ ดังนั้นหลังจากที่ผู้ป่วยเข้ารับการผ่าตัดปลูกถ่ายผิวหนังจึงต้องการการดูแลอย่างต่อเนื่อง และมีการประเมินการหายของบาดแผลอย่างเหมาะสม (7, 12)

ใน 24 ชั่วโมงแรกภายหลังการผ่าตัดปลูกถ่ายผิวหนังที่หนาบางส่วน การดูแลรักษาบาดแผลที่เกิดขึ้นใหม่ประกอบด้วยหลายขั้นตอน ขั้นตอนแรกควรห้ามเลือดบริเวณบาดแผลด้วยผ้ากอซชุบ adrenaline ที่เจือจางในน้ำเกลือไอโซนอร์มัล แล้วปิดแผ่นปิดแผลชั้นแรก (primary dressing) ตามด้วยแผ่นปิดแผลชั้นที่สอง (secondary dressing) เพื่อปกป้องบาดแผลจากการติดเชื้อและการเสียดสีจากภายนอก ควรพันผ้ายึดทับไว้ให้มีแรงกดเพื่อห้ามเลือดและสามารถคลายออกได้ภายหลังผ่าตัด 6 ชั่วโมง นอกจากนี้ควรให้แผลอยู่นิ่งตลอดระยะเวลาการรักษาเพื่อ

ป้องกันการกระทบกระเทือนและให้กระบวนการหายของบาดแผลเกิดได้อย่างสมบูรณ์ (7, 38) คอยสังเกตเลือดหรือสารคัดหลั่งหลังจากบาดแผลที่อาจมีปริมาณมากจนซึมออกจากแผ่นปิดแผลชั้นที่สองและเป็นสาเหตุทำให้บาดแผลเปื่อยเน่า (maceration) กรณีที่พบลักษณะดังกล่าว หรือรอบ ๆ บาดแผลบวมแดง มีอาการปวดแผลมาก หรือแผลมีกลิ่นเหม็น ต้องทำความสะอาดบาดแผลและเปลี่ยนแผ่นปิดแผลใหม่ทั้งหมด เนื่องจากอาการดังกล่าวเป็นสัญญาณของการติดเชื้อ ควรเก็บตัวอย่าง (swab) สารน้ำบริเวณบาดแผลส่งตรวจหาชนิดและปริมาณเชื้อแบคทีเรียก่อโรค และเลือกใช้แผ่นปิดแผลชนิดที่มีสารฆ่าเชื้อในการรักษา อาจพิจารณาการให้ยาบรรเทาอาการปวดในผู้ป่วยบางรายตามความเหมาะสม นอกจากนี้หลังจากแผลหายแล้ว อาจต้องมีการทำกายภาพบำบัด เพื่อให้ผู้ป่วยสามารถกลับมาช่วยเหลือตนเอง หรือดำรงชีวิตประจำวันได้ตามปกติ (38, 39)

วัตถุประสงค์ของการปิดแผล คือ เพื่อส่งเสริมการหายของบาดแผล ลดความเจ็บปวด ลดการสูญเสียเลือดหรือสารน้ำออกจากร่างกาย และป้องกันการติดเชื้อบริเวณบาดแผล การเลือกชนิดของแผ่นปิดแผลในการดูแลบาดแผลจากการปลูกถ่ายผิวหนังที่มีหนังแท้เหลืออยู่บางส่วนเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญต่อการหายของบาดแผล ปัจจุบันมีผลิตภัณฑ์รักษาบาดแผลชนิดต่าง ๆ ออกมาจำหน่ายมากมาย สามารถแบ่งชนิดของแผ่นปิดแผลออกเป็น 3 ชนิด คือ แบบเปิด (open dressing), แบบกึ่งเปิด (semi-open dressing) และแบบปิด (close dressing) (40) การเลือกใช้แผ่นปิดแผลที่เหมาะสมจะสามารถรักษาความชุ่มชื้นให้แก่ผิวหนังบริเวณบาดแผล ซึ่งมีส่วนในการส่งเสริมการสร้างเซลล์ผิวใหม่ (re-epithalization) ลดอาการเจ็บปวดบริเวณบาดแผล ลดความถี่ในการทำแผลและลดความทุกข์ทรมานที่เกิดขึ้นกับผู้ป่วย อย่างไรก็ตาม แผ่นปิดแผลที่มีขายตามท้องตลาดในปัจจุบันเป็นเพียงแผ่นปิดแผลที่ไม่มีส่วนประกอบที่มีประสิทธิภาพในการเร่งกระบวนการหายของบาดแผล นอกจากนี้แผ่นปิดแผลรุ่นใหม่ที่มีการพัฒนาการผลิตให้มีองค์ประกอบของสารกระตุ้นการสมานแผลนั้นยังมีราคาแพง เนื่องจากประเทศไทยยังต้องนำเข้าจากต่างประเทศ (13-15) ทำให้ผู้ป่วยส่วนใหญ่ไม่สามารถใช้แผ่นปิดแผลดังกล่าวได้แม้จะมีข้อบ่งชี้ ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีแนวคิดในการพัฒนาผลิตภัณฑ์ปิดแผลที่ผลิตได้เองในประเทศโดยใช้วัตถุดิบในท้องถิ่น

เซริซินเป็นโปรตีนธรรมชาติชนิดหนึ่งที่ได้จากรังของหนอนไหม *Bombyx mori* ซึ่งปกติจะถูกแยกออกและทิ้งไปกับน้ำที่ใช้ในกระบวนการต้มและสาวเส้นไหมเพื่อการทอผ้าไหมไทย (16, 17) แต่จากการศึกษาที่ผ่านมาพบคุณสมบัติต่าง ๆ ของเซริซินที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ มีการวิจัยพบว่า เซริซินประกอบด้วยโปรตีนที่มีลักษณะคล้ายเคอราติน (keratin) ที่มีใน

ผิวหนังมนุษย์ สามารถเกิดเป็นฟิล์มบาง ๆ เคลือบปกป้องผิวจากแสงแดดและมลภาวะ เก็บกักรักษาความชุ่มชื้นของผิวได้ดี โดยไม่ก่อให้เกิดอาการไม่พึงประสงค์ (18) เซริซินยังมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระและกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์ผิวหนังในระดับห้องทดลอง (19, 20) นอกจากนี้การศึกษาของ Aramwit และคณะยังพบว่าครีมทาบาดแผลที่ประกอบด้วยเซริซินความเข้มข้นร้อยละ 8 สามารถกระตุ้นการเจริญของเซลล์ผิวหนัง เพิ่มการสร้างคอลลาเจนในผิวหนังของหนูทดลองโดยไม่ก่อการอักเสบระคายเคือง เมื่อเปรียบเทียบกับครีมพื้นหรือยาทาแผลโพวิโดน ไอโอดีน (21) บาดแผลที่ได้รับการรักษาด้วยครีมผสมเซริซินมีระดับของสารก่อการอักเสบ (proinflammatory cytokine) ได้แก่ interleukin (IL) -1 $\beta$  และ tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  ต่ำกว่าบาดแผลกลุ่มควบคุมที่ดูแลด้วยครีมพื้นหรือน้ำเกลือธรรมดา แสดงให้เห็นว่าครีมทาบาดแผลที่มีเซริซินไม่เป็นพิษต่อเซลล์และไม่กระตุ้นให้เกิดการอักเสบ (22) ล่าสุดการศึกษาของ Palapinyo ในปี 2011 ศึกษาประสิทธิภาพและความปลอดภัยของยาทาเฉพาะที่ซิลเวอร์ซิงค์ซัลฟา ไดอะซีนผสมเซริซินจากไหมเปรียบเทียบกับยาทาเฉพาะที่ซิลเวอร์ซิงค์ซัลฟาไดอะซีนที่ใช้ในโรงพยาบาลในผู้ป่วยจำนวน 16 คนซึ่งมีบาดแผลใหม่ทั้งสิ้นจำนวน 34 บาดแผล พบว่าเซริซินสามารถเร่งอัตราการหายของบาดแผลในผู้ป่วยแผลไฟไหม้ที่มีความลึกหนาบางส่วนได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยไม่พบรายงานไม่พึงประสงค์จากการใช้ยาทาเฉพาะที่ซิลเวอร์ซิงค์ซัลฟาไดอะซีนผสมเซริซิน (41) อย่างไรก็ตามรูปแบบยาเตรียมแบบครีม ขาดคุณสมบัติในการปกป้องบาดแผลจากการกระทบกระเทือนจากภายนอก และจำเป็นต้องได้รับการดูแลบาดแผลทุกวันอย่างน้อยวันละครั้งโดยบุคลากรทางการแพทย์ ซึ่งก่อความไม่สะดวกแก่ผู้ป่วยและผู้ทำการรักษา อีกทั้งไม่เหมาะสมสำหรับการดูแลบาดแผลจากการปลูกถ่ายผิวหนังที่มีหนังแท้เหลืออยู่บางส่วน เนื่องจากหลักสำคัญของการรักษา คือการรบกวนกระบวนการฟื้นฟูบาดแผลตามธรรมชาติของร่างกายให้น้อยที่สุดโดยปล่อยให้แผ่นปิดแผลชั้นแรกคงอยู่กับบาดแผลจนกว่าแผลจะหายสนิทและทำให้แผ่นปิดแผลหลุดลอกออกมาเอง (7)

จากคุณสมบัติอันเป็นประโยชน์ต่อการกระตุ้นการสมานแผลของเซริซินและข้อดีของรูปแบบยาเตรียมแบบครีม ทำให้เกิดการพัฒนาระบบปิดแผลที่มีส่วนประกอบของเซริซินจากไหมซึ่งง่ายต่อการดูแลบาดแผลผู้ป่วย โดยผสมเซริซินเข้ากับโพลีเมอร์เพื่อขึ้นรูปเป็นแผ่น จากนั้นนำแผ่นปิดแผลที่ได้ผ่านกระบวนการเชื่อมข้ามทางกายภาพ และผ่านกระบวนการทำให้ปราศจากเชื้อโดยรังสีแกมมา ก่อนนำไปใช้ (42) การศึกษาเบื้องต้นด้านผลการรักษาและความปลอดภัยของแผ่นปิดแผลผสมเซริซินต่อบาดแผลบนผิวหนังของหนูทดลอง พบว่าบาดแผลที่รักษาด้วยแผ่นปิดแผลผสมเซริซินมีขนาดลดลงมากกว่าและเร็วกว่าบาดแผลที่รักษาด้วยแผ่นปิดแผลที่จำหน่ายใน

ห้องตลาดซึ่งเป็นกลุ่มควบคุม โดยไม่ก่อการอักเสบทางผิวหนังเมื่อตรวจในระดับเนื้อเยื่อวิทยา จากคุณลักษณะอันเป็นประโยชน์หลายประการของเซริซิน ร่วมกับคุณสมบัติของแผ่นปิดแผลที่พัฒนาขึ้น จึงนำมาสู่จุดประสงค์ของการศึกษาวิจัยนี้ที่ต้องการศึกษาประสิทธิภาพทางคลินิกของแผ่นปิดแผลผสมเซริซินจากไหมต่อการรักษาบาดแผลจากการปลูกถ่ายผิวหนังที่มีหนังแท้เหลืออยู่บางส่วน โดยเปรียบเทียบกับแผ่นปิดแผลชนิดผ้ากอซตาข่ายเคลือบพาราฟินซึ่งเป็นแผ่นปิดแผลมาตรฐานที่ใช้รักษาบาดแผลที่เกิดจากการปลูกถ่ายผิวหนัง

## ทฤษฎีที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย

### การปลูกถ่ายผิวหนัง

การปลูกถ่ายผิวหนัง คือ การตัดผิวหนังปกติจากบริเวณหนึ่งที่เรียกว่า donor site ไปติดให้กับอีกบริเวณหนึ่งที่ต้องการการรักษาหรือที่เรียกว่า recipient site ผิวหนังที่ทำการปลูกถ่ายมีลักษณะแตกต่างกันตามแหล่งที่มาของผิวหนัง ตามขนาดและความหนาของผิวหนัง หรือตามตำแหน่งของผิวหนังที่เลือกเป็น donor site หากแบ่งประเภทการปลูกถ่ายผิวหนังตามแหล่งที่มาของผิวหนังสามารถแบ่งได้เป็น 3 ชนิด (6, 7) ได้แก่ autografts คือ ผิวหนังที่ปลูกถ่ายและบริเวณที่รับการปลูกถ่ายอยู่ในคน ๆ เดียวกัน ซึ่งการปลูกถ่ายผิวหนังชนิดนี้จะมีอัตราการรับการปลูกถ่ายสูงที่สุด แต่กรณีผู้ป่วยมีผิวหนังปกติจำกัด หรือมีอาการของโรคภูมิคุ้มกันบกพร่อง ไม่สามารถทนรับกับบาดแผลใหม่ที่จะเกิดขึ้นภายหลังการผ่าตัดได้ แพทย์จะพิจารณาใช้ allografts หรือ xenografts ซึ่ง allografts คือ ผิวหนังมีแหล่งที่มาจากผิวหนังของผู้อื่น ในขณะที่ xenografts คือ ผิวหนังที่ปลูกถ่ายมาจากสัตว์ที่มีโครงสร้างของผิวหนังคล้ายมนุษย์ซึ่งนิยมใช้ผิวหนังจากสุกร อย่างไรก็ตาม การปลูกถ่ายผิวหนังทั้ง 2 ชนิด สามารถก่อการแพ้และมีโอกาสปฏิเสธการปลูกถ่ายผิวหนังได้มากกว่า autografts

การปลูกถ่ายผิวหนังสามารถแบ่งตามความหนาของผิวหนังที่ใช้ ได้เป็น 2 ชนิดใหญ่ ๆ คือ ผิวหนังที่มีความลึกหนาบางส่วน (split thickness skin) หรือ ผิวหนังที่มีความลึกหนาทั้งหมด (full thickness skin) ผิวหนังที่มีความลึกหนาบางส่วนจะประกอบไปด้วยผิวหนังชั้นหนังกำพร้าทั้งหมดรวมกับชั้นหนังแท้เพียงบางส่วน ซึ่งแบ่งย่อยได้อีก 3 ชนิด คือ ชนิดบาง (0.15 - 0.3 มิลลิเมตร) ชนิดหนาปานกลาง (0.3 - 0.45 มิลลิเมตร) และชนิดหนา (0.45 - 0.6 มิลลิเมตร) ในขณะที่ผิวหนังที่หนาทั้งหมดจะมีความหนามากกว่า 0.6 มิลลิเมตรขึ้นไป (6)

ปัจจัยการคัดเลือกตำแหน่งของผิวหนังที่ใช้เป็น donor site (7) ได้แก่ ขนาดหรือความลึกของบาดแผลบริเวณที่ต้องการการรักษาด้วยการปลูกถ่ายผิวหนัง และคุณลักษณะของผิวหนังที่ต้องการใช้ การปลูกถ่ายผิวหนังที่มีหนังแท้เหลืออยู่บางส่วนสามารถเลือกใช้ผิวหนังได้หลาย

ตำแหน่ง ได้แก่ หน้าท้อง แผ่นหลัง หลังศีรษะ ต้นแขน ต้นขา น่อง และสะโพก เนื่องจากบาดแผลที่เกิดขึ้นใหม่หลังการผ่าตัดจะมีการฟื้นฟูตนเองโดยกระบวนการสร้างเซลล์ผิวใหม่ภายใน 14 วัน หากได้รับการดูแลบาดแผลที่เกิดขึ้นอย่างเหมาะสม นอกจากนี้ยังสามารถใช้ผิวหนังตำแหน่งเดิมมาเป็นบริเวณให้ซ้ำได้อีกเมื่อระยะเวลาผ่านไป 2 เดือนหลังการรักษา (43, 44) การปลูกถ่ายผิวหนังที่มีหนังแท้เหลืออยู่บางส่วนมีความจำเป็นในการรักษาบาดแผลขนาดใหญ่ที่อาจส่งผลถึงชีวิตของผู้ป่วย เช่น บาดแผลไฟไหม้ น้ำร้อนลวก บาดแผลจากอุบัติเหตุ หรือบาดแผลที่เกิดจากการผ่าตัดใหญ่ ฯลฯ แต่ข้อเสียของการปลูกถ่ายผิวหนังชนิดนี้ คือ สร้างความเจ็บปวดรุนแรงและทำให้ผู้ป่วยเสียเลือดมากเนื่องจากเส้นเลือดและเส้นประสาทบริเวณผิวหนังชั้นหนังแท้เปิดออกสัมผัสกับสิ่งแวดล้อม มีโอกาสเกิดการหดรั้งของผิวหนังที่ปลูกถ่ายสูง เกิดแผลเป็นได้ง่าย หรือเกิดการเปลี่ยนแปลงของสีผิวหลังปลูกถ่าย ไม่ว่าจะมีส่วนสัมผัสหรือจางลงกว่าผิวหนังปกติก่อนปลูกถ่ายได้มากกว่าการปลูกถ่ายผิวหนังชนิดที่มีความลึกหนาทั้งหมด ดังนั้น หากเป็นบาดแผลที่เกิดจากการผ่าตัดเสริมสวยที่มีบาดแผลขนาดเล็ก หรือเป็นบาดแผลที่อยู่ในตำแหน่งที่มองเห็นได้ มีผลต่อภาพลักษณ์ภายนอกของผู้ป่วย แพทย์มักเลือกใช้การรักษาบาดแผลนั้นด้วยการปลูกถ่ายผิวหนังที่มีความลึกหนาทั้งหมดแทน (6, 7, 45)

การพิจารณาลักษณะของบาดแผลที่เกิดขึ้นร่วมกับสภาวะพื้นฐานของผู้ป่วย เป็นปัจจัยสำคัญยิ่งในการเลือกประเภทของการปลูกถ่ายผิวหนัง ผู้ทำการรักษาต้องคำนึงว่า ประโยชน์ที่ผู้ป่วยจะได้รับจากการรักษาบาดแผลบริเวณรับด้วยการปลูกถ่ายผิวหนัง ต้องมีมากกว่าความเสี่ยงที่อาจเกิดขึ้นจากการเกิดบาดแผลใหม่ของร่างกาย นอกจากนี้ผู้ป่วยควรรับทราบเกี่ยวกับความจำเป็นของการรักษาบาดแผลด้วยการปลูกถ่ายผิวหนังและผลที่อาจเกิดตามมาหลังการรักษา เพื่อให้ผู้ป่วยมีความร่วมมือในการดูแลรักษาบาดแผลหลังการผ่าตัด และได้รับผลการรักษาออกมาดีที่สุด

### **แผ่นปิดแผลที่ใช้รักษาบาดแผลจากการปลูกถ่ายผิวหนังที่มีหนังแท้เหลืออยู่บางส่วน**

การเลือกชนิดของแผ่นปิดแผลในการรักษาควรคำนึงถึงลักษณะของบาดแผลที่ผู้ป่วยได้รับ ดังเช่น บาดแผลที่มีความลึกหนาบางส่วนจะทำให้ผู้ป่วยเสียเลือดและสารคัดหลั่งในปริมาณมากกว่า รวมถึงก่อให้เกิดอาการเจ็บปวดแก่ผู้ป่วยได้มากกว่าบาดแผลที่มีความลึกหนาทั้งหมด เนื่องจากบาดแผลบริเวณให้ที่มีความลึกหนาบางส่วนจะใช้ผิวหนังบริเวณกว้าง มีพื้นที่ให้ปลายประสาทรับความรู้สึกเจ็บปวดที่ผิวหนังสัมผัสกับสิ่งแวดล้อมภายนอกได้มาก ในขณะที่บาดแผลที่มีความลึกหนาทั้งหมดจะมีขนาดเล็ก จึงสามารถเย็บปิดบาดแผลได้ในทันทีหลังการผ่าตัด นอกจากนี้ควรพิจารณาการยอมรับของผู้ป่วยและความสามารถในการจัดการกับค่าใช้จ่ายที่

เกิดขึ้นหลังการรักษาอีกด้วย แผ่นปิดแผลในอุดมคติที่ใช้รักษาบาดแผลจากการปลุกถ่ายผิวหนังที่มีหนังแท้เหลืออยู่บางส่วน ควรมีคุณสมบัติดังต่อไปนี้ คือ สามารถกระตุ้นการหายของบาดแผลและเก็บกักรักษาความชุ่มชื้นบริเวณพื้นที่ว่างที่เป็นรอยต่อระหว่างบาดแผลกับแผ่นปิดแผลได้ดี เป็นดังฉนวนที่สามารถรักษาสมดุลของอุณหภูมิบริเวณบาดแผลไม่ให้ร้อนหรือเย็นเกินไป สามารถระบายสารคัดหลั่งต่าง ๆ และให้อากาศผ่านเข้าออกได้ ในขณะที่ปกป้องบาดแผลจากการติดเชื้อจุลินทรีย์หรือการสัมผัสกับสารพิษจากสิ่งแวดล้อมภายนอก สามารถเปลี่ยนแผ่นปิดแผลและทำความสะอาดแผลได้ง่ายโดยไม่รบกวนกระบวนการสร้างเซลล์ผิวใหม่ที่กำลังเกิดขึ้นบริเวณแผล รวมถึงได้รับประโยชน์จากการรักษาอย่างคุ้มค่าเมื่อเทียบกับค่าใช้จ่ายที่เสียไป (8) ปัจจุบันยังไม่มีแผ่นปิดแผลที่มีคุณสมบัติครบทุกข้อดังที่กล่าวมาข้างต้น จึงยังมีความจำเป็นที่ต้องมีการศึกษาวิจัย พัฒนาแผ่นปิดแผลชนิดใหม่ ๆ อย่างต่อเนื่อง

การดูแลบาดแผลจากการปลุกถ่ายผิวหนังที่มีหนังแท้เหลืออยู่บางส่วนด้วยแผ่นปิดแผลสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ลักษณะ คือ แบบเปิด แบบกึ่งเปิด และแบบปิด (40) โดยการดูแลแผลแบบเปิด คือ การปล่อยให้บาดแผลหลังปลุกถ่ายสัมผัสกับสิ่งแวดล้อมโดยตรง ไม่มีการปิดหรือปกคลุมแผลด้วยวัสดุต่าง ๆ ซึ่งวิธีนี้เป็นวิธีที่ประหยัดค่าใช้จ่ายที่สุดแต่บาดแผลมีโอกาสเสี่ยงต่อการติดเชื้อมากที่สุด จึงไม่นิยมรักษาด้วยวิธีนี้แล้ว ในปัจจุบันเหลือเพียง 2 วิธี คือ แผ่นปิดแผลแบบกึ่งเปิดและแบบปิด (27, 28) ตัวอย่างของแผ่นปิดแผลแบบกึ่งเปิด ได้แก่ ผ้ากอซตาข่าย (mesh gauze) และผ้าบางรูละเอียดที่ทำด้วยใยสังเคราะห์ (tulle gras) เช่น Jelonet<sup>®</sup>, Bactigras<sup>®</sup>, Sofra-tulle<sup>®</sup>, Xeroform<sup>®</sup> และ Scarlet red<sup>®</sup> ฯลฯ ตัวอย่างของแผ่นปิดแผลแบบปิด ได้แก่ แผ่นฟิล์มหรือเมมเบรน (Tegaderm<sup>®</sup>, Opsite<sup>®</sup>) แผ่นปิดแผลไฮโดรคอลลอยด์ (DuoDERM<sup>®</sup>, Urgotul<sup>®</sup>) แผ่นปิดแผลอัลจีเนต (Algisite<sup>®</sup>, Sorbsan<sup>®</sup>, Curasorb<sup>®</sup>, Urgosorb<sup>®</sup>) แผ่นปิดแผลไฮโดรไฟเบอร์ (Aquacel<sup>®</sup>) แผ่นโฟมพอลิยูรีเทน (Allevyn<sup>®</sup>, Askina<sup>®</sup>) แผ่นปิดแผลที่มีโลหะเงินเป็นสารฆ่าเชื้อ (Acticoat<sup>®</sup>) และแผ่นแปะซิลิโคน (Mepitel<sup>®</sup>, Mepilex<sup>®</sup>) ฯลฯ

แผ่นปิดแผลแต่ละชนิดมีข้อดีและข้อเสียแตกต่างกันไป รวมถึงเทคนิคการดูแลบาดแผลโดยใช้แผ่นปิดแผลแบบกึ่งเปิดและแบบปิดมีหลักการแตกต่างกันซึ่งสามารถสรุปได้ดังนี้ การใช้แผ่นปิดแผลชั้นแรกแบบกึ่งเปิดซึ่งจะมีลักษณะเป็นรูตาข่ายที่สามารถให้ออกซิเจนเข้าออก และระบายเลือดและสารคัดหลั่งจากบาดแผลออกสู่แผ่นปิดแผลชั้นที่สองซึ่งเป็นผ้ากอซปราศจากเชื้อหลายทบ ทำหน้าที่ดูดซับสารคัดหลั่งต่าง ๆ ดังกล่าว หากสารคัดหลั่งจากบาดแผลมีปริมาณมากเกินไปก็จะทำการเปลี่ยนเฉพาะแผ่นปิดแผลชั้นที่สอง เพื่อป้องกันผิวหนังรอบ ๆ บาดแผลเปื่อยยุ่ยเสี่ยงต่อการติดเชื้อ โดยจะยังคงแผ่นปิดแผลชั้นแรกไว้เช่นเดิมจนกว่าบาดแผลจะหายและแผ่นปิด

แผลชั้นแรกจะหลุดลอกออกมาเอง ยกเว้นกรณีที่มีสัญญาณของการติดเชื้อของบาดแผลเท่านั้น จึงจะเปลี่ยนแผ่นปิดแผลชั้นแรกใหม่ เพื่อไม่เป็นการรบกวนกระบวนการหายตามธรรมชาติของบาดแผล ในขณะที่แผ่นปิดแผลแบบปิดจะมีคุณสมบัติในการรักษาความชุ่มชื้นบริเวณบาดแผลได้ดี ลดความเจ็บปวดที่เกิดกับผู้ป่วยและป้องกันการกระทบกระแทกหรือการปนเปื้อนจากภายนอกสู่บาดแผลได้อย่างมีประสิทธิภาพ แผ่นปิดแผลชนิดโฟมพอลิยูรีเทน แผ่นปิดแผลอัลจิเนต แผ่นปิดแผลไฮโดรไฟเบอร์ ยังมีความสามารถในการดูดซับเลือดและสารคัดหลั่งไว้ในแผ่นได้สูง ทำให้ไม่จำเป็นต้องดูแลหรือทำความสะอาดแผลบ่อยครั้ง อย่างไรก็ตาม ราคาของแผ่นปิดแผลแบบปิดมักสูงกว่าแผ่นปิดแผลชนิดกึ่งเปิดอยู่มาก ทำให้ผู้ป่วยหลายรายไม่สามารถใช้แผ่นปิดแผลดังกล่าวได้ แม้จะมีข้อบ่งชี้ (28, 46)

ผ้ากอซตาข่ายเคลือบพาราฟินผสมสารต้านเชื้อแบคทีเรีย 0.5% chlorhexidine acetate (Bactigras®) เป็นแผ่นปิดแผลแบบกึ่งเปิดชนิดหนึ่งที่ถูกนิยมนำมาใช้เป็นแผ่นปิดแผลชั้นแรกในการรักษาบาดแผลจากการปลูกถ่ายผิวหนังที่มีหนังแท้เหลืออยู่บางส่วน (47) ดังนั้นการดูแลบาดแผลโดยใช้ผ้ากอซตาข่ายเคลือบพาราฟินจึงมีหลักการเช่นเดียวกับเทคนิคการดูแลบาดแผลแบบกึ่งเปิดข้างต้น ข้อเสียที่พบได้อย่างชัดเจนของผ้ากอซตาข่ายเคลือบพาราฟิน คือ การยึดติดกับแผลซึ่งจะเป็นการรบกวนกระบวนการสมานแผลตามธรรมชาติของร่างกายเนื่องจากเยื่อผิวหนังจะถูกทำลายในขณะที่เปลี่ยนแผ่นปิดแผล อาจทำให้บาดแผลลึกรุนแรงกว่าเดิมและก่อความเจ็บปวดแก่ผู้ป่วย (48) อย่างไรก็ตาม แม้จะมีข้อเสียดังกล่าว บาดแผลที่รักษาด้วยผ้ากอซเคลือบพาราฟินยังพบอัตราการติดเชื้อต่ำ มีผลการรักษาที่น่าพอใจเมื่อปฏิบัติตามหลักการดูแลบาดแผลดังกล่าว รวมถึงคุ้มทุนกับค่าใช้จ่ายในการรักษาบาดแผลจากการปลูกถ่ายผิวหนังที่มีหนังแท้เหลืออยู่บางส่วนเมื่อเทียบกับแผ่นปิดแผลชนิดอื่น ๆ (46) ดังนั้นผ้ากอซตาข่ายเคลือบพาราฟินนี้จึงยังจัดว่าเป็นแผ่นปิดแผลมาตรฐานสำหรับรักษาบาดแผลจากการปลูกถ่ายผิวหนังที่มีหนังแท้เหลืออยู่บางส่วนอยู่ในปัจจุบัน นอกจากนี้การพัฒนาแผ่นปิดแผลชนิดใหม่ ๆ จึงจะทำการศึกษาโดยการเปรียบเทียบผลการรักษาและอาการข้างเคียงกับผ้ากอซตาข่ายเคลือบพาราฟิน (48-50)

### คุณสมบัติของเซริซินจากไหม

เซริซินเป็นโปรตีนธรรมชาติชนิดหนึ่งที่ได้จากรังไหมของหนอนไหม *Bombyx mori* รังไหมประกอบด้วยโปรตีนธรรมชาติ 2 ส่วน คือ เซริซินร้อยละ 25 - 30 และเส้นใยไฟโบรอิน (fibroin) ร้อยละ 70- 75 โดยเซริซินจะทำหน้าที่เป็นกาวยึดเส้นใยไฟโบรอินให้คงสภาพเป็นรังไหมไว้ได้ จึงอาจเรียกเซริซินในอีกชื่อหนึ่งว่า โปรตีนกาวไหม (17, 34) เซริซินเป็นโปรตีนที่มี ละลายน้ำได้ดี มีน้ำหนักโมเลกุลระหว่าง 10-400 กิโลดาลตัน ประกอบด้วยกรดอะมิโนถึง 18 ชนิดซึ่งส่วนใหญ่เป็น



สารกลุ่มที่มีซิว เช่น หมูไฮดรอกซี หมูคาร์บอกซิลิก หมูอะมิโน กรดอะมิโนชนิดที่พบมาก ได้แก่ เซอรีน (serine) และ กรดแอสปาร์ติก (aspartic acid) เป็นหลักซึ่งมีปริมาณร้อยละ 33.4 และ 16.7 ตามลำดับ (29, 30) โดยกระบวนการสกัดมีผลต่อขนาดโมเลกุลและปริมาณกรดอะมิโนแต่ละชนิดของสารสกัดเซอรีนที่ได้ดังผลการทดลองของ Aramwit และคณะ (51) เกี่ยวกับวิธีการสกัดเซอรีน ออกจากรังไหม 4 วิธี ได้แก่ การสกัดด้วยน้ำร้อนภายใต้ความดัน การใช้สารละลายกรด สารละลายด่าง หรือสารละลายยูเรีย พบว่าเซอรีนที่สกัดด้วยน้ำร้อนภายใต้ความดันมีขนาดโมเลกุลปานกลาง มีปริมาณกรดอะมิโนชนิดเมไทโอนีนมากกว่าวิธีการสกัดอื่น ๆ โดยผลการทดลองยังแสดงให้เห็นว่าเซอรีนที่สกัดด้วยวิธีดังกล่าวมีการยืดเกาะและการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากหนู (mouse fibroblast cell) ได้ดีและสามารถกระตุ้นการสร้างคอลลาเจนจากเซลล์ดังกล่าวได้มากกว่าวิธีอื่น โดยคอลลาเจนนั้นเป็นองค์ประกอบของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันได้ผิวหนังของมนุษย์ ซึ่งมีส่วนสำคัญในกระบวนการหายของบาดแผลและทำให้ผิวหนังที่เกิดขึ้นใหม่มีความแข็งแรง นอกจากนี้ยังมีผลการวิจัยทั้งในระดับเซลล์เพาะเลี้ยง ในสัตว์ทดลองและในผู้ป่วยที่แสดงถึงประโยชน์ของเซอรีนเกี่ยวกับกระบวนการหายของบาดแผลอย่างต่อเนื่อง

ในปี ค.ศ. 2005 Tsubouchi และคณะได้ศึกษาผลของสารสกัดเซอรีนในความเข้มข้น 0.25, 2.5 และ 25 ไมโครกรัมต่อตารางเซนติเมตรต่อการยืดเกาะและการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากผิวหนังมนุษย์ (human skin fibroblast cell) พบว่าความเข้มข้นของเซอรีน 2.5 และ 25 ไมโครกรัมต่อตารางเซนติเมตรสามารถเพิ่มจำนวนเซลล์ได้มากถึงร้อยละ 250 ภายในเวลา 72 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่มีเซอรีน นอกจากนี้สารสกัดเซอรีนในทุกความเข้มข้นสามารถเพิ่มการสร้างคอลลาเจนได้ ร้อยละ 250 – 300 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (52) ซึ่งผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับการศึกษาของ Terada และคณะในปีเดียวกัน ที่ทำการผสมเซอรีนในความเข้มข้น 0.1% ในอาหารเลี้ยงเซลล์ พบว่าสามารถกระตุ้นการเกิดกระบวนการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากผิวหนังมนุษย์ได้มากกว่า Bovine Serum Albumin (BSA) ซึ่งใช้เป็นกลุ่มควบคุม (19)

ต่อมาในปีค.ศ. 2005 และ 2008 Teramoto และคณะ (37, 53) ศึกษาทดลองอย่างต่อเนื่องถึงการเตรียมแผ่นเจลฟิล์มปิดบาดแผลจากเซอรีนโดยผสมกับเฮซานอลเพื่อให้เกิดการก่อเจล พบว่าแผ่นปิดแผลที่เตรียมขึ้นมีความสามารถในการดูดซับน้ำได้อย่างรวดเร็ว มีความยืดหยุ่นสูงโดยเฉพาะเมื่อแผ่นเปียกซึ่งสามารถยืดขยายออกได้มากถึง 4 เท่าจากขนาดแผ่นเริ่มต้น นอกจากนี้ยังทดสอบการยืดเกาะและการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ พบว่าแผ่นเจลฟิล์มที่ได้ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์

ในปี ค.ศ. 2007 Aramwit และคณะศึกษาผลของครีมทาบาดแผลที่มีเซริซินความเข้มข้นร้อยละ 8 ในการรักษาบาดแผลลึกระดับ 3 บนผิวหนังบริเวณหลังของหนูทดลอง โดยแบ่งหนูทดลองออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 เปรียบเทียบระหว่างครีมทาบาดแผลที่มีเซริซินความเข้มข้นร้อยละ 8 กับยาทาแผลโพวิโดนไอโอดีน (Betadine®) กลุ่มที่ 2 เปรียบเทียบครีมทาบาดแผลที่มีเซริซินความเข้มข้นร้อยละ 8 กับครีมพื้น โดยหนูทั้งสองกลุ่มจะได้รับการทำความสะอาดบาดแผลทุกวันด้วยน้ำเกลืออนอร์มัลแล้วจึงทาสารทดสอบที่กำหนดจนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง ผลการศึกษาพบว่าครีมที่มีเซริซินสามารถกระตุ้นให้เซลล์ผิวหนังเจริญได้ดีกว่าโดยมีขนาดของบาดแผลลดลงเร็วกว่าบาดแผลที่รักษาด้วยครีมพื้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ ) ในขณะที่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับบาดแผลที่รักษาด้วยยาทาแผลโพวิโดนไอโอดีน โดยระยะเวลาเฉลี่ยที่ใช้จนกระทั่งแผลหายสนิทของบาดแผลที่รักษาด้วยครีมที่มีเซริซิน ยาทาแผลโพวิโดนไอโอดีน และยาพื้นเท่ากับ 11, 12 และ 15 วันตามลำดับ เมื่อศึกษาถึงระดับเนื้อเยื่อวิทยาพบว่าบาดแผลที่รักษาด้วยครีมที่มีเซริซินความเข้มข้นร้อยละ 8 มีปริมาณคอลลาเจนในชั้นผิวหนังมากขึ้น ส่งเสริมกระบวนการสร้างเซลล์ผิวหนังและไม่พบการแพ้ตลอดการศึกษา ซึ่งแตกต่างจากชิ้นตัวอย่างที่ได้จากบาดแผลที่รักษาด้วยยาทาแผลโพวิโดนไอโอดีนและครีมพื้นอย่างเห็นได้ชัด (21) นอกจากนี้ ในปี ค.ศ. 2009 คณะวิจัยกลุ่มดังกล่าวยังศึกษาผลของสารละลายเซริซินและครีมที่มีเซริซิน ความเข้มข้นร้อยละ 8 ต่อการการสร้างสารก่อการอักเสบทั้งในเซลล์และสัตว์ทดลอง ได้แก่ IL-1 $\beta$  และ TNF- $\alpha$  ซึ่งเป็นสารก่อการอักเสบที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของเม็ดเลือดขาว macrophage และ monocyte ผลการศึกษาพบว่าสารละลายเซริซินความเข้มข้น 0.2-1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ และในวันที่ 7 ของการทดลอง ระดับ IL-1 $\beta$  และ TNF- $\alpha$  วิเคราะห์จากตัวอย่างเนื้อเยื่อของบาดแผลที่รักษาด้วยครีมที่มีเซริซินอยู่ในระดับที่ไม่เป็นพิษ และต่ำกว่ากลุ่มควบคุมซึ่งรักษาด้วยครีมพื้นหรือน้ำเกลืออนอร์มัล (22) ซึ่งผลการศึกษาดังกล่าวสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Panilaitis และคณะในปี 2003 ที่พบว่าสารละลายเซริซินที่สกัดจากไหมไม่มีผลกระตุ้นการสร้างสารก่อการอักเสบจาก macrophage (54) แสดงให้เห็นว่าเซริซินมีคุณสมบัติในการกระตุ้นกระบวนการสมานแผลโดยไม่ก่อให้เกิดการแพ้

ในปี ค.ศ. 2010 ของ Namviriyachote และคณะรายงานกรณีศึกษาเกี่ยวกับการใช้ครีมทาแผลซิลเวอร์ซิงค์ซัลฟาไดอะซีนที่มีเซริซินในการรักษาบาดแผลไฟไหม้ที่มีความลึกหนาบางส่วนในผู้ป่วยชายอายุ 14 ปี พบว่าครีมผสมเซริซินดังกล่าวทำให้บาดแผลไฟไหม้มีเซลล์ผิวหนังปกคลุมอย่างสมบูรณ์ภายใน 14 วัน และไม่พบการแพ้หรือระคายเคืองผิว (23) ล่าสุดการศึกษาของ

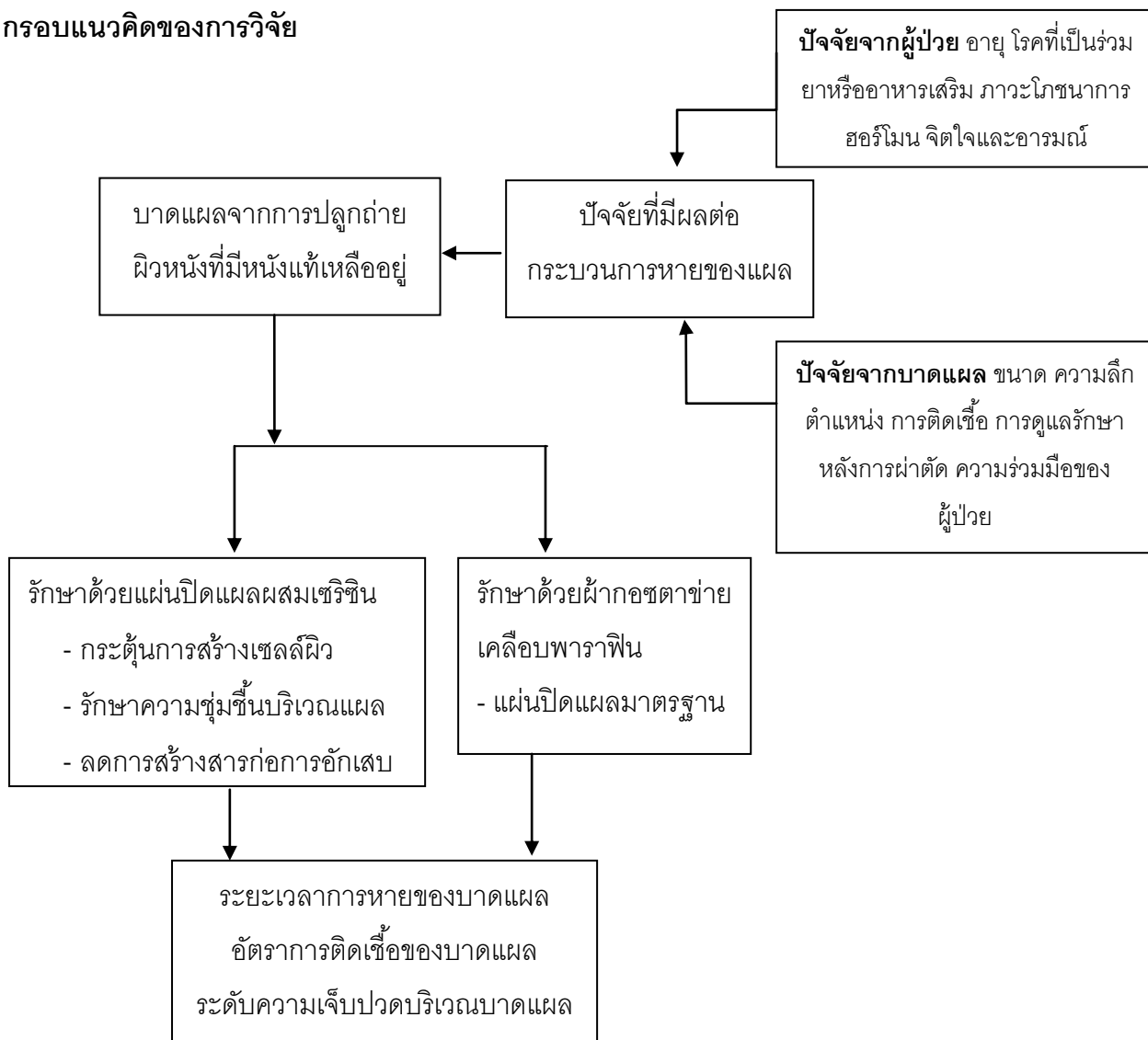
Palapinyo และคณะในปี 2011 ศึกษาประสิทธิศักร์และความปลอดภัยของยาทาเฉพาะที่ซิลเวอร์ซิงค์ซัลฟาไดออกไซด์ผสมเซริซินจากไหมเปรียบเทียบกับยาทาเฉพาะที่ซิลเวอร์ซิงค์ซัลฟาไดอะซีนที่ใช้รักษาแผลไหม้ในโรงพยาบาลในผู้ป่วยจำนวน 16 คนซึ่งมีบาดแผลไหม้ทั้งสิ้นจำนวน 34 บาดแผล พบว่าเซริซินสามารถเร่งอัตราการหายของบาดแผลในผู้ป่วยแผลไฟไหม้ที่มีความลึกหาบางส่วนได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยไม่ก่อให้เกิดการระคายเคืองผิว ไม่พบการติดเชื้อของบาดแผล และไม่พบรายงานไม่พึงประสงค์จากการใช้ยาทาเฉพาะที่ซิลเวอร์ซิงค์ซัลฟาไดอะซีนผสมเซริซิน (41) อย่างไรก็ตามรูปแบบยาเตรียมแบบครีมเหมาะสำหรับทาเฉพาะบาดแผลตื้น ขาดคุณสมบัติในการปกป้องบาดแผลจากการกระทบกระเทือนจากภายนอก ปริมาณครีมทาบาดแผลที่ใช้แต่ละครั้งอาจไม่คงที่และจำเป็นต้องได้รับการดูแลบาดแผลทุกวันอย่างน้อยวันละครั้งโดยบุคลากรทางการแพทย์ ซึ่งก่อความไม่สะดวกแก่ผู้ป่วยและผู้ทำการรักษา ทำให้เกิดแนวคิดในการพัฒนาแผ่นปิดแผลที่มีส่วนประกอบของเซริซินจากไหมซึ่งง่ายต่อการดูแลบาดแผลผู้ป่วย โดยผสมเซริซินเข้ากับโพลิเมอร์ คือ โพลีไวนิลแอลกอฮอล์ (Polyvinyl alcohol) ซึ่งเป็นโพลิเมอร์สังเคราะห์ที่ใช้ทั่วไปทางการแพทย์ จากนั้นนำแผ่นที่ได้ผ่านกระบวนการเชื่อมข้ามทางกายภาพโดยแอลกอฮอล์ และผ่านกระบวนการทำให้ปราศจากเชื้อโดยรังสีแกมมา ก่อนนำไปใช้ (42) การศึกษาเบื้องต้นเปรียบเทียบผลการรักษาและความปลอดภัยระหว่างแผ่นปิดแผลผสมเซริซินกับแผ่นโพลิเมอร์ปิดแผลที่จำหน่ายในท้องตลาดซึ่งเป็นกลุ่มควบคุมต่อบาดแผลลึกระดับ 3 บนผิวหนังของหนูทดลอง พบว่าบาดแผลที่รักษาด้วยแผ่นปิดแผลผสมเซริซินมีการสร้างเซลล์ผิวใหม่ได้ตั้งแต่วันที่ 3 และบาดแผลหายสนิททั้งหมดในวันที่ 14 ในขณะที่บาดแผลกลุ่มควบคุมนั้นต้องใช้ระยะเวลา 21 วัน บาดแผลทั้งหมดจึงหายสนิท รวมถึงไม่พบการแพ้เมื่อตรวจในระดับเนื้อเยื่อวิทยา

จากการทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้องแสดงให้เห็นถึงคุณลักษณะอันเป็นประโยชน์ของเซริซินจากไหมในการกระตุ้นการสมานแผล ลดการสร้างสารก่อการอักเสบ ผลข้างเคียงน้อยและสามารถสกัดได้ง่ายในประเทศไทย รวมถึงคุณสมบัติของแผ่นปิดแผลผสมเซริซินที่พัฒนาขึ้นซึ่งอาจเป็นทางเลือกหนึ่งให้กับผู้ป่วยที่จำเป็นต้องได้รับการรักษาด้วยการปลูกถ่ายผิวหนัง หรือผู้ป่วยที่มีได้รับบาดเจ็บที่ผิวหนังเป็นบริเวณกว้าง การศึกษานี้จะเป็นการศึกษาแรกเกี่ยวกับประสิทธิภาพทางคลินิกของแผ่นปิดแผลผสมเซริซินจากไหมในการรักษาบาดแผลจากการปลูกถ่ายผิวหนังที่มีหนังแท้เหลืออยู่บางส่วน ในด้านระยะเวลาที่ใช้ในการหายของบาดแผล อัตราการติดเชื้อของบาดแผล รวมถึงระดับความเจ็บปวดที่เกิดขึ้นโดยเปรียบเทียบกับผ้ากอซตาข่ายเคลือบพาราฟินซึ่งเป็นแผ่นปิดแผลมาตรฐานสำหรับรักษาบาดแผลจากการปลูกถ่ายผิวหนังที่มีหนังแท้เหลืออยู่บางส่วนอยู่ในปัจจุบัน

### สมมติฐานการวิจัย

1. บาดแผลจากการปลูกถ่ายผิวหนังที่มีหนังแท้เหลืออยู่บางส่วนที่ได้รับการรักษาด้วยแผ่นปิดแผลผสมเซริซินใช้ระยะเวลาการหายของบาดแผลน้อยกว่าบาดแผลที่รักษาด้วยผ้าก๊อซตาข่ายเคลือบพาราฟิน
2. บาดแผลจากการปลูกถ่ายผิวหนังที่มีหนังแท้เหลืออยู่บางส่วนที่ได้รับการรักษาด้วยแผ่นปิดแผลผสมเซริซินมีอัตราการติดเชื้อของบาดแผลไม่แตกต่างกับบาดแผลที่รักษาด้วยผ้าก๊อซตาข่ายเคลือบพาราฟิน
3. บาดแผลจากการปลูกถ่ายผิวหนังที่มีหนังแท้เหลืออยู่บางส่วนที่ได้รับการรักษาด้วยแผ่นปิดแผลผสมเซริซินมีระดับความเจ็บปวดบริเวณแผลน้อยกว่าบาดแผลที่รักษาด้วยผ้าก๊อซตาข่ายเคลือบพาราฟิน
4. บาดแผลจากการปลูกถ่ายผิวหนังที่มีหนังแท้เหลืออยู่บางส่วนไม่เกิดอาการข้างเคียงจากการรักษาด้วยแผ่นปิดแผลผสมเซริซิน

**กรอบแนวคิดของการวิจัย**



**ขอบเขตของโครงการวิจัย**

ในการศึกษาครั้งนี้จะทำการศึกษาเฉพาะบาดแผลจากการปลูกถ่ายผิวน้ำที่มีหนังแท้เหลืออยู่บางส่วน ในผู้ป่วยของหน่วยศัลยกรรมตกแต่งและเสริมสร้าง โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ระหว่างเดือนกุมภาพันธ์ 2555 ถึงมกราคม 2556

**คำสำคัญ (Keywords) ของโครงการวิจัย**

wound dressing, sericin, split-thickness skin graft donor site

**คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย**

1. บาดแผลจากการปลูกถ่ายผิวน้ำที่มีหนังแท้เหลืออยู่บางส่วน (39) หมายถึง บาดแผลที่เกิดขึ้นใหม่จากการผ่าตัดการปลูกถ่ายผิวน้ำที่ประกอบด้วยชั้นหนังกำพืดและบางส่วน ของชั้นหนังแท้

2. ระยะเวลาที่ใช้ในการหายของบาดแผล (55) หมายถึง ระยะเวลา นับตั้งแต่หลังการผ่าตัดจนกระทั่งแผลปิดอย่างสมบูรณ์ โดยประเมินจากผิวหนังบริเวณบาดแผลแห้ง ไม่มีสารคัดหลั่งหรือเลือดซึมออกจากแผล รวมถึงสามารถสัมผัสกับสิ่งแวดล้อมโดยไม่มีอาการปวด ซึ่งแผ่นปิดแผลจะค่อย ๆ หลุดออกเองและและบาดแผลจะปกคลุมด้วยผิวหนังที่สร้างขึ้นใหม่
3. อัตราการติดเชื้อของบาดแผล (wound infection rate) (12) หมายถึง จำนวนแผลที่พบว่ามีสัญญาณของการติดเชื้อ ได้แก่ การเกิดอาการปวดเฉียบพลันหรือเพิ่มมากขึ้นจนผิดปกติ บริเวณบาดแผล อาการบวม แดง อักเสบบริเวณบาดแผลหรือรอบ ๆ บาดแผล บาดแผลมีกลิ่นเหม็น มีหนองหรือมีสารคัดหลั่งปริมาณเพิ่มขึ้นหรือเปลี่ยนสี เนื้อเยื่อบริเวณบาดแผลเน่า ฯลฯ เมื่อส่งตัวอย่างจากบาดแผลไปเพาะเชื้อ พบเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในปริมาณมากกว่า  $10^5$  CFU/mL รวมถึงพิจารณาภาวะทั่วไปของผู้ป่วย ได้แก่ ผู้ป่วยมีไข้ อาการชักเกร็ง หรือการลดความอยากอาหารของผู้ป่วยอย่างฉับพลัน ฯลฯ
4. ระดับความเจ็บปวดบริเวณบาดแผล (34) หมายถึง ระดับความเจ็บปวดที่เกิดขึ้นขณะมีการทำความสะอาดหรือสังเกตลักษณะบาดแผล โดยประเมินระดับความเจ็บปวดด้วย visual analog scale (VAS) โดยให้ผู้ป่วยประเมินความรู้สึกปวดด้วยการกากบาทลงบนเส้นตรงความยาว 10 เซนติเมตร ด้านซ้ายสุดเป็นระดับ 0 คือ ไม่มีอาการปวด และด้านขวาสุดเป็นระดับ 10 คือ มีอาการปวดรุนแรงมากจนไม่สามารถทนได้

## เอกสารประกอบหมายเลข 2

### วิธีดำเนินการวิจัย

#### รูปแบบการวิจัย

การศึกษาเชิงทดลองการคลินิกแบบเทียบคู่ที่มีการสุ่มและมีกลุ่มควบคุม (Randomized controlled matched pair clinical trial)

#### ระยะเวลาดำเนินการวิจัย

เริ่มเก็บข้อมูลบาดแผลจากการปลูกถ่ายผิวหนังที่มีหนังแท้เหลืออยู่บางส่วน ในผู้ป่วยของหน่วยศัลยกรรมตกแต่งและเสริมสร้าง โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ตั้งแต่เดือนกุมภาพันธ์ 2555

#### วิธีดำเนินการวิจัย

วิธีดำเนินการวิจัยแบ่งเป็น 3 ขั้นตอนคือ

ขั้นตอนที่ 1: การเตรียมการก่อนดำเนินการวิจัย

ขั้นตอนที่ 2: การดำเนินการวิจัย

ขั้นตอนที่ 3: การวิเคราะห์และอภิปรายผลการวิจัย

#### ขั้นตอนที่ 1 การเตรียมการก่อนดำเนินการวิจัย

1.1 ทบทวนเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1.2 คัดเลือกสถานที่ที่จะดำเนินการวิจัย

ผู้วิจัยได้เลือกโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์เป็นสถานที่ทำการวิจัย

1.3 ประชากร กลุ่มตัวอย่าง และเกณฑ์การคัดเลือกตัวอย่างเข้าร่วมการวิจัย

**ประชากรเป้าหมาย** บาดแผลที่เกิดจากการปลูกถ่ายผิวหนังที่มีหนังแท้เหลืออยู่บางส่วน (donor site) ซึ่งได้รับการผ่าตัด ณ หน่วยศัลยกรรมตกแต่งและเสริมสร้าง โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

**กลุ่มตัวอย่าง** บาดแผลที่เกิดจากการปลูกถ่ายผิวหนังที่มีหนังแท้เหลืออยู่บางส่วนซึ่งได้รับการผ่าตัด ณ หน่วยศัลยกรรมตกแต่งและเสริมสร้าง โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ตั้งแต่เดือนกุมภาพันธ์ 2555 และผ่านเกณฑ์คัดเข้างานวิจัย

#### **เกณฑ์การคัดเลือกผู้ป่วยเข้าร่วมการวิจัย (Inclusion criteria)**

1. ผู้ป่วยที่มีความจำเป็นต้องได้รับการรักษาด้วยการปลูกถ่ายผิวหนังที่มีหนังแท้เหลืออยู่บางส่วน ได้แก่ ผู้ป่วยแผลไฟไหม้น้ำร้อนลวก ผู้ป่วยประสบอุบัติเหตุ หรือผู้ป่วยที่ได้รับการผ่าตัดใหญ่ ฯลฯ

2. ผู้ป่วยได้รับการประเมินจากแพทย์ศัลยกรรมผู้เชี่ยวชาญแล้วว่า มีสภาพร่างกายพร้อมและต้องมีผิวหนังปกติในบริเวณต้นขาที่กว้างเพียงพอที่จะเป็นผิวหนังสำหรับการปลูกถ่ายอย่างน้อย 1 ตำแหน่งขึ้นไป
3. บาดแผลที่เกิดจากการปลูกถ่ายผิวหนังมีความลึกหนาอยู่ในช่วง 0.15-0.45 มิลลิเมตร (0.006-0.018 นิ้ว) และมีขนาดของบาดแผลอย่างน้อย 50 ตารางเซนติเมตรขึ้นไป
4. ผู้ป่วยมีอายุระหว่าง 18 - 65 ปี
5. ผู้ป่วยยินยอมเข้าร่วมการวิจัย

#### เกณฑ์การคัดผู้ป่วยออกจากการวิจัย (Exclusion criteria)

1. ผู้ป่วยที่ใช้ผิวหนังที่ปลูกถ่ายจากตำแหน่งอื่นของร่างกายที่ไม่ใช่บริเวณต้นขา
2. บาดแผลที่เกิดจากการปลูกถ่ายผิวหนังซึ่งอยู่ในบริเวณที่มีโอกาสเสี่ยงต่อการติดเชื้อ เช่น ใกล้บาดแผลอื่นที่ติดเชื้อ มีหนอง หรือส่งกลิ่นเหม็นอยู่ก่อน
3. ผู้ป่วยที่มีความบกพร่องทางการได้ยิน การอ่านและการเขียน หรือมีอาการทางจิตประสาทไม่สามารถเข้าใจหรือรับรู้ได้
4. ผู้ป่วยที่มีประวัติความบกพร่องทางภูมิคุ้มกัน เช่น Auto-immune disease หรือ Acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) ฯลฯ
5. ผู้ป่วยที่ไม่สามารถปฏิบัติตามแผนงานวิจัยได้ เช่น ไม่ให้ความร่วมมือในการประเมินระดับอาการปวด ไม่มาพบแพทย์ตามนัดหมายในระหว่างที่แผลบริเวณที่ศึกษายังไม่หายสนิท
6. ผู้ป่วยที่มีประวัติแพ้โปรตีนกาวไหม หรือ พาราฟิน หรือ chlorhexidine acetate
7. ผู้ป่วยตั้งครรภ์

#### การคำนวณขนาดตัวอย่าง

การคำนวณขนาดตัวอย่างของการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยข้อมูล 2 ชุดที่ไม่เป็นอิสระต่อกัน (dependent sample) ซึ่งผู้วิจัยต้องการศึกษาเปรียบเทียบระยะเวลาที่ใช้ในการหายของบาดแผลที่มีหนังแท้เหลืออยู่บางส่วน ระหว่างกลุ่มที่รักษาด้วยแผ่นปิดแผลผสมเซรีซินจากไหมกับกลุ่มที่รักษาด้วยแผ่นปิดแผลชนิดผ้ากอซตาข่ายเคลือบพาราฟิน ซึ่งมีสูตรการคำนวณขนาดตัวอย่าง (46) ดังนี้

$$\text{สูตร} \quad N = \frac{(Z_{\alpha} + Z_{\beta})^2 S_p^2}{D^2}$$

จากการศึกษาของ Angspatt และคณะในปี ค.ศ. 2011 (50) ได้ศึกษาผลของการรักษาบาดแผลที่มีหนังแท้เหลืออยู่บางส่วน โดยรักษาด้วยแผ่น Carboxymethylchitosan ซึ่งผลิตโดย



ศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ (MTEC, Thailand) เปรียบเทียบกับการรักษาด้วยแผ่นปิดแผลชนิดผ้ากอซตาข่ายเคลือบพาราฟิน (Bactigras®) ในผู้ป่วยจำนวน 44 ราย ผลการศึกษาพบว่า บาดแผลที่รักษาด้วยแผ่น Carboxymethylchitosan ใช้เวลาเฉลี่ย  $11.32 \pm 2.55$  วันจึงหายสนิท ส่วนแผลที่รักษาด้วยแผ่นแผ่นปิดแผลชนิดผ้ากอซตาข่ายเคลือบพาราฟิน ใช้เวลาเฉลี่ยมากกว่า คือ  $15.03 \pm 2.93$  วัน จึงหายสนิท ซึ่งระยะเวลาดังกล่าวมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.001$ )

เมื่อกำหนด ระดับความเชื่อมั่น เท่ากับ 95% ( $\alpha = 0.05$ )

อำนาจในการทดสอบ เท่ากับ 90% ( $\beta = 0.1$ )

$$Z_\alpha = 1.96$$

$$Z_\beta = 1.28$$

$$N = \text{จำนวนตัวอย่างที่ต้องการ}$$

$$S_p^2 = \text{ความแปรปรวนรวม (pooled variance)}$$

$D = \text{Effect size}$  คือ ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยที่ยอมรับว่ามีนัยสำคัญทางคลินิก ในที่นี้คือความแตกต่างของระยะเวลาที่ใช้ในการหายของบาดแผลที่มีหนึ่งแฉ่เหลืออยู่บางส่วนที่รักษาด้วยแผ่นปิดแผลทั้งสองชนิด ซึ่งกำหนดให้มีความแตกต่างเท่ากับ 2 วัน

จากผลการศึกษาของ Angspatt และคณะ สามารถคำนวณความแปรปรวนรวม (pooled variance) โดยใช้สูตร

$$S_p^2 = \frac{S_1^2 + S_2^2}{2}$$

$$S_p^2 = \frac{2.55^2 + 2.93^2}{2} = 7.5437$$

$$\text{คำนวณขนาดตัวอย่าง } N = \frac{(Z_\alpha + Z_\beta)^2 S_p^2}{D^2}$$

$$= \frac{(1.96 + 1.28)^2 \times 7.5437}{2^2}$$

$$= 19.78 \approx 20 \text{ แผล}$$

เมื่อคาดว่าจะมีการออกจากการวิจัย คิดเป็นร้อยละ 30 (drop-out rate = 30 %)

$$N = \frac{20}{1 - 0.3} = 30 \text{ แผล}$$

ดังนั้น ในการวิจัยครั้งนี้ต้องการตัวอย่างบาดแผลที่มีหนังแท้เหลืออยู่บางส่วนอย่างน้อย

30 แผล

1.4 จัดเตรียมเครื่องมือในการวิจัย ได้แก่

1. แบบฟอร์มบันทึกข้อมูลผู้ป่วย
2. แบบฟอร์มบันทึกข้อมูลงานวิจัย
3. เอกสารข้อมูลสำหรับอาสาสมัครโครงการวิจัย
4. เอกสารแสดงความยินยอมเข้าร่วมในโครงการวิจัย
5. แบบประเมินระดับความเจ็บปวดด้วย visual analog scale (VAS) โดยให้ผู้ป่วยประเมินความรู้สึกปวดด้วยการกากบาทลงบนเส้นตรงความยาว 10 เซนติเมตร ด้านซ้ายสุดเป็นระดับ 0 คือ ไม่มีอาการปวด และด้านขวาสุดเป็นระดับ 10 คือ มีอาการปวดรุนแรงมากจนไม่สามารถทนได้
6. แผ่นเนื้อเยื่อปิดแผลผสมโปรตีนกาวไหม ซึ่งทำการผลิตและควบคุมคุณภาพโดย หน่วยวิจัยสารทรงฤทธิ์ชีวภาพเพื่อผลทางคลินิก (Bioactive Resources for Clinical Uses Research Unit) คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ประกอบไปด้วยเซริซิน 3%, โพลีไวนิลแอลกอฮอล์ 2% และ กลีเซอริน 1% ผ่านการทำให้ปราศจากเชื้อโดยรังสีแกมมา บรรจุในซองพลาสติกปิดสนิท
7. แผ่นปิดแผลผ้ากอซตาข่ายเคลือบพาราฟิน (Bactigras®; บริษัท Smith & Nephew)

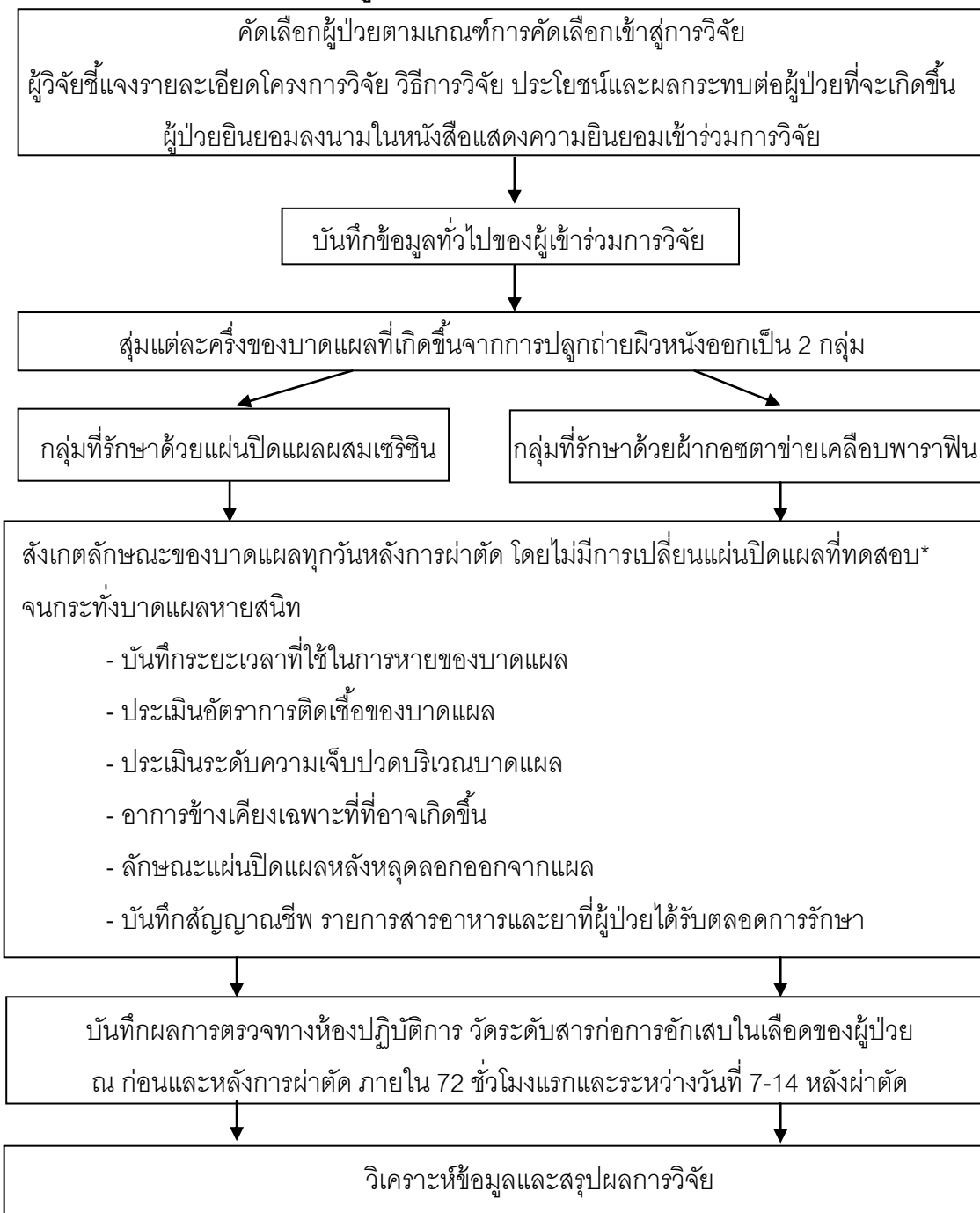
## ขั้นตอนที่ 2: การดำเนินการวิจัย

1. คัดเลือกผู้ป่วยที่มีคุณสมบัติครบตามเกณฑ์เข้าร่วมการวิจัย
2. ชี้แจงเกี่ยวกับรายละเอียดโครงการวิจัย วัตถุประสงค์ ขั้นตอนการศึกษา ประโยชน์และผลกระทบที่จะเกิดขึ้นกับผู้ป่วย พร้อมทั้งขอความยินยอมการเข้าร่วมในโครงการวิจัย
3. บันทึกข้อมูลทั่วไปของผู้เข้าร่วมการวิจัย ได้แก่ เพศ อายุ อาชีพ สถิติในการรักษา โรคประจำตัว รายการยาหรือผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่ผู้ป่วยใช้ สาเหตุของโรคที่ผู้ป่วยจำเป็นต้องได้รับการผ่าตัดปลูกถ่ายผิวหนัง
4. สุ่มบาดแผลจากการปลูกถ่ายผิวหนังครั้งหนึ่งเข้ากลุ่มศึกษาและอีกครั้งหนึ่งจะเป็นกลุ่มควบคุม
5. หลังการผ่าตัดปลูกถ่ายผิวหนังที่มีหนังแท้เหลืออยู่บางส่วน บาดแผลที่เกิดขึ้นปิดด้วยแผ่นปิดแผลผสม เซริซินเป็นกลุ่มศึกษา และอีกครั้งหนึ่งปิดด้วยผ้ากอซตาข่ายเคลือบพาราฟินเป็นกลุ่มควบคุม จากนั้นจะปิดทับด้วยผ้ากอซปราศจากเชื้อ และพันผ้ายึดทับไว้อีกหนึ่งชั้นหนึ่ง

6. สังเกตลักษณะของบาดแผลโดยเปลี่ยนเฉพาะผ้าปิดภายนอกทุกวันหลังการผ่าตัดจนกระทั่งบาดแผลหายสนิท โดยประเมินจาก ผิวน้ำบริเวณบาดแผลแห้ง ไม่มีสารคัดหลั่งหรือเลือดซึมออกจากแผล รวมถึงสามารถสัมผัสกับสิ่งแวดล้อมโดยไม่มีอาการปวด ซึ่งแผ่นปิดแผลจะค่อย ๆ หลุดออกเองและบาดแผลจะปกคลุมด้วยผิวน้ำที่สร้างขึ้นใหม่ จะไม่มีการเปลี่ยนแผ่นปิดแผลของทั้งสองกลุ่มตลอดการศึกษา ยกเว้นในกรณีที่พบเลือดหรือสารคัดหลั่งไหลซึมออกมาจากแผ่นปิดแผลชั้นที่สอง หรือมีสัญญาณของการติดเชื้อบริเวณบาดแผล จะให้ทำความสะอาดบาดแผลและเปลี่ยนแผ่นปิดแผลใหม่ทันที
7. ในทุกวันหลังการผ่าตัด จะให้ผู้ป่วยประเมินระดับความเจ็บปวดบริเวณบาดแผล หลังการสังเกตลักษณะบาดแผลโดยให้ผู้พวกรายกบาทลงในแบบประเมินระดับความเจ็บปวดด้วย visual analog scale รวมถึงสังเกตอาการไม่พึงประสงค์เบื้องต้น เช่น อาการบวม แดง แพทย์ผู้เชี่ยวชาญจะประเมินบาดแผลว่ามีสัญญาณของการติดเชื้อหรือไม่ กรณีพบสัญญาณดังกล่าวจะส่งตัวอย่างสารคัดหลั่งบริเวณบาดแผลเพื่อตรวจหาชนิดและปริมาณเชื้อจุลินทรีย์
8. เก็บตัวอย่างเลือดก่อนรับการผ่าตัด (ข้อมูลพื้นฐานเริ่มต้น) และ ภายใน 72 ชั่วโมงหลังการผ่าตัด และระหว่างวันที่ 7-14 หลังการผ่าตัด รวมทั้งหมด 3 ครั้ง ครั้งละ 5 มิลลิลิตร เพื่อตรวจระดับสารก่อการอักเสบที่สร้างขึ้นในร่างกายผู้ป่วยในช่วงเวลาต่าง ๆ ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงตลอดการรักษาและอาจมีส่วนในการทำนายผลของการผ่าตัด (56-58)
9. บันทึกผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการ ตรวจความสมบูรณ์ของเลือด ค่าการทำงานของตับ ค่าการทำงานของไต ระดับอิเล็กโทรไลต์และโปรตีนอัลบูมินในเลือดก่อนและหลังการผ่าตัด
10. บันทึกระยะเวลานับตั้งแต่หลังการผ่าตัดจนกระทั่งบาดแผลแต่ละส่วนปิดอย่างสมบูรณ์ และแผ่นปิดแผลหลุดลอกออกจากบาดแผลเองทั้งหมด ซึ่งระยะเวลาดังกล่าว คือ ระยะเวลาที่ใช้ในการหายของบาดแผล กรณีที่จำหน่ายผู้ป่วยออกจากโรงพยาบาลก่อนบาดแผลจากการปลูกถ่ายผิวน้ำจะหายสนิท จะให้ผู้ป่วยจดบันทึกวันที่แผ่นปิดแผลหลุดลอกออกทั้งหมดและผู้ป่วยไม่รู้สึกรำคาญที่บาดแผลอีกต่อไป
11. เก็บตัวอย่างแผ่นปิดแผลที่เหลือหลังหลุดลอกออกจากบาดแผล ทั้งแผ่นปิดแผลผสมเซโรซินและผ้ากอซตาข่ายเคลือบพาราฟิน เพื่อศึกษาลักษณะของแผ่นปิดแผล สังเกตลักษณะเซลล์ผิวน้ำที่อาจติดอยู่ที่แผ่นปิดแผลภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยเปรียบเทียบกับลักษณะของแผ่นปิดแผลแต่ละชนิดก่อนสัมผัสบาดแผล

12. บันทึกสัญญาณชีพ ได้แก่ อุณหภูมิ ความดันโลหิต รวมถึงรายการสารอาหารและยาที่ผู้ป่วยได้รับตลอดการรักษาในโรงพยาบาล ได้แก่ ยาปฏิชีวนะที่สั่งใช้ก่อนและหลังเข้ารับการรักษา ผ่าตัด ชนิด ความแรงและทางที่ให้ของยาบรรเทาอาการปวดที่สั่งใช้
13. เก็บรวบรวมข้อมูล วิเคราะห์เปรียบเทียบข้อมูลจากทั้งสองกลุ่มและสรุปผลการวิจัย

**แผนภูมิภาพแสดงขั้นตอนการวิจัย**



\*กรณีพบเลือดหรือสารคัดหลั่งไหลซึมออกมาจากแผ่นปิดแผลชั้นที่สอง หรือมีสัญญาณของการติดเชื้อบริเวณบาดแผล จะทำความสะอาดแผลและเปลี่ยนแผ่นปิดแผลใหม่ทันที

### ขั้นตอนที่ 3 การวิเคราะห์และสรุปอภิปรายผลการวิจัย

ข้อมูลไม่ต่อเนื่อง (Discrete data) ได้แก่ ข้อมูลพื้นฐานผู้ป่วย (เพศ สถานะการศึกษา การสูบบุหรี่ การดื่มแอลกอฮอล์ การใช้อาหารเสริมหรือสมุนไพร ชนิดยาลดความดันโลหิตที่ใช้ร่วม) จะนำเสนอโดยตารางแจกแจงความถี่และคำนวณเป็นร้อยละ

ข้อมูลต่อเนื่อง (Continuous data) ได้แก่ อายุ น้ำหนัก ความสูง BMI ค่าความดันโลหิต การเต้นของหัวใจ และผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการ จะนำเสนอโดยค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

วิธีการทางสถิติที่ใช้ทดสอบสมมติฐาน

ถ้าเปรียบเทียบ 2 กลุ่มที่เป็นอิสระต่อกันโดยการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของข้อมูลต่อเนื่องจะใช้ paired t-test ได้แก่ ระยะเวลาเฉลี่ย (วัน) ที่ใช้ทั้งหมดเมื่อแผลหายสนิท คะแนนเฉลี่ย (คะแนน) ของการประเมินระดับความเจ็บปวดในแต่ละวัน และการเปรียบเทียบความแตกต่างของข้อมูลไม่ต่อเนื่องใช้ chi square test ได้แก่ จำนวนบาดแผลที่มีสัญญาณของการติดเชื้อของบาดแผล กำหนดระดับนัยสำคัญ (statistical significance) ใช้ค่า p-value ที่  $< 0.05$

### เอกสารประกอบหมายเลข 3

#### เอกสารอ้างอิง

1. ASEAN Guideline on Stability Study of Drug Product Guideline on Stability Study of Drug Product 22 February; 9th ACCSQ-PPWG Meeting 2005.
2. Note for Guidance on Stability Testing: Stability Testing of New Drug Substances and Products, ICH Topic Q1A (R2) Stability Testing of new Drug Substances and Products (2006).
3. Coates J. Interpretation of Infrared Spectra, A Practical Approach. In: Meyers RA, editor. Encyclopedia of Analytical Chemistry. Chichester: John Wiley & Sons Ltd; 2000. p. 10815–37.
4. Gabbott P. A Practical Introduction of Differential Scanning Calorimetry. In: Gabbott P, editor. A Principles and Applications of Thermal Analysis. 1st ed. Oxford: Blackwell Publishing; 2008. p. 1-49.
5. McNamee P, Api A, Basketter D, Gerberick G, Gilpin D, Hall B, et al. A review of critical factors in the conduct and interpretation of the human repeat insult patch test. Regulatory Toxicology and Pharmacology. 2008;52:24-34.
6. Andreassi A, Bilenchi R, Biagioli M, D'Aniello C. Classification and pathophysiology of skin grafts. Clinics in Dermatology. 2005;23(4):332-7.
7. Hierner R, Degreeef H, Vranckx JJ, Garmyn M, Massagé P, van Brussel M. Skin grafting and wound healing--the "dermato-plastic team approach". Clinics in Dermatology. 2005;23(4):343-52.
8. Voineskos SH, Ayeni OA, McKnight L, Thoma A. Systematic Review of Skin Graft Donor-Site Dressings. Plastic and Reconstructive Surgery. 2009;124(1):298-306
9. Maitra AK. Use of the split-skin graft in casualty practice. Resuscitation. 1976;5(3):205-9.
10. Valencia IC, Falabella AF, Eaglstein WH. SKIN GRAFTING. Dermatologic Clinics. 2000;18(3):521-32.

11. MedMarket Diligence L. Prevalence of dermal applications for sealants and glues. *Worldwide Surgical Sealants, Glues and Wound closure*. 2009-2013.
12. Kornhaber R. *Skin Graft Management Guidelines*. Northern Sydney Central Coast Health. 2010:1-20.
13. Watanasit Y, Jitsurong S, Wansu F, Chichareon V. The application of cellulose (Thainanocell®) wound dressing on acute wound with partial thickness loss. *Songkla Med J*. 2009;27(3):235-47.
14. Shevchenko RV, James SL, James SE. A review of tissue-engineered skin bioconstructs available for skin reconstruction. *J R Soc Interface*. 2010;7:229-58.
15. Harding K, Cutting K, Price P. The cost-effectiveness of wound management protocols of care. *Br J Nurs* 2000;9(19):6-10.
16. Fabiani C, Pizzichini M, Spadoni M, Zeddita G. Treatment of waste water from silk degumming processes for protein recovery and water reuse. *Desalination*. 1996;105(1-2):1-9.
17. Vaithanomsat P, Kitpreechavanich V. Sericin separation from silk degumming wastewater. *Separation and Purification Technology*. 2008;59(2):129-33.
18. Padamwar MN, Pawar AP, Daithankar AV, Mahadik KR. Silk sericin as a moisturizer: an in vivo study. *Journal of Cosmetic Dermatology*. 2005;4(4):250-7.
19. Terada S, Yanagihara K, Kaito K, Miki M, Sasaki M, Tsujimoto K, et al. Silk Protein Sericin Accelerates Proliferation of Various Mammalian Cells. In: Gòdia F, Fussenegger M, editors. *Animal Cell Technology Meets Genomics*. ESACT Proceedings. 2: Springer Netherlands; 2005. p. 585-7.
20. Dash R, Acharya C, Bindu P, Kundu S. Antioxidant potential of silk protein sericin against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in skin fibroblasts *BMB Rep*. 2008;41(3):236-41.
21. Aramwit P, Sangcakul A. The Effects of Sericin Cream on Wound Healing in Rats. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2007;71(10):2473-7.

22. Aramwit P, Kanokpanont S, De-Eknamkul W, Srichana T. Monitoring of inflammatory mediators induced by silk sericin. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2009;107(5):556-61.
23. Namviriyachote N, Aramwit P, Palapinyo S, Muengman P. Case report: Topical silver zinc sulfadiazine for treatment of deep partial thickness burn wounds. *Thai Journal of Burn Injury*. 2010;4(7):5-13.
24. Aramwit P, Siritientong T, Kanokpanont S, Srichana T. Formulation and characterization of silk sericin-PVA scaffold crosslinked with genipin. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2010;47(5):668-75.
25. Hattingh J. The relationship between skin structure and transepidermal water loss. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*. 1973;45(3):685-8.
26. Berardesca E, Maibach H. Ethnic skin: Overview of structure and function. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2003;48(6, Supplement 1):S139-S42.
27. Muengman P. Benefit and cost effectiveness of various wound dressing. *Frontier in Wound Care*. 2010:80-97.
28. JBI. Split Skin Graft Donor Sites: Post Harvest Management. *Best Practice*. 2002;6(2):1-5.
29. Zhang Y-Q. Applications of natural silk protein sericin in biomaterials. *Biotechnology Advances*. 2002;20(2):91-100.
30. Mondal M, Trivedy K, Kumar NS. The silk proteins, sericin and fibroin in silkworm, *Bombyx mori* Linn., - A review *Caspian Journal of Environmental Science*. 2007;5(2):63-76.
31. Padamwar M, Pawar A. Silk sericin and its applications: a review. *Journal of Scientific and Industrial Reserach*. 2004;63:323-9.



32. Sehna F. Prospects of the practical use of silk sericins. *Entomological Research*. 2008;38:S1-S8.
33. Kato N, Sato S, Yamanaka A, Yamada H, Fuwa N, Nomura M. Silk Protein, Sericin, Inhibits Lipid Peroxidation and Tyrosinase Activity. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 1998;62(1):145-7.
34. Kundu SC, Dash BC, Dash R, Kaplan DL. Natural protective glue protein, sericin bioengineered by silkworms: Potential for biomedical and biotechnological applications. *Progress in Polymer Science*. 2008;33(10):998-1012.
35. Nagai N, Murao T, Ito Y, Okamoto N, Sasaki M. Enhancing Effects of Sericin on Corneal Wound Healing in Rat Debrided Corneal Epithelium. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 2009;32(5):933-6.
36. Nagai N, Murao T, Ito Y, Okamoto N, Sasaki M. Enhancing Effects of Sericin on Corneal Wound Healing in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty Rats as a Model of Human Type 2 Diabetes. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 2009;32(9):1594-9.
37. Teramoto H, Kameda T, Tamada Y. Preparation of Gel Film from Bombyx mori Silk Sericin and Its Characterization as a Wound Dressing. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2008;72(12):3189-96.
38. กุสุมภ์ ว. การพยาบาลผู้ป่วยที่มีบาดแผล. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; 2546.
39. Wound Donor Site Management Guideline. Northern Sydney Central Coast Health. 2008:1-13.
40. Feldman DL. Which Dressing for Split-Thickness Skin Graft Donor Sites? *Annals of Plastic Surgery*. 1991;27(3):288-91.
41. Palapinyo S, Muangman P, Aramwit P. Systemic Safety of Silver Zinc Sulfadiazine with Silk Sericin Cream for Burn Wound Treatment. *KKU Res J*. 2011;16(8):1014-24.

42. Siritientong T, Srichana T, Aramwit P. The Effect of Sterilization Methods on the Physical Properties of Silk Sericin Scaffolds. *AAPS PharmSciTech*. 2011;12(2):771-81.
43. Rudolph RB, Donald L. Skin Grafts. In: Saunders W, editor. *Plastic surgery*. 1. Philadelphia: Saunders W.B. Company; 1990. p. 221-74.
44. Geary PM, Tiernan E. Management of split skin graft donor sites – results of a national survey. *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery*. 2009;62(12):1677-83.
45. Leung JJ, Fish J. Skin Grafts; review. *University of Toronto Medical Journal*. 2009;86(2):61-4.
46. Demirtas Y, Yagmur C, Soylemez F, Ozturk N, Demir A. Management of split-thickness skin graft donor site: A prospective clinical trial for comparison of five different dressing materials. *Burns* 2010;36(7):999-1005.
47. Bactigras [Internet]. [cited 5 December 2011]. Available from: <http://wound.smith-nephew.com/uk/Product.asp?NodeId=1786>.
48. Barnea Y, Amir A, Leshem D, Zaretski A, Weiss J, Shafir R, et al. Clinical Comparative Study of Aquacel and Paraffin Gauze Dressing for Split-Skin Donor Site Treatment. *Annals of Plastic Surgery*. 2004;53(2):132-6.
49. Muangman P, Nitimonton S, Aramwit P. Comparative Clinical Study of Bactigras and Telfa AMD for Skin Graft Donor-Site Dressing. *International Journal of Molecular Sciences*. 2011;12(8):5031-8. PubMed PMID: doi:10.3390/ijms12085031.
50. Angspatt A, Taweerattanasil B, Janvikul W, Chokrungvaranont P, Wimon S. Carboxymethylchitosan, alginate and tulle gauze wound dressings: a comparative study in the treatment of partial-thickness wounds. *Asian Biomedicine*. 2011;5(3):413-6.
51. Aramwit P, Kanokpanont S, Nakpheng T, Srichana T. The Effect of Sericin from Various Extraction Methods on Cell Viability and Collagen Production. *International Journal of Molecular Sciences*. 2010;11(5):2200-11. PubMed PMID: doi:10.3390/ijms11052200.

52. Tsubouchi K, Igarashi Y, Takasu Y, Yamada H. Sericin Enhances Attachment of Cultured Human Skin Fibroblasts. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2005;69(2):403-5.
53. Teramoto H, Nakajima K-i, Takabayashi C. Preparation of Elastic Silk Sericin Hydrogel. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2005;69(4):845-7.
54. Panilaitis B, Altman GH, Chen J, Jin H-J, Karageorgiou V, Kaplan DL. Macrophage responses to silk. *Biomaterials*. 2003;24(18):3079-85.
55. Ferreira LM, Blanes L, Gragnani A, Veiga DF, Veiga FP, Nery GB, et al. Hemicellulose dressing versus rayon dressing in the re-epithelialization of split-thickness skin graft donor sites: a multicenter study. *Journal of Tissue Viability*. 2009;18(3):88-94.
56. Angele MF, E. Clinical review: Immunodepression in the surgical patient and increased susceptibility to infection. *Critical Care*. 2002;6(4):298-305.
57. Osuka K, Suzuki Y, Saito K, Takayasu M, Shibuya M. Changes in serum cytokine concentrations after neurosurgical procedures. *Acta Neurochirurgica*. 1996;138(8):970-6.
58. Roumen RM, Hendriks T, Van Der Ven-Jongekrijg J, Nieuwenhuijzen GA, Sauerwein RW, Van Der Meer JW, et al. Cytokine patterns in patients after major vascular surgery, hemorrhagic shock, and severe blunt trauma. Relation with subsequent adult respiratory distress syndrome and multiple organ failure. *Annals of Surgery*. 1993;218(6):769-76.

## เอกสารหมายเลข 4

### ภาคผนวก (Appendix)

- แบบฟอร์มบันทึกข้อมูลผู้ป่วย
- แบบฟอร์มบันทึกผลการวิจัยและผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการ
- แบบประเมินอาการปวดที่เกิดขึ้นบริเวณบาดแผล
- เอกสารข้อมูลสำหรับอาสาสมัครโครงการวิจัย
- เอกสารแสดงความยินยอมเข้าร่วมในโครงการวิจัย

Data entry sheet/ Case record form

IRB # \_\_\_\_\_

Title: CLINICAL EFFICACY OF WOUND DRESSING CONTAINING SILK SERICIN FOR SPLIT-THICKNESS SKIN GRAFT DONOR SITE TREATMENT

ข้อมูล		
ข้อมูลพื้นฐาน	Patient code _____	
1. เพศ	<input type="checkbox"/> ชาย <input type="checkbox"/> หญิง	
2. อายุ	<input type="text"/> <input type="text"/> ปี	
3. น้ำหนัก	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> กิโลกรัม	
4. ส่วนสูง	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> เซนติเมตร	
5. BMI	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> kg/m <sup>2</sup>	
6. สถานะ	<input type="checkbox"/> โสด <input type="checkbox"/> แต่งงาน <input type="checkbox"/> อื่นๆ ระบุ.....	
7. อาชีพ	.....	
8. สิทธิการรักษา	<input type="checkbox"/> ประกันสุขภาพถ้วนหน้า <input type="checkbox"/> ประกันสังคม	
	<input type="checkbox"/> สวัสดิการข้าราชการ <input type="checkbox"/> ประกันสุขภาพกับบริษัทเอกชน	
	<input type="checkbox"/> จ่ายเงินสด <input type="checkbox"/> อื่นๆ ระบุ.....	
9. โรคประจำตัว		
โรค	เริ่ม/ระยะเวลาที่เป็น	ยาที่ใช้
ประวัติการแพ้ยา.....		
10. ประวัติทางสังคม		
10.1) สูบบุหรี่.....		
10.2) ดื่มแอลกอฮอล์.....		
10.3) IVDU/other drug abuse.....		
ข้อมูลเกี่ยวกับการผ่าตัดและการใช้ STSG		

11. เข้ารับการรักษานในโรงพยาบาล ครั้งที่ .....
12. ประวัติการรักษาครั้งก่อน .....
- .....
13. การวินิจฉัยแรกพบในปัจจุบัน .....
- .....
14. การผ่าตัด .....
- .....
15. ตำแหน่งของ STSG donor site.....
16. พื้นที่ของ STSG donor site ..... cm<sup>2</sup>
17. ความลึกของ STSG donor site ..... inch
18. วันที่เข้ารับการรักษานในโรงพยาบาล   /   /
19. วันที่รับการผ่าตัดปลูกถ่ายผิวหนัง   /   /
20. วันที่จำหน่ายออกจากโรงพยาบาล   /   /
21. ระยะเวลาทั้งหมดที่รักษาตัวในโรงพยาบาล    วัน
22. ยาที่ใช้ระหว่างรักษาตัวในโรงพยาบาล

ชื่อยาและความแรง	Order / Exp. date	รายละเอียด

23. Home medications

.....

.....

.....



Patient code \_\_\_\_\_

ข้อมูลทางห้องปฏิบัติการ	ค่าปกติ	เก็บตัวอย่างเลือดวันที่		
		Pre-op .../.../...	Day(1-3) .../.../...	Day (7-14) .../.../...
BUN				
Creatinine				
Albumin				
AST (SGOT)				
ALT (SGPT)				
Alkaline phosphate				
Sodium				
Potassium				
Chloride				
CO <sub>2</sub>				
Hemoglobin				
Hematocrit				
Platelets counts				
White cell counts				
Pro-inflammatory cytokines				
IL-6				
TNF- $\alpha$				





## เอกสารข้อมูลสำหรับอาสาสมัครโครงการวิจัย

**ชื่อโครงการวิจัย** ประสิทธิภาพทางคลินิกของแผ่นปิดแผลผสมเซริซินจากไหมในการรักษาบาดแผลจากการปลูกถ่ายผิวหนังที่มีหนังแท้เหลืออยู่บางส่วน

**วัตถุประสงค์** เพื่อศึกษาผลการรักษาและอาการไม่พึงประสงค์ที่อาจเกิดขึ้นกับบาดแผลจากการปลูกถ่ายผิวหนังที่มีหนังแท้เหลืออยู่บางส่วนด้วยแผ่นปิดแผลผสมเซริซินโดยเปรียบเทียบกับการรักษาด้วยผ้ากอตตาข่ายเคลือบพาราฟิน

### แพทย์ผู้ร่วมในโครงการวิจัย

- 1 รองศาสตราจารย์นายแพทย์ อภิชัย อังสพัทธ์ ที่อยู่ หน่วยศัลยกรรมตกแต่งและเสริมสร้างโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ถนนพระราม 4 ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330 เบอร์โทรศัพท์ (ที่ทำงานและมือถือ) 0-2256-4120, 08-1491-3657
- 2 นายแพทย์สุรินทร์นาท เจริญจิตต์ ที่อยู่ หน่วยศัลยกรรมตกแต่งและเสริมสร้าง โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ถนนพระราม 4 ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330 เบอร์โทรศัพท์ (ที่ทำงานและมือถือ) 0-2256-4120, 08-4000-5991

**ผู้ทำการวิจัย** เกษัชกรหญิง ทิววรรณ ศิริเพียรทอง นิสิตปริญญาเอก ภาควิชาเภสัชกรรมปฏิบัติ ที่อยู่ คณะเภสัชศาสตร์ ภาควิชาเภสัชกรรมปฏิบัติ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ถ.พญาไท แขวง ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330 เบอร์โทรศัพท์ (มือถือ) 08-1805-5246

### เรียน ผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยทุกท่าน

ท่านได้รับเชิญให้เข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้เนื่องจากท่านเป็นผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาด้วยการปลูกถ่ายผิวหนังที่มีหนังแท้เหลืออยู่บางส่วน และก่อนที่ท่านจะตัดสินใจเข้าร่วมในการศึกษาวิจัยดังกล่าว ขอให้ท่านอ่านเอกสารฉบับนี้อย่างถี่ถ้วน เพื่อให้ท่านได้ทราบถึงเหตุผลและรายละเอียดของการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ หากท่านมีข้อสงสัยใดๆ เพิ่มเติม กรุณาซักถามจากทีมงานของแพทย์ผู้ทำวิจัย หรือแพทย์ผู้ร่วมทำวิจัยซึ่งจะเป็นผู้สามารถตอบคำถามและให้ความกระจ่างแก่ท่านได้

ท่านสามารถขอคำแนะนำในการเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้จากครอบครัว เพื่อน หรือแพทย์ประจำตัวของท่านได้ ท่านมีเวลาอย่างเพียงพอในการตัดสินใจโดยอิสระ ถ้าท่านตัดสินใจแล้วว่า จะเข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้ ขอให้ท่านลงนามในเอกสารแสดงความยินยอมของโครงการวิจัยนี้

### เหตุผลและที่มาในการทำวิจัย

การปลูกถ่ายผิวหนังที่มีหนังแท้เหลืออยู่บางส่วนมีความจำเป็นในการรักษาบาดแผลที่มีขนาดใหญ่ หรือบาดแผลที่ไม่สามารถหายเองได้โดยกระบวนการสร้างเซลล์ผิวหนังตามธรรมชาติของร่างกาย อย่างไรก็ตามจะทำให้ผู้ป่วยเกิดบาดแผลใหม่เพิ่มจากแผลเดิมที่ต้องการการรักษา ซึ่งมีความเสี่ยงในการเกิดการติดเชื้อของแผล ก่อความเจ็บปวดและภาวะแทรกซ้อนต่าง ๆ ได้ เช่นเดียวกับบาดแผลที่เกิดจากสาเหตุอื่น ดังนั้นหลังจากที่ผู้ป่วยเข้ารับการรักษาด้วยการปลูกถ่ายผิวหนังจึงต้องการการดูแลอย่างต่อเนื่อง และมีการประเมินการหายของบาดแผลอย่างเหมาะสม การเลือกชนิดของแผ่นปิดแผลเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญ ผ่ากอสตาข่ายเคลือบพาราฟินผสมสารต้านเชื้อแบคทีเรีย 0.5% chlorhexidine acetate (Bactigras<sup>®</sup>) เป็นแผ่นปิดแผลแบบกึ่งเปิดชนิดหนึ่งที่ถูกนิยมนำมาใช้เป็นแผ่นปิดแผลขั้นแรกในการรักษาบาดแผลจากการปลูกถ่ายผิวหนังที่มีหนังแท้เหลืออยู่บางส่วน บาดแผลที่รักษาด้วยผ้ากอสตาข่ายเคลือบพาราฟินพบอัตราการติดเชื้อต่ำ มีผลการรักษาที่น่าพอใจรวมถึงคุ้มทุนกับค่าใช้จ่ายในการรักษาเมื่อเทียบกับแผ่นปิดแผลชนิดอื่น ๆ ข้อเสียที่พบ คือ การขาดคุณสมบัติในการดูดซับเลือดและสารคัดหลั่งจากแผล การยึดติดกับแผลซึ่งรบกวนกระบวนการสมานแผลตามธรรมชาติของร่างกายเนื่องจากเยื่อผิวหนังจะถูกทำลายในขณะเปลี่ยนแผ่นปิดแผล ทำให้บาดแผลลึกรุนแรงกว่าเดิมและก่อความเจ็บปวด ดังนั้นปัจจุบันจึงยังมีการพัฒนาแผ่นปิดแผลชนิดใหม่อย่างต่อเนื่องเพื่อปรับปรุงข้อเสียดังกล่าว

เซริซินเป็นโปรตีนธรรมชาติชนิดหนึ่งที่ได้จากรังของหนอนไหม มีการศึกษาทั้งในประเทศไทยและต่างประเทศที่พบคุณสมบัติต่าง ๆ ของเซริซินที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ มีการวิจัยพบว่า ครีมทาบาดแผลที่ประกอบด้วยเซริซินสามารถกระตุ้นการเจริญของเซลล์ผิวหนังเพิ่มการสร้างคอลลาเจนในผิวหนังโดยไม่ก่อการอักเสบระคายเคืองเมื่อเปรียบเทียบกับครีมพีนหรือยาทาแผลโพวิโดนไอโอดีน การใช้ครีมทาเฉพาะที่ซิลเวอร์ซิงค์ซัลฟาไดออกไซด์ผสมเซริซินจากไหมสามารถเร่งอัตราการหายของบาดแผลในผู้ป่วยแผลไฟไหม้ที่มีความลึกหนาบางส่วนได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยไม่พบรายงานไม่พึงประสงค์ จากคุณสมบัติอันเป็นประโยชน์ต่อการกระตุ้นการสมานแผลของเซริซิน ทำให้เกิดการพัฒนาระบบปิดแผลที่มีส่วนประกอบของเซริซินจากไหมซึ่งง่ายต่อการดูแลบาดแผลผู้ป่วย โดยผสมเซริซินเข้ากับโพลิเมอร์เพื่อขึ้นรูปเป็นแผ่น จากนั้นนำแผ่นปิดแผลที่ได้ผ่านกระบวนการทำให้ปราศจากเชื้อก่อนนำมาศึกษาประสิทธิภาพทางคลินิกของแผ่นปิดแผลผสมเซริซินจากไหมต่อการรักษาบาดแผลจากการปลูกถ่ายผิวหนังที่มีหนังแท้เหลืออยู่บางส่วน โดยเปรียบเทียบกับแผ่นปิดแผลชนิดผ้ากอสตาข่ายเคลือบพาราฟิน

## สำหรับผู้ป่วยที่ยินดีเข้าร่วมการวิจัย จะมีข้อปฏิบัติร่วมดังต่อไปนี้

ในครั้งแรกที่พบกับแพทย์และผู้วิจัย ท่านจะได้รับซักประวัติและบันทึกข้อมูลทั่วไป เมื่อเข้ารับการผ่าตัด บาดแผลจากการปลูกถ่ายผิวหนังบริเวณต้นขาของท่าน ครั้งหนึ่งรักษาด้วยแผ่นปิดแผลผสมเซริซินและอีกครั้งหนึ่งจะรักษาด้วยผ้ากอซเคลือบพาราฟิน ปิดทับด้วยผ้ากอซปราศจากเชื้อ และพันผ้ายึดทับไว้อีกชั้นหนึ่ง

ท่านจะได้รับการสังเกตและดูแลบาดแผลทุกวันหลังการผ่าตัด ผู้วิจัยจะให้ท่านประเมินระดับความเจ็บปวดบริเวณบาดแผลภายหลังการสังเกตลักษณะบาดแผลโดยให้ท่านกากบาทลงบนเส้นตรง ในแบบประเมินระดับความเจ็บปวด สอบถามอาการไม่พึงประสงค์เบื้องต้นที่อาจเกิดขึ้น เช่น ปวด บวม ร้อน บริเวณบาดแผลแต่ละส่วน รวมถึงผู้วิจัยจะบันทึกระยะเวลานับตั้งแต่วันที่การผ่าตัดจนกระทั่งบาดแผลแต่ละส่วนปิดอย่างสมบูรณ์และแผ่นปิดแผลหลุดลอกออกจากบาดแผลเองทั้งหมด

กรณีที่ท่านออกจากโรงพยาบาลก่อนบาดแผลจากการปลูกถ่ายผิวหนังจะหายสนิท ขอให้ท่านจดบันทึกวันที่แผ่นปิดแผลหลุดลอกออกทั้งหมดและท่านไม่รู้สึkpวดที่บาดแผลอีกต่อไปและเก็บตัวอย่างแผ่นปิดแผลที่เหลือหลังหลุดลอกออกจากบาดแผล ทั้งแผ่นปิดแผลผสมเซริซินและผ้ากอซตาข่ายเคลือบพาราฟินในถุงพลาสติกปิดสนิทและแช่ในตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส และรีบนำมาให้แพทย์ในการนัดพบครั้งต่อไป

**การตรวจทางห้องปฏิบัติการ** โดยท่านจะได้รับการเจาะเลือด ก่อนรับการผ่าตัด และภายใน 72 ชั่วโมงหลังการผ่าตัด และในวันที่ 7-14 หลังการผ่าตัด รวมทั้งหมด 3 ครั้ง ครั้งละ 5 มิลลิลิตร เพื่อตรวจระดับน้ำตาลในเลือด ค่าการทำงานของไต ค่าการทำงานของตับ และวัดระดับอิเล็กโทรไลต์ในเลือด รวมถึงระดับสารก่อการอักเสบ

## ความรับผิดชอบของอาสาสมัครผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย

เพื่อให้งานวิจัยนี้ประสบความสำเร็จ ผู้ทำวิจัยใคร่ขอความความร่วมมือจากท่าน โดยจะขอให้ท่านปฏิบัติตามคำแนะนำของผู้ทำวิจัยอย่างเคร่งครัด รวมทั้งแจ้งอาการผิดปกติต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นกับท่านระหว่างที่ท่านเข้าร่วมในโครงการวิจัยให้ผู้ทำวิจัยได้รับทราบ ควรดูแลบาดแผลที่เกิดขึ้นตามคำแนะนำของแพทย์ เพื่อความปลอดภัย ท่านไม่ควรรับประทานยาอื่น อาหารเสริม นอกเหนือจากยาที่ได้รับอยู่เดิมแล้ว ดังนั้นขอให้ท่านแจ้งผู้ทำวิจัยเกี่ยวกับยาที่ท่านได้รับในระหว่างที่ท่านอยู่ในโครงการวิจัย

## ความเสี่ยงที่อาจได้รับ

1. ท่านมีโอกาสที่จะเกิดอาการเจ็บเลือดออก ซึ่งจากการเจาะเลือด อาการบวมบริเวณที่เจาะเลือด หรือหน้ามืดและโอกาสที่จะเกิดการติดเชื้อบริเวณที่เจาะเลือดซึ่งพบได้น้อยมาก

2. ท่านมีโอกาสแพ้โปรตีนเซรีซิน ได้แก่ อาการแดง คันเฉพาะที่ ซึ่งเป็นอาการที่ไม่รุนแรง

### **การพบแพทย์นอกตารางนัดหมายในกรณีที่เกิดอาการข้างเคียง**

หากมีอาการข้างเคียงใด ๆ เกิดขึ้นกับท่าน ขอให้ท่านรีบมาพบแพทย์ที่สถานพยาบาลทันที ถึงแม้ว่าจะอยู่นอกตารางการนัดหมาย เพื่อแพทย์จะได้ประเมินอาการข้างเคียงของท่าน และให้การรักษาที่เหมาะสมทันที หากอาการดังกล่าวเป็นผลจากการเข้าร่วมในโครงการวิจัย ท่านจะไม่เสียค่าใช้จ่าย

### **ประโยชน์ที่อาจได้รับ**

การเข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้อาจจะทำให้ระยะเวลาที่ใช้ในการหาย ระดับอาการปวดของบาดแผลที่เกิดจากการผ่าตัดของท่านลดลง แต่ไม่ได้รับรองว่าระยะเวลาที่ใช้ในการหาย ระดับอาการปวดของบาดแผลที่เกิดจากการผ่าตัดของท่านลดลงอย่างแน่นอน นอกจากนี้ข้อมูลการศึกษาที่ได้รับจากท่านจะมีประโยชน์สำหรับการพัฒนาแผ่นปิดแผลผสมเซรีซินให้เป็นอย่างอื่นหนึ่งให้กับผู้ป่วยท่านอื่นที่มีความจำเป็นต้องได้รับการรักษาด้วยการปลูกถ่ายผิวหนังอีกด้วย

### **วิธีการและรูปแบบการรักษาอื่นๆ ที่มีอยู่สำหรับอาสาสมัคร**

ท่านไม่จำเป็นต้องเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้เพื่อประโยชน์ในการรักษาโรคที่ท่านเป็นอยู่ เนื่องจากมีแนวทางการรักษาอื่น ๆ หลายแบบสำหรับรักษาโรคของท่านได้ ดังนั้นท่านสามารถปรึกษาแนวทางการรักษาวิธีอื่นๆ กับแพทย์ผู้ให้การรักษาท่านก่อนตัดสินใจเข้าร่วมในการวิจัย

### **อันตรายที่อาจเกิดขึ้นจากการเข้าร่วมในโครงการวิจัยและความรับผิดชอบของผู้ทำวิจัย**

หากพบอันตรายที่เกิดขึ้นจากการวิจัย ท่านจะได้รับการรักษาที่เหมาะสมทันที หากพิสูจน์ได้ว่าท่านปฏิบัติตามคำแนะนำของทีมผู้ทำวิจัยแล้ว ผู้ทำวิจัย/ผู้สนับสนุนการวิจัยยินดีจะรับผิดชอบค่าใช้จ่ายในการรักษาพยาบาลของท่าน และการลงนามในเอกสารให้ความยินยอมไม่ได้หมายความว่าท่านได้สละสิทธิ์ทางกฎหมายตามปกติที่ท่านพึงมี

ในกรณีที่ท่านได้รับอันตรายใด ๆ หรือต้องการข้อมูลเพิ่มเติมที่เกี่ยวข้องกับโครงการวิจัย ท่านสามารถติดต่อกับแพทย์ผู้ร่วมในโครงการวิจัยคือ นายแพทย์สุรินทร์นาท เจริญจิตต์ และรองศาสตราจารย์นายแพทย์ อภิชัย อังสพัทธ์ หรือผู้ทำวิจัยคือ เกสัชกรหญิง ทิพวรรณ ศิริเตียรทอง หมายเลขโทรศัพท์ 08-1805-5246 ได้ตลอด 24 ชั่วโมง

### **ค่าใช้จ่ายของท่านในการเข้าร่วมการวิจัย**

ค่าใช้จ่ายที่เกี่ยวข้องกับโครงการวิจัย เช่น ค่าแผ่นปิดบาดแผลและค่าวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ ผู้สนับสนุนการวิจัยจะเป็นผู้รับผิดชอบทั้งหมด ผู้เข้าร่วมการวิจัยไม่มีค่าใช้จ่ายใดๆเพิ่มเติม

ค่าชดเชยจากการที่อาสาสมัครต้องได้รับการตรวจเลือดนอกเหนือจากการตรวจเลือดตามปกติของผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษา รวมถึงหากอาสาสมัครที่เข้าร่วมในโครงการวิจัยต้องเสียเวลาไปโรงพยาบาลนอกเหนือจากเวลานัดเดิมที่แพทย์นัดมาตรวจ โรคตามปกติเพื่อติดตามการหายของบาดแผล อาสาสมัครจะได้รับค่าเดินทางและค่าชดเชยสูญเสียตลอดการวิจัยเท่ากับ 500 บาท

### **การเข้าร่วมและการสิ้นสุดการเข้าร่วมโครงการวิจัย**

การเข้าร่วมโครงการวิจัยครั้งนี้เป็นไปโดยความสมัครใจ หากท่านไม่สมัครใจจะเข้าร่วมการศึกษาแล้วท่านสามารถถอนตัวได้ตลอดเวลา การขอถอนตัวจากโครงการวิจัยจะไม่มีผลต่อการดูแลโรคของท่านแต่อย่างใด แพทย์ผู้ทำวิจัยอาจถอนท่านออกจากการเข้าร่วมการวิจัย เพื่อเหตุผลด้านความปลอดภัยของท่านหรือ เมื่อผู้สนับสนุนการวิจัยยุติการดำเนินงานวิจัย หรือในกรณีดังต่อไปนี้

- ท่านไม่ให้ความร่วมมือและไม่ปฏิบัติตามคำแนะนำของแพทย์ผู้ทำวิจัย
- ท่านรับประทานยาหรือใช้แผนปิดแผลชนิดอื่นที่ไม่อนุญาตให้ใช้ในการวิจัย
- ท่านตั้งครุภะระหว่างที่เข้าร่วมโครงการวิจัย
- ท่านต้องการปรับเปลี่ยนการรักษาด้วยยาหรือแผนปิดแผลตัวที่ไม่ได้รับอนุญาตจากการวิจัยครั้งนี้

### **การปกป้องรักษาข้อมูลความลับของอาสาสมัคร**

ข้อมูลนี้อาจนำไปสู่การเปิดเผยตัวท่าน จะได้รับการปกปิดและจะไม่เปิดเผยแก่สาธารณชน ในกรณีที่ผลการวิจัยได้รับการตีพิมพ์ ชื่อและที่อยู่ของท่านจะต้องได้รับการปกปิดอยู่เสมอ จากการลงนามยินยอมของท่าน ผู้ทำวิจัย และผู้สนับสนุนการวิจัยสามารถเข้าไปตรวจสอบบันทึกข้อมูลทางการแพทย์ของท่านได้แม้จะสิ้นสุดโครงการวิจัยแล้วก็ตาม หากท่านต้องการยกเลิกการให้สิทธิ์ดังกล่าว ท่านสามารถแจ้ง หรือเขียนบันทึกขอยกเลิกการให้คำยินยอม โดยส่งไปที่ หน่วยศัลยกรรมตกแต่งและเสริมสร้าง โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ถนนพระราม 4 ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

หากท่านขอยกเลิกการให้คำยินยอมหลังจากที่ท่านได้เข้าร่วมโครงการวิจัยแล้ว ข้อมูลส่วนตัวของท่านจะไม่ถูกบันทึกเพิ่มเติม อย่างไรก็ตามข้อมูลอื่น ๆ ของท่านอาจถูกนำมาใช้เพื่อประเมินผลการวิจัย และท่านจะไม่สามารถกลับมาเข้าร่วมในโครงการนี้ได้อีก ทั้งนี้เนื่องจากข้อมูลของท่านที่จำเป็นสำหรับใช้เพื่อการวิจัยไม่ได้ถูกบันทึก

### **สิทธิ์ของผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย**

ในฐานะที่ท่านเป็นผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย ท่านจะมีสิทธิ์ดังต่อไปนี้

1. ท่านจะได้รับทราบถึงลักษณะและวัตถุประสงค์ของการวิจัยในครั้งนี้
2. ท่านจะได้รับการอธิบายเกี่ยวกับระเบียบวิธีการของการวิจัยทางการแพทย์ รวมทั้งยาและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้
3. ท่านจะได้รับการอธิบายถึงความเสี่ยงและความไม่สบายที่จะได้รับจากการวิจัย
4. ท่านจะได้รับการอธิบายถึงประโยชน์ที่ท่านอาจจะได้รับจากการวิจัย
5. ท่านจะได้รับการเปิดเผยถึงทางเลือกในการรักษาด้วยวิธีอื่น ยา หรืออุปกรณ์ซึ่งมีผลดีต่อท่านรวมทั้งประโยชน์และความเสี่ยงที่ท่านอาจได้รับ
6. ท่านจะมีโอกาสได้ซักถามเกี่ยวกับงานวิจัยหรือขั้นตอนที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย
7. ท่านจะได้รับทราบแนวทางในการรักษา ในกรณีที่พบโรคแทรกซ้อนภายหลังการเข้าร่วมในโครงการวิจัย
8. ท่านจะได้รับทราบว่าการยินยอมเข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้ ท่านสามารถขอถอนตัวจากโครงการเมื่อไรก็ได้ โดยผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัยสามารถขอถอนตัวจากโครงการโดยไม่ได้รับผลกระทบใด ๆ ทั้งสิ้น
9. ท่านจะได้รับสำเนาเอกสารใบยินยอมที่มีทั้งลายเซ็นและวันที่
10. ท่านจะได้โอกาสในการตัดสินใจว่าจะเข้าร่วมในโครงการวิจัยหรือไม่ก็ได้ โดยปราศจากการใช้อิทธิพลบังคับข่มขู่ หรือการหลอกลวง

หากท่านไม่ได้รับการชดเชยอันควรต่อการบาดเจ็บหรือเจ็บป่วยที่เกิดขึ้นโดยตรงจากการวิจัย หรือท่านไม่ได้รับการปฏิบัติตามที่ปรากฏในเอกสารข้อมูลคำอธิบายสำหรับผู้เข้าร่วมในการวิจัย ท่านสามารถร้องเรียนได้ที่ คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ตึกอำนวยการชั้น 3 โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ถนนพระราม 4 ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330 โทร 0-2256-4455 ต่อ 14, 15 ในเวลาราชการ

ขอขอบคุณในการร่วมมือของท่านมา ณ ที่นี้

### เอกสารแสดงความยินยอมเข้าร่วมในโครงการวิจัย

การวิจัยเรื่อง ประสิทธิภาพทางคลินิกของแผ่นปิดแผลผสมเซริซินจากไหมในการรักษาบาดแผลจากการปลูกถ่ายผิวหนังที่มีหนังแท้เหลืออยู่บางส่วน

วันให้คำยินยอม วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

ข้าพเจ้า นาย/นาง/นางสาว.....

ที่อยู่.....

ได้อ่านรายละเอียดจากเอกสารข้อมูลสำหรับผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยวิจัยที่แนบมาฉบับวันที่..... และข้าพเจ้ายินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัยโดยสมัครใจ

ข้าพเจ้าได้รับสำเนาเอกสารแสดงความยินยอมเข้าร่วมในโครงการวิจัยที่ข้าพเจ้าได้ลงนาม และ วันที่ พร้อมด้วยเอกสารข้อมูลสำหรับผู้เข้าร่วมโครงการวิจัย ทั้งนี้ก่อนที่จะลงนามในใบยินยอมให้ทำการวิจัยนี้ ข้าพเจ้าได้รับการอธิบายจากผู้วิจัยถึงวัตถุประสงค์ของการวิจัย ระยะเวลาของการทำวิจัย วิธีการวิจัย อันตราย หรืออาการที่อาจเกิดขึ้นจากการวิจัย หรือจากยาที่ใช้ รวมทั้งประโยชน์ที่จะเกิดขึ้นจากการวิจัย และแนวทางรักษาโดยวิธีอื่นอย่างละเอียด ข้าพเจ้ามีเวลาและโอกาสเพียงพอในการซักถามข้อสงสัยจนมีความเข้าใจอย่างดีแล้ว โดยผู้วิจัยได้ตอบคำถามต่าง ๆ ด้วยความเต็มใจไม่ปิดบังซ่อนเร้นจนข้าพเจ้าพอใจ

ข้าพเจ้ารับทราบจากผู้วิจัยว่าหากเกิดอันตรายใด ๆ จากการวิจัยดังกล่าว ผู้เข้าร่วมวิจัยจะได้รับการรักษาพยาบาลโดยไม่เสียค่าใช้จ่าย หากพบอันตรายที่เกิดขึ้นจากการวิจัยและพิสูจน์ได้ว่าท่านปฏิบัติตามคำแนะนำของทีมผู้ทำวิจัยแล้ว ผู้สนับสนุนโครง การวิจัยยินดีจะรับผิดชอบต่อค่าใช้จ่ายในการรักษาพยาบาลของท่าน

ข้าพเจ้ามีสิทธิที่จะบอกเลิกเข้าร่วมในโครงการวิจัยเมื่อใดก็ได้ โดยไม่จำเป็นต้องแจ้งเหตุผล และการบอกเลิกการเข้าร่วมการวิจัยนี้ จะไม่มีผลต่อการรักษาโรคหรือสิทธิอื่น ๆ ที่ข้าพเจ้าจะพึงได้รับต่อไป

ผู้วิจัยรับรองว่าจะเก็บข้อมูลส่วนตัวของข้าพเจ้าเป็นความลับ และจะเปิดเผยได้เฉพาะเมื่อได้รับการยินยอมจากข้าพเจ้าเท่านั้น บุคคลอื่นในนามของบริษัทผู้สนับสนุนการวิจัย คณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในคน สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาอาจได้รับอนุญาตให้เข้ามาตรวจและประมวลข้อมูลของผู้เข้าร่วมวิจัย ทั้งนี้จะต้องกระทำไปเพื่อวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของข้อมูลเท่านั้น โดยการตกลงที่จะเข้าร่วมการศึกษานี้ข้าพเจ้าได้ให้คำยินยอมที่จะให้มีการตรวจสอบข้อมูลประวัติทางการแพทย์ของผู้เข้าร่วมวิจัยได้



ผู้วิจัยรับรองว่าจะไม่มีการเก็บข้อมูลใด ๆ ของผู้เข้าร่วมวิจัย เพิ่มเติม หลังจากที่ข้าพเจ้าขอยกเลิกการเข้าร่วมโครงการวิจัยและต้องการให้ทำลายเอกสารและ/หรือ ตัวอย่างที่ใช้ตรวจสอบทั้งหมดที่สามารถสืบค้นถึงตัวข้าพเจ้าได้

ข้าพเจ้าเข้าใจว่า ข้าพเจ้ามีสิทธิที่จะตรวจสอบหรือแก้ไขข้อมูลส่วนตัวของข้าพเจ้าและสามารถยกเลิกการให้สิทธิในการใช้ข้อมูลส่วนตัวของข้าพเจ้าได้ โดยต้องแจ้งให้ผู้วิจัยรับทราบ

ข้าพเจ้าได้ตระหนักว่าข้อมูลในการวิจัยรวมถึงข้อมูลทางการแพทย์ของข้าพเจ้าที่ไม่มีการเปิดเผยชื่อ จะผ่านกระบวนการต่าง ๆ เช่น การเก็บข้อมูล การบันทึกข้อมูลในแบบบันทึกและในคอมพิวเตอร์ การตรวจสอบ การวิเคราะห์ และการรายงานข้อมูลเพื่อวัตถุประสงค์ทางวิชาการ รวมทั้งการใช้ข้อมูลทางการแพทย์ในอนาคตหรือการวิจัยทางด้านเภสัชภัณฑ์ เท่านั้น

ข้าพเจ้าได้อ่านข้อความข้างต้นและมีความเข้าใจดีทุกประการแล้ว ยินดีเข้าร่วมในการวิจัยด้วยความเต็มใจ จึงได้ลงนามในเอกสารแสดงความยินยอมนี้

.....ลงนามผู้ให้ความยินยอม  
(.....) ชื่อผู้ยินยอมตัวบรรจง  
วันที่ .....เดือน.....พ.ศ.....

ข้าพเจ้าได้อธิบายถึงวัตถุประสงค์ของการวิจัย วิธีการวิจัย อันตราย หรืออาการไม่พึงประสงค์หรือความเสี่ยงที่อาจเกิดขึ้นจากการวิจัย หรือจากยาที่ใช้ รวมทั้งประโยชน์ที่จะเกิดขึ้นจากการวิจัยอย่างละเอียด ให้ผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัยตามนามข้างต้นได้ทราบและมีความเข้าใจดีแล้ว พร้อมลงนามลงในเอกสารแสดงความยินยอมด้วยความเต็มใจ

.....ลงนามผู้ทำวิจัย  
(.....) ชื่อผู้ทำวิจัย ตัวบรรจง  
วันที่ .....เดือน.....พ.ศ.....

.....ลงนามพยาน  
(.....) ชื่อพยาน ตัวบรรจง  
วันที่ .....เดือน.....พ.ศ.....

## Appendix F

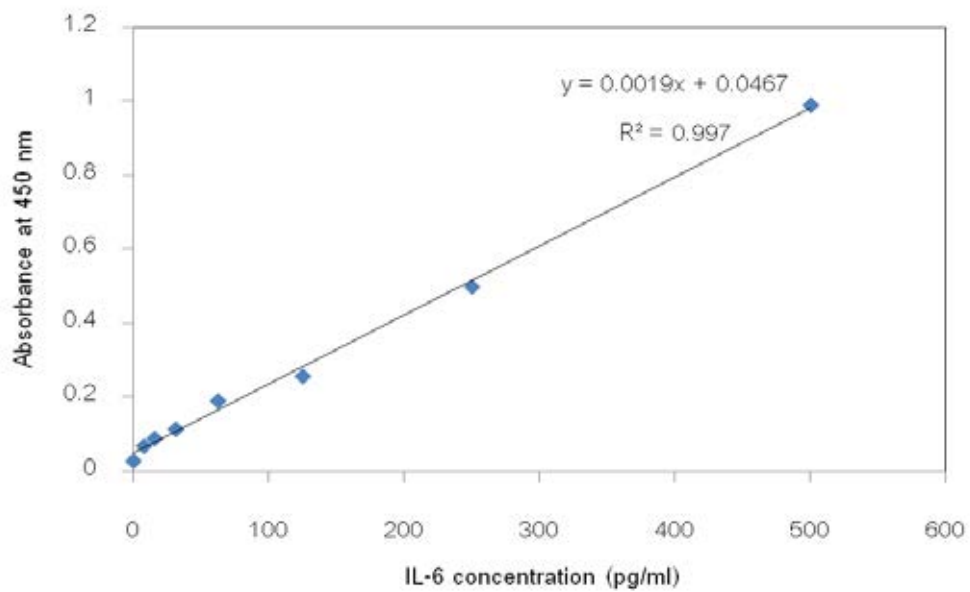
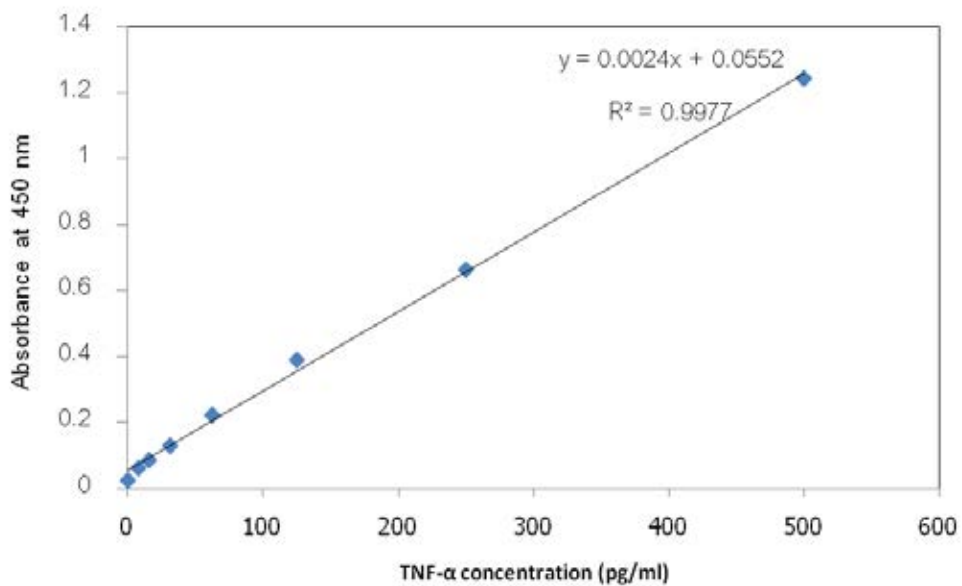
Standard curve of ELISA for IL-6, TNF- $\alpha$  concentration

Figure 5. Standard curve of ELISA for IL-6 concentration

Figure 6. Standard curve of ELISA for TNF- $\alpha$  concentration

## VITA

Ms.Tippawan Siritientong was born on January 4, 1986 in Bangkok, Thailand. She graduated with Bachelor degree (1<sup>st</sup> class honor) from the Department of Pharmaceutics, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, Thailand in 2008. She received a Royal Golden Jubilee Ph.D. Scholarship awarded by the Thailand Research Fund under the Office of the Prime Minister, the Royal Thai Government during 2009-2013 (Grant no. PHD/0115/2551) under the supervision of Associate Professor Pornanong Aramwit, Pharm.D., Ph.D. Her current position is a lecturer in Department of Food and Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, Thailand. Her researches have been published in the international journals for 8 publications as following;

1. Siritientong T., Angspatt A., Ratanavaraporn J., Aramwit P. Clinical potential of a silk sericin-releasing bioactive wound dressing for the treatment of split-thickness skin graft donor sites. Pharmaceutical Research: In Press, Corrected Proof.
2. Aramwit P., Siritientong T, Srichana T., Ratanavaraporn J. Accelerated Healing of Full-Thickness Wounds by Genipin-Crosslinked Silk Sericin/PVA Scaffolds. Cells Tissues Organs 2013;197(3):224–238
3. Siritientong T., Ratanavaraporn J., Aramwit P., Development of ethyl alcohol-precipitated silk sericin/polyvinyl alcohol scaffolds for accelerated healing of full-thickness wounds, International Journal of Pharmaceutics 2012; 439(1-2):175-86.
4. Aramwit P., Keongamaroon O., Siritientong T., Bang N., and Ouppatham Supasyng. Sericin cream reduces pruritus in hemodialysis patients: a randomized, double-blind, placebo-controlled experimental study. BMC Nephrology 2012; 13: 119.
5. Siritientong T. and Aramwit P. A novel silk sericin/poly(vinyl alcohol) composite film crosslinked with genipin: fabrication and characterization for tissue engineering applications. Advanced Materials Research 2012; 506: 359-62.
6. Siritientong T., Srichana T., and Aramwit P. The effect of sterilization methods on the physical properties of silk sericin scaffolds. AAPS PharmSciTech 2011; 12(2):771-81.
7. Aramwit P., Siritientong T., Srichana T. Potential applications of silk sericin, a natural protein from textile industry by-products. Waste Management and Research 2011; 30(3)217-224.
8. Aramwit P., Siritientong T., Kanokpanont S., and Srichana T. Formulation and characterization of silk sericin-PVA scaffold crosslinked with genipin. International Journal of Biological Macromolecules 2010; 47(5):668-75.