



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ: การทดสอบความเป็นพิษและประสิทธิภาพผลการเร่งการฟื้นตัวของบาดแผลของเจลไฟโบรอินในสัตว์ทดลอง (Toxicity testing and wound healing efficacy of fibroin gel in animal model)

โดย

ผศ.ดร. ณัฏฐิณี แซ่ลิ้ม และคณะ

31 กรกฎาคม 2555

สัญญาเลขที่ R2554B053

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ: การทดสอบความเป็นพิษและประสิทธิภาพผลการเร่งการฟื้นตัวของบาดแผลของเจลไฟโบรอินในสัตว์ทดลอง (Toxicity testing and wound healing efficacy of fibroin gel in animal model)

คณะผู้วิจัย

1. ผศ.ดร. ณัฏฐิณี แซ่ลิ้ม
ภาควิชาเภสัชกรรมปฏิบัติ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
2. นาย นิคม นาคสุพรรณ
นิสิตหลักสูตรวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต สาขาเภสัชศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
3. ดร. พรนรินทร์ เทพวราพฤกษ์
ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
4. ผศ.ดร. นิวัติ เทพวราพฤกษ์
ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

สนับสนุนโดยงบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยนเรศวร

Abstract

The primary objective of this study is to demonstrate the efficacy of purified silk protein-fibroin gel preparation on wound healing effect and its toxicity in animal model.

It's been known that silk protein-fibroin offers special properties in animal and clinical uses, namely non-allergy, tissue compatibility, bio-degradability, and safety profile. Recently, some studies suggested that fibroin may contain ability to help wound healing by increasing rate and amount of proliferating cells, inhibiting free radicals, and protecting cell from apoptosis. These evidences, however, were from in-vitro models. Together with our previous findings, fibroin from difference sources generated different physical, chemical, and biological results. Therefore, we developed our own process to purified fibroin from Thai yellow silk cocoon. Our silk fibroin contains high quality, molecular weight homogeneity, water solubility, heat and wide pH ranges tolerability. This in-house fibroin showed significant increase in cell proliferation on both cultured primary fibroblasts and keratinocytes, and promoted wound healing in *ex-vivo* porcine skin wound healing model.

In this experiment, 38 male Sprague-Dawley rats with 200-250g in weight were used. Animal were randomly assigned by numbers preset for operating dates, wound treatment patterns, and wound harvesting dates. Animals were kept in individual cage in temperature-controlled room (25 ± 2 °C), 12 hours dark-light cycles. Food and water were provided ad lib (the protocol was approved by Naresuan University Animal Ethics Committee). Wounding procedure, in brief, animals were anesthetized by 40 mg/kg Nembutal ip and given antibiotic 50mg/kg ampicillin ip, hair at the back of the animals were removed by electric clipper and surgical blade, proposed wound positions were marked using a guiding grid, four full thickness wounds (two wounds/ side) were made using a biopsy punch (0.6 cm Ø) with 1 cm apart from each other and 0.5 cm away from animal vertebral line. Afterwards, four wound treatment preparations, fibroin 1% gel in PBS, fibroin 2.5% gel in PBS, PBS (control), and carboxy methyl cellulose (CMC) 1% gel in PBS (control for occlusion effect) were applied onto designated wounds at 20µl/wound. All wounds in each animal were secured with elastic Tegaderm™ film (3M™) 6x7 cm to protect leakage of treatment preparations and contaminations. Neck ring was then put on to avoid wound scratching and tearing. Wounds were harvested at specified date post wound operation, D1, D3, D5, D7, and D14 (D1, D3, D5, D7 N=8, only D14 N=6). Animals were euthanized, and each wound was inspected, photographed, and measured before wounds harvesting and storage for histology and immunostaining studies. Abnormal signs and symptoms on skin such as allergy, inflammation was closely observed by the experts throughout the study. To evaluate the wound healing effect of treatment groups, histology and expression of specific proteins, Ki67, CK14, CK10, and collagen I of each wound were extensively studied.

General physical observation, all animal were healthy, gaining weight, no stress signs. All wounds showed no signs of infection, allergy, or tissue toxicity event from any received treatment preparations. Histology study revealed no significant difference among treatment groups after 1 day post wounding in term of mean% wound coverage (% re-epithelialization). All groups stayed around 11-13% wound coverage. Three days after operation (D3), wounds treated with fibroin gel 2.5% significantly showed the highest of mean% wound coverage (or %re-epithelialization, %RE) at 70% compared to CMC 1% (49.5%), fibroin gel 1% (47%), และ PBS (42.7%) by ANOVA ($p<0.01$). Complete wound coverage (100 %RE) were clearly observed 3/8 wounds in wounds treated with fibroin gel 2.5% and 1/8 wounds in fibroin gel 1% treatment group. No complete wound coverage was observed in wounds with CMC 1% treated or PBS treated groups. After 5, 7, and 14 days post wounding there were no statistical difference of %wound

coverage in any groups since more wounds started to heal completely, and were completely healed by 14 days.

The expression patterns of basic protein markers in skin cells used in this study to help evaluation of abnormal healing process were Ki67 (indicating cell proliferation), CK1/10 (indicating differentiated keratinocytes), CK14 (indicating un-differentiated keratinocytes), and collagen I (matrix protein). The immunostaining study clearly showed all wounds in all groups were healed normally in the same patterns.

In conclusion, this study clearly demonstrated that fibroin gel treatment (single dose) accelerated wound healing in animal model by increasing wound epithelial migration. Wounds treated with fibroin gel 2.5% provided a better wound healing result than wounds with fibroin gel 1%. The maximal efficacy could be observed after 3 days. Both concentration preparations used in this study contained no cell or tissue toxicity, or inhibited wound healing process. The results were further confirm the healing effect of silk protein fibroin previously reported in primary cell lines and in ex-vivo porcine skin wound healing models. The next step we will move to clinical trial level.

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์หลักของโครงการนี้ จะมุ่งเน้นศึกษาศึกษาความเป็นพิษต่อผิวหนัง และประสิทธิภาพผลการเร่งการฟื้นตัวของบาดแผลของสารสกัดโปรตีนจากโรงไหม fibroin ในรูปแบบยาเตรียมแบบเจลในสัตว์ทดลอง (Sprague-Dawley rat) และมีการวางแผนของโครงการในอนาคตที่คณะผู้วิจัยตั้งเป้าที่จะพัฒนาสูตรตำรับเพื่อพัฒนาเป็นยาช่วยเร่งการฟื้นตัวของบาดแผลในมนุษย์ต่อไป

ซึ่งทราบเป็นเวลายาวนานแล้วว่า โปรตีน fibroin มีคุณสมบัติเข้ากันได้ดีกับร่างกาย ไม่ก่อให้เกิดการแพ้ และสามารถย่อยสลายได้ในร่างกาย มีความปลอดภัยสูง ตลอดจนมีรายงานหลายชิ้นระบุผลของสารสกัดโปรตีน fibroin อาจเสริมสร้างหรือเร่งกระบวนการฟื้นตัวของบาดแผล โดยสามารถช่วยเร่งการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนของเซลล์ มีฤทธิ์ยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระ และป้องกันการตายของเซลล์จากการขาดซีสรีม แต่ส่วนใหญ่ของรายงานจะเป็นการทดลองใน *in-vitro* model นอกจากนั้นพบว่าผลิตภัณฑ์ fibroin ที่นำมาทดสอบจากโรงไหมต่างชนิดกัน แหล่งผลิตที่ต่างกัน จะมีคุณลักษณะที่มีแตกต่างกันมากทั้งด้านกายภาพและเคมี ตลอดจนประสิทธิภาพการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ทีมผู้วิจัยจึงได้พัฒนาคิดค้นวิธีการสกัดโปรตีนไหม fibroin จากโรงไหมสีเหลืองของไทย และทำการพิสูจน์คุณลักษณะของผลิตภัณฑ์ ซึ่งทีมผู้วิจัยประสบความสำเร็จในการแยกสกัดโปรตีน fibroin จากโรงไหมเหลืองพันธุ์ไทยได้สำเร็จ โดยได้สารสกัดโปรตีนที่มีคุณภาพสูง ขนาดของโมเลกุลค่อนข้างคงที่ มีการละลายได้ดีที่ pH ต่างๆ และทนความร้อนดี ผู้วิจัยได้นำโปรตีน fibroin ที่แยกสกัดนี้มาทดสอบกับ cell lines (*in-vitro* model) และ กับโมเดลผิวหนังสุกรที่เพาะเลี้ยงที่พัฒนามาทดสอบผลต่อการฟื้นตัวของบาดแผล (*ex-vivo* porcine skin wound healing model) ซึ่งโมเดลนี้พัฒนาขึ้นโดยทีมวิจัยเช่นกัน ผลการทดลองสนับสนุนว่า fibroin สามารถเร่งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ และเร่งการฟื้นตัวของบาดแผลดีกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ

การทดลองใช้สัตว์ทดลอง หนูแรท ตัวผู้ น้ำหนักตัว 200-250 กรัม โดยสัตว์ทดลองแต่ละตัวจะถูกสุ่มให้หมายเลขเพื่อสะดวกในการกำหนดวันการทำบาดแผลและการเก็บบาดแผล ตลอดจนระบุการใช้สารทดสอบในตำแหน่งแต่ละตำแหน่งของบาดแผล สัตว์ทดลองจะถูกเลี้ยงในกรง 1 ตัวต่อกรง ภายในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส และมีแสงสว่าง 12 ชั่วโมงสลับความมืด 12 ชั่วโมง มีการให้อาหารและน้ำอย่างบริบูรณ์ (โครงการนี้ผ่านการเห็นชอบจากคณะกรรมการจริยธรรมการใช้สัตว์ทดลอง มหาวิทยาลัยนเรศวรเป็นที่เรียบร้อยแล้ว) ในขั้นตอนการทำบาดแผล สัตว์ทดลองจะถูกวางยาสลบด้วย Nembutal ในขนาด 40 mg/kg และ ampicillin 50mg/kg เข้าช่องท้อง จากนั้นขนบนหลังสัตว์จะถูกโกนและฆ่าเชื้อโรค กำหนดจุดที่จะทำการผ่าตัดเอาส่วนผิวหนังชั้น epidermis และ dermis ออก ซึ่งตำแหน่งที่กำหนดจะขนานตามแนวกระดูกสันหลังระหว่างขาหน้าและขาหลัง โดยใช้ guiding grid เป็นตัวช่วยกำหนดตำแหน่ง ทำการเจาะบาดแผลโดยใช้ biopsy punch จำนวน 4 บาดแผล (ข้างละ 2 บาดแผล) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.6 cm. บาดแผลห่างจากกัน 1 cm และห่างจากแนวกระดูกสันหลัง 0.5 cm. กลุ่มการทดลองมี 4 กลุ่มคือ 1. ยาเตรียมสารสกัดโรงไหม fibroin ในรูปแบบเจลที่มีความเข้มข้นของ fibroin 1% gel in PBS, 2. ยาเตรียมสารสกัดโรงไหม fibroin ในรูปแบบเจลที่มีความเข้มข้นของ fibroin 2.5% gel in PBS, 3. PBS (กลุ่มควบคุม), และ 4. carboxy methyl cellulose (CMC) 1% gel in PBS (control for occlusion effect) โดยจะใส่สารทดสอบแต่ละชนิด จำนวน 20 μ l ในบาดแผลตามตำแหน่งของสัตว์ทดลองแต่ละตัวตามการสุ่ม สัตว์ทดลองข้างต้น (D1, D3, D5, D7 ชุดละ 8 ตัว ยกเว้น D14 มีจำนวน 6 ตัว) หลังผ่าตัดบาดแผลของสัตว์ทดลองจะถูกปิดด้วย TegadermTM film (3MTM) ขนาด 6x7 cm. เพื่อป้องกันการไหลออกของสารทดสอบและป้องกันบาดแผลจากการติดเชื้อหรือปนเปื้อนวัสดุรองนอน และใส่ปลอกคอสัตว์ทดลองเพื่อป้องกันการกัดแทะหรือเลียบาดแผล ผ่าตัดเก็บบาดแผล ในวันที่ 1 (D1), 3 (D3), 5 (D5), 7 (D7), และ 14 (D14) วันหลังทำบาดแผล โดยก่อนการผ่าตัดจะมีการประเมินลักษณะบาดแผล และการฟื้นตัวของบาดแผลก่อน โดยทั้งการถ่ายรูปบาดแผล การวัดขนาดของบาดแผลที่ลดลง และการสังเกตอื่นๆ ประเมินผลการเกิดพิษที่เกิดกับผิวหนัง เช่น การอักเสบ การแพ้ เป็นต้น (โดยผู้เชี่ยวชาญด้านสัตว์ทดลอง) ตรวจสอบทาง histology ของบาดแผลทุกชิ้นเพื่อประเมินผลการฟื้นตัวของบาดแผล และทำการตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนต่างๆที่เกี่ยวข้องกับการฟื้นตัวของบาดแผล Ki67, CK14, CK10, และ collagen I สัตว์ทดลองจะถูกทำให้สิ้นชีวิตอย่างสงบและรวดเร็วโดยใช้ guillotine

ผลทางกายภาพตรวจสอบทางกายภาพ สัตว์ทดลองมีสุขภาพแข็งแรงดี น้ำหนักตัวเพิ่มขึ้น ไม่มีการแสดงถึงอาการเครียด สภาพโดยทั่วไปของบาดแผลที่ทำไว้บนหลังสัตว์ทดลอง พบว่าไม่มีการติดเชื้อ ไม่มีข้อบ่งชี้การแพ้หรือความเป็นพิษของสารทดสอบ และสัตว์ทดลองมีการฟื้นตัวของบาดแผลที่เป็นปกติ ทุกบาดแผลบนสัตว์ทดลองทุกตัวจะมีการสมานตัวที่หายสนิท

ภายใน 14 วัน ผลจากการศึกษาทาง histology ของบาดแผลบนหลังสัตว์ทดลอง 1, 3, 5, 7, 14 วัน ภายหลังจากการทำบาดแผลและการให้สารทดสอบโดยการวิเคราะห์การเคลื่อนที่ของ epidermal migration (EM) ในรูป %RE (% re-epithelialization) หรือ % wound coverage พบว่า %RE มีความแตกต่างอย่างเห็นได้ชัดในบาดแผลบนหลังสัตว์ทดลอง 3 วันภายหลังจากการทำบาดแผล โดยกลุ่มบาดแผลที่ได้รับสารทดสอบ fibroin gel 2.5% (70%), จะมี %RE สูงกว่ากลุ่มบาดแผลที่ได้รับสารทดสอบอื่นๆ CMC 1% (49.5%), fibroin gel 1% (47%), และ PBS (42.7%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ANOVA, $p < 0.01$) และเมื่อเทียบผลระหว่างกลุ่มบาดแผลที่ได้รับสารทดสอบ fibroin gel 2.5% กับ fibroin gel 1% กลุ่มบาดแผลที่ได้รับสารทดสอบ fibroin gel 2.5% จะให้ผล %RE ที่สูงที่นัยสำคัญเช่นกัน (ANOVA, $p < 0.05$) นอกจากนี้ในกลุ่มบาดแผลที่ได้รับสารทดสอบ fibroin gel 2.5% จะมีบาดแผลที่เกิดการ re-epithelialization อย่างสมบูรณ์ (complete wound coverage) อยู่ถึง 3 บาดแผลใน 8 บาดแผลของกลุ่ม ในขณะที่กลุ่มบาดแผลที่ได้รับสารทดสอบ fibroin gel 1% มีบาดแผลที่เกิด complete healing เพียง 1 บาดแผลใน 8 บาดแผลของกลุ่มเท่านั้น และในกลุ่ม CMC 1% และ PBS ไม่มีบาดแผลใดเกิด complete wound coverage เลย ส่วนค่า %RE ในบาดแผลบนหลังสัตว์ทดลอง 5, 7, และ 14 วัน ภายหลังจากการทำบาดแผลจะไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มบาดแผลที่ได้รับสารทดสอบทั้ง 4 กลุ่ม โดยบาดแผลในแต่ละกลุ่มจะมี complete wound coverage มากขึ้น และมี complete healing ในเวลา 14 วัน

ในการศึกษาทาง Immunostaining เพื่อประเมินผลการแสดงออกของโปรตีนพื้นฐานของผิวหนัง เช่นโปรตีน Ki67 (บ่งชี้สภาวะ cell proliferation) โปรตีน CK1/10 (บ่งชี้สภาวะ differentiated keratinocytes) โปรตีน CK14 (บ่งชี้สภาวะ un-differentiated keratinocytes) และโปรตีน collagen I (matrix protein) พบว่าบาดแผลทุกกลุ่มมีการแสดงออกของโปรตีนพื้นฐานของผิวหนังที่เป็นปกติของการฟื้นตัวของบาดแผล และไม่มี ความแตกต่างกันระหว่างกลุ่มการทดลอง

สรุปโดยย่อ จากผลการทดลองนี้สามารถระบุได้ว่า fibroin gel เพียงครั้งเดียว มีผลช่วยเร่งการฟื้นตัวของบาดแผลในสัตว์ทดลองให้เกิดได้เร็วขึ้น โดย fibroin gel 2.5% จะให้ผลดีกว่า fibroin gel ที่ 1% โดยประสิทธิภาพจะสูงสุดประมาณวันที่ 3 ภายหลังจากการเกิดบาดแผล และพบว่า fibroin gel ทั้ง 2 ความเข้มข้นไม่ก่อให้เกิดพิษต่อเซลล์ หรือขัดขวางกระบวนการฟื้นตัวของบาดแผล ซึ่งเป็นการยืนยันผลในทิศทางเดียวกันกับผลการทดลองของโปรตีน fibroin ของทีมผู้วิจัยใน cell lines และ ex-vivo porcine skin wound healing models ซึ่งสามารถนำผลการวิจัยของโครงการนี้ไปสู่การทดลองทางคลินิกต่อไป

Executive Summary

โครงการ”การทดสอบความเป็นพิษต่อผิวหนัง และประสิทธิภาพผลการเร่งการฟื้นตัวของบาดแผลของสารสกัดโปรตีนจากรังไหม fibroin ในรูปแบบยาเตรียมแบบเจล (gel) ในสัตว์ทดลอง (*in-vivo* animal model)” นี้ได้รับการสนับสนุนทุนการทำวิจัยจากงบประมาณแผ่นดินประจำปี พ.ศ. 2554 ด้วยเงินทุนสนับสนุน 365,000 บาท โดยมีระยะเวลาการดำเนินการวิจัย 1 ปี วัตถุประสงค์หลักของโครงการนี้ จะมุ่งเน้นศึกษาศึกษาความเป็นพิษต่อผิวหนัง และประสิทธิภาพผลการเร่งการฟื้นตัวของบาดแผลของสารสกัดโปรตีนจากรังไหม fibroin ในรูปแบบยาเตรียมแบบเจล (gel) ในสัตว์ทดลอง (*in-vivo* animal model) และมีการวางแผนของโครงการในอนาคตที่คณะผู้วิจัยตั้งเป้าที่จะพัฒนาสูตรตำรับเพื่อพัฒนาเป็นยาช่วยเร่งการฟื้นตัวของบาดแผลในมนุษย์ต่อไป

เนื่องจากในโครงการนี้ได้มีการวางแผนการทดลองที่ละเอียดและเข้มงวด จึงทำให้สามารถหลีกเลี่ยงการใช้สัตว์ทดลองที่มากเกินไปจนเกิดความจำเป็น และสามารถทำการทดลองได้อย่างราบรื่น แต่การดำเนินการวิจัยมีปัญหาจากสาเหตุที่ป้องกันไม่ได้หลายประการเช่น เงินทุนสนับสนุนล่าช้ากว่ากำหนด การทดลองที่ต้องใช้เวลาและความสามารถเฉพาะตัวของผู้ปฏิบัติงานวิจัย การเข้าถึงและคุณภาพของเครื่องมือสำคัญต่อการทำวิจัย ตลอดจนผลการทดลองที่ต้องใช้เวลาในการวิเคราะห์ เป็นต้น อย่างไรก็ตามการดำเนินการโครงการวิจัยนี้ก็สามารถเสร็จสิ้นเป็นที่เรียบร้อยและผลการวิจัยบรรลุวัตถุประสงค์ที่วางไว้

ความสำเร็จของโครงการนี้ ผลการวิจัยได้ถูกนำเสนอผลงานในระดับประเทศเป็นอย่างน้อย และคาดว่าเนื้อหาวิจัยจะตีพิมพ์และนำเสนอในที่ประชุมวิชาการในอนาคต

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณหน่วยงานต่างๆ ที่ให้ความสนับสนุนการวิจัยเป็นอย่างดี เช่น คณะเภสัชศาสตร์ และมหาวิทยาลัยนเรศวร ฐานต้นสังกัด หน่วยปฏิบัติการวิจัย Biotechnology and Molecular Biology Research Unit (BMBR) คณะเภสัชศาสตร์ในเรื่องเครื่องมือและห้องปฏิบัติการวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ผู้สนับสนุนทุนวิจัย และศูนย์ความเป็นเลิศนวัตกรรมทางเคมี (PERCH-CIC) มหาวิทยาลัยมหิดล



ผศ.ดร. ณัฏฐ์ ชาญชัย
(หัวหน้าโครงการวิจัย)

1. บทนำ

บาดแผลบนผิวหนังเกิดขึ้นได้จากหลายสาเหตุ อาทิ จากอุบัติเหตุ จากการผ่าตัด หรือจากโรคบางโรค เช่น โรคเบาหวาน ซึ่งมักเป็นบาดแผลชนิดเรื้อรัง รักษาได้ยากเนื่องจากอัตราการฟื้นตัวของบาดแผลช้า ภาวะการเกิดบาดแผลมีผลต่อการดำรงชีวิตประจำวันและคุณภาพชีวิตของผู้ป่วย ตลอดจนการสูญเสียรายได้ของผู้ป่วย และของรัฐในด้านการให้บริการทางด้านการรักษา

การศึกษากระบวนการฟื้นตัวของบาดแผลของผิวหนังมนุษย์สามารถทำได้หลายวิธี โดยวิธีที่ดีที่สุดคือการศึกษาที่ได้ผลจากการทดลองจากผิวหนังมนุษย์โดยตรง แต่การใช้ผิวหนังมนุษย์ในการทดลองมีความเป็นไปได้ยากเนื่องจาก ปัญหาในการหาแหล่งวัตถุดิบ ข้อขัดแย้งทางศาสนา คณะผู้วิจัยได้ดำเนินการทดลองจนประสบความสำเร็จในการสร้างต้นแบบการทดลองโดยใช้ผิวหนังสุกร (*ex-vivo porcine skin model*) มาเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการเพื่อเป็นต้นแบบในการทำการศึกษาระบบการฟื้นตัวของบาดแผล (อนุสิทธิบัตรเลขที่ 6245 ลงวันที่ 26 พฤษภาคม 2554 “สูตรอาหารและวิธีการเพาะเลี้ยงอวัยวะผิวหนังหมูแบบ *ex-vivo* เพื่อเป็นโมเดลในการศึกษาระบบผิวหนังทั้งในภาวะปกติและมีบาดแผล”) ซึ่งการใช้ผิวหนังสุกรเพื่อการศึกษา มีข้อดีหลายประการ ได้แก่ เป็นการใช่วัตถุดิบที่สามารถจัดหาได้ง่ายภายในประเทศ, สามารถควบคุมคุณภาพให้มีความสม่ำเสมอ, ตลอดจนไม่ต้องมีข้อกังวลในแง่จริยธรรมเกี่ยวกับการใช้มนุษย์ หรือสัตว์ทดลองที่มีชีวิตเพื่อใช้ในการวิจัย

สารสกัดโปรตีนจากรังไหม fibroin และ sericin มีคุณสมบัติเหมาะสมที่จะนำมาเตรียมรูปแบบเจล เนื่องจากมีการเรียงตัวที่เป็นระเบียบ และสายโซ่โมเลกุลของ polypeptides ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง มีลักษณะเหนียวและยึดติดกันด้วยพันธะไฮโดรเจนที่แข็งแรงระหว่างหมู่คาร์บอกซิลและหมู่เอมีโน นอกจากนี้สารสกัดโปรตีนจากรังไหมมีคุณสมบัติเข้ากันได้กับร่างกาย ไม่ก่อให้เกิดการแพ้ และสามารถย่อยสลายได้ในร่างกาย มีความปลอดภัยสูง มีรายงานหลายชิ้นระบุผลของสารสกัดโปรตีนจากรังไหม fibroin และ sericin ที่อาจเสริมสร้างหรือเร่งกระบวนการฟื้นตัวของบาดแผล โดยสามารถช่วยเร่งการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนของเซลล์ (Terada S., et al., 2005) มีฤทธิ์ยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระ (lipid peroxidation and tyrosinase activity inhibition) (Takahashi M., et al., 2003; Takahashi M., et al., 2005) และป้องกันการตายของเซลล์จากการขาดซีรัม (cell death protection by serum deprivation) (Kato N., et al., 1998)

ทีมผู้วิจัยพบว่าผลิตภัณฑ์ fibroin และ sericin ที่นำมาทดสอบ หากผลิตจากรังไหมต่างชนิดกัน แหล่งที่มา หรือผู้ผลิตที่ต่างกัน จะมีคุณลักษณะที่มีแตกต่างกันมากทั้งด้านกายภาพและเคมี ตลอดจนประสิทธิภาพของสารสกัดในแง่การออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เหตุที่ทำให้เกิดความแตกต่างนี้ ไม่เพียงแต่เกิดจากความแตกต่างในกระบวนการผลิตแล้ว ยังน่าจะมีปัจจัยอื่นๆที่อาจมีความเกี่ยวข้องอีกหลายๆปัจจัย เช่น ชนิดของสายพันธุ์ไหม กระบวนการซับซ้อนในการสร้าง mRNA และโปรตีนของ fibroin และ sericin ตลอดจนปัจจัยจากสภาวะแวดล้อมของการเพาะเลี้ยงไหม เป็นต้น ทีมผู้วิจัยจึงได้คิดค้นวิธีการสกัดโปรตีนไหม fibroin และ sericin จากรังไหมสีเหลืองของไทย และทำการพิสูจน์คุณลักษณะของผลิตภัณฑ์ ซึ่งทีมผู้วิจัยประสบความสำเร็จในการแยกสกัดโปรตีน fibroin และ sericin จากรังไหมเหลืองพันธุ์ไทยได้ครบวงจรโดยมิของเสียจากกระบวนการผลิตน้อยมาก และได้สารสกัดโปรตีนที่มีคุณภาพสูง ขนาดของโมเลกุลค่อนข้างคงที่ มีการละลายน้ำและใน buffer ได้ดีที่ pH ต่างๆค่อนข้างกว้าง (pH 5-9) ทนความร้อนดี (อนุสิทธิบัตรเลขที่ 6272 ลงวันที่ 31 พฤษภาคม 2554 “กรรมวิธีการสกัดครบวงจรของสารรงควัตถุสีเหลือง โปรตีนเซอรีซิน และโปรตีนไฟโบรอิน จากรังไหมเหลือง”)

ผู้วิจัยได้นำต้นแบบผิวหนังสุกรที่เพาะเลี้ยงที่พัฒนามาทดสอบผลการฟื้นตัวของบาดแผลของโปรตีนสกัดจากรังไหม fibroin และ sericin ที่แยกสกัดได้ข้างต้น ผลการทดลองพบว่ากลุ่มทดลองที่ได้รับโปรตีนไฟโบรอินให้ผลเร่งการฟื้นตัวของบาดแผลดีกว่ากลุ่ม EGF (epidermal growth factor, positive control) และ PBS (phosphate buffer saline, negative control) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่โปรตีนเซอรีซินให้ผลไม่แตกต่างกับกลุ่ม PBS และส่งผลให้กลุ่มบาดแผลที่ได้รับสารไฟโบรอินเจล เซลล์ผิวหนัง keratinocytes จะสามารถเคลื่อนตัวครอบคลุมบาดแผลได้ทั้งหมดเร็วขึ้นกว่ากลุ่มอื่นๆ (ตารางที่ 1 และ 2)

จากผลของการวิจัยในโมเดลผิวหนังสุกรเพาะเลี้ยงที่พบว่าโปรตีนไหม fibroin มีผลต่อการเร่งการฟื้นตัวของบาดแผล ดังนั้นทีมผู้วิจัยจึงเสนอโครงการต่อเนื่องจากการวิจัยนี้ โดยจะทำการทดสอบความเป็นพิษ (toxicity) ต่อผิวหนัง และประสิทธิภาพผลการเร่งการฟื้นตัวของบาดแผลของสารสกัดโปรตีนจากรังไหมไฟโบรอินในรูปแบบยาเตรียมแบบเจล (gel) ในสัตว์ทดลอง (*in-vivo animal model*) ซึ่งหากได้ผลที่ดีก็จะสามารถขยายการทดลองไปสู่การทดลองในมนุษย์ต่อไปในอนาคต

ซึ่งหากโครงการนี้ประสบความสำเร็จ ก็จะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งยวดต่อผู้ป่วย เนื่องจากสามารถพัฒนาไปเป็นยาช่วยเร่งการฟื้นตัวของบาดแผล ซึ่งจะสามารถลดค่าใช้จ่ายของผู้ป่วยลงอย่างมีนัยสำคัญ ตลอดจนสามารถเพิ่มคุณภาพชีวิตและจิตใจของผู้ป่วย เช่นลดจำนวนครั้งที่ผู้ป่วยต้องไปรับการรักษาที่โรงพยาบาล ลดจำนวนวันที่ผู้ป่วยต้องอยู่โรงพยาบาลเนื่องจากบาดแผลหายเร็วขึ้น ผู้ป่วยสามารถกลับไปใช้ชีวิตปกติได้เร็วขึ้น ในส่วนของโรงพยาบาลเองก็สามารถลดค่าใช้จ่ายและบุคลากรของหน่วยงานลง ยิ่งไปกว่านั้นหากสามารถพัฒนาสารออกฤทธิ์ดังกล่าวไปสู่ระดับอุตสาหกรรม ก็จะเป็นผลประโยชน์ทางเศรษฐกิจของชาติโดยภาพรวม

โครงการนี้ในระยะที่ 1 ผู้วิจัยจะมุ่งเน้นศึกษาศึกษาความเป็นพิษต่อผิวหนัง และประสิทธิภาพผลการเร่งการฟื้นตัวของบาดแผลของสารสกัดโปรตีนจากรังไหม fibroin ในรูปแบบยาเตรียมแบบเจล (gel) ในสัตว์ทดลอง (*in-vivo* animal model) ในระยะที่ 2 ของโครงการ หากพบว่าการศึกษามีผลเชิงบวก คณะผู้วิจัยตั้งเป้าที่จะพัฒนาสูตรตำรับเพื่อพัฒนาเป็นยาช่วยเร่งการฟื้นตัวของบาดแผลในสัตว์ทดลอง และมนุษย์ต่อไป

ตารางที่ 1. แสดงผลเปรียบเทียบผลของ Fibroin, Sericin, EGF, และ PBS ต่อการฟื้นตัวของบาดแผลของโมเดลผิวหนังสุรพะเอี้ยง หลังการเพาะเลี้ยง 1, 2, และ 3 วัน (N = 6 ในแต่ละกลุ่ม)

DAY	PBS		EGF		SN		FN	
	Mean	±SD	Mean	±SD	Mean	±SD	Mean	±SD
1	383.8	52.7	431.9	82.3	394.3	47.6	374.7	52.9
2	996.3	69.1	1156.0	165.9	994.4	157.2	Complete healing	
3	Complete healing		Complete healing		Complete healing		Complete healing	

PBS (Phosphate buffer saline)

EGF (10 ng/mL epidermal growth factor)

SN (1% Sericin gel)

FN (1% Fibroin gel)

Complete healing = การที่เซลล์ keratinocytes ของชั้น Epidermis เคลื่อนตัวปกคลุมบาดแผลทั้งหมด

ตารางที่ 2. แสดงผลเปรียบเทียบผลของ fibroin, sericin, EGF, และ PBS ต่อการเคลื่อนตัวของชั้น epidermis (keratinocyte migration rate) ปกคลุมบาดแผลของโมเดลผิวหนังสุรพะเอี้ยง หลังการเพาะเลี้ยง 2 วัน (N = 6)

$$\text{Migration rate } (\mu\text{m/h}) = \frac{\text{Distance of keratinocyte migration}}{\text{Cultivation time (hour)}}$$

Treatments	Keratinocyte migraton rate (μm/h)
PBS treated-wounds	19.64
EGF treated-wounds	22.04
SN treated-wounds	21.16
FN treated-wounds	31.25

PBS (Phosphate buffer saline) EGF (10 ng/mL epidermal growth factor)

SN (1% Sericin gel)

FN (1% Fibroin gel)

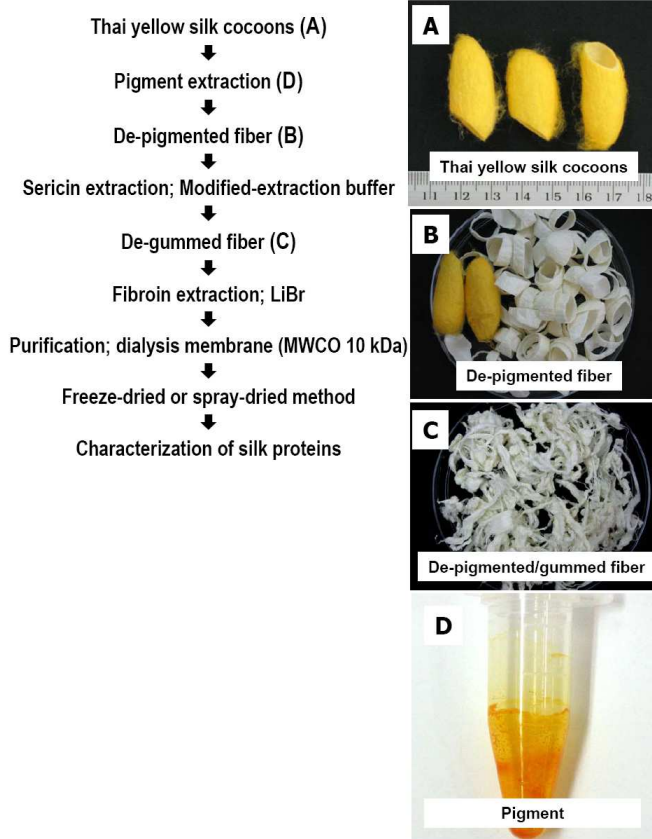
2. การทดลอง

2.1 การเตรียมและผลิตสารสกัดรังไหม fibroin

- การจัดเตรียมผลิตภัณฑ์สารสกัดรังไหม fibroin ดังแสดงในรูปที่ 1 (โดยกรรมวิธีที่ทีมผู้วิจัยคิดค้นขึ้น ซึ่งจะได้สารสกัด fibroin ที่มีความบริสุทธิ์สูง คุณภาพสม่ำเสมอ ปราศจากเชื้อ และไม่มีการปนเปื้อนโลหะหนักหรือเกลือ)
- การเตรียมสารสำหรับการทดลองในแต่ละกลุ่ม โดยวิธี freshly prepared and sterile technique
 - ยาเตรียมสารสกัดรังไหมไฟโบรอินในรูปแบบเจลที่มีความเข้มข้นของไฟโบรอิน 1% in PBS
 - ยาเตรียมสารสกัดรังไหมไฟโบรอินในรูปแบบเจลที่มีความเข้มข้นของไฟโบรอิน 2.5% in PBS
 - PBS เพื่อใช้สำหรับกลุ่มควบคุม
 - ยาเตรียม methyl cellulose 1% in PBS เพื่อใช้สำหรับกลุ่มควบคุม (occlusion effect)

Material & Methods

SECTION 1: EXTRACTION, PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF SILK PROTEINS (IN-HOUSE)

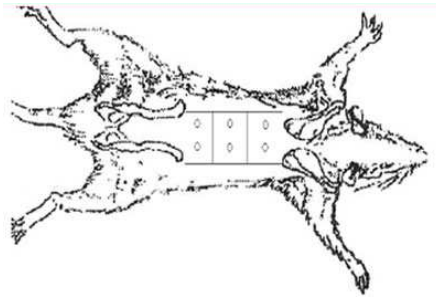


รูปที่1. แสดงขั้นตอนต่างๆโดยย่อในการสกัดและทำให้บริสุทธิ์ของโปรตีน fibroin จากรังไหมไทยสีเหลือง

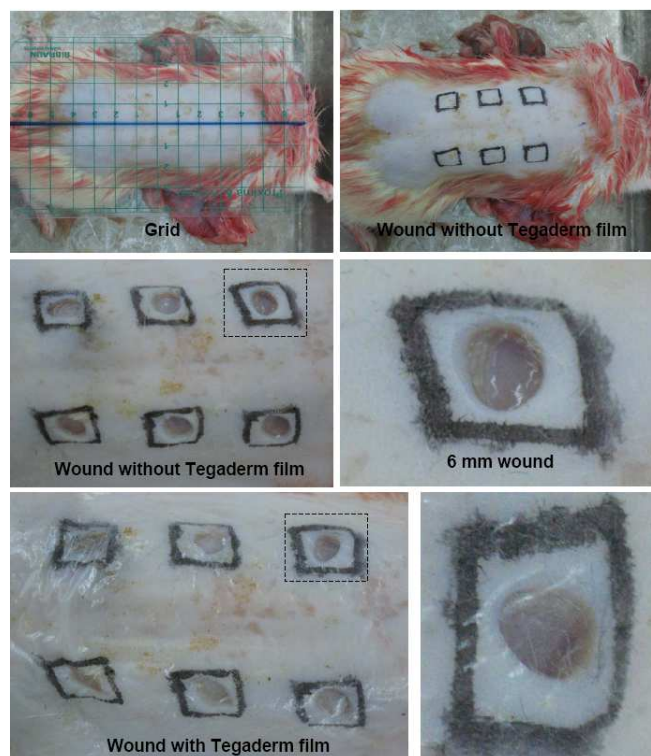
2.2 การทดสอบผลพิษและประสิทธิภาพของ fibroin gel ต่อการฟื้นตัวของผิวหนัง หรือเป็นพิษต่อผิวหนัง สัตว์ทดลอง

ได้ทำการทดลองเบื้องต้น การทดสอบหัตถการ การชักข้อ เพื่อหาข้อมูลเบื้องต้น ปัญหาที่อาจพบ ตลอดจนฝึกการผ่าตัด การชักข้อก่อนการทดลองจริง ดังนี้

- ใช้สัตว์ทดลอง หนู Sprague-Dawley rat ตัวผู้ ขนาดน้ำหนักตัว 200 ถึง 250 กรัม จำนวนละ 2 ตัว
- สัตว์ทดลองจะถูกเลี้ยงในกรงภายในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส และมีแสงสว่าง 12 ชั่วโมงสลับความมืด 12 ชั่วโมง มีการให้อาหารและน้ำอย่างบริบูรณ์ตลอดการทดลอง สัตว์ทดลองจะถูกเลี้ยงให้เคยชินกับสถานที่ก่อนทำการทดลองอย่างน้อย 1 สัปดาห์
- ทำ full thickness wound model กับสัตว์ทดลอง โดยที่สัตว์ทดลองจะถูกวางยาสลบโดยการฉีดยาสลบ Nembutal ในขนาด 50 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักสัตว์ 1 กิโลกรัม เข้าช่องท้อง (intra-peritoneal) ขนบนหลังสัตว์จะถูกโกนและฆ่าเชื้อโรคโดยใช้ 70% ethanol และ betadine ทำการผ่าตัดเอาส่วนผิวหนังรวมชั้น epidermis และ dermis ออก (ความลึกถึงชั้น panniculus carnosus) จำนวน 6 บาดแผล ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.6 เซนติเมตร (รูปที่ 2)
- ปะทับบาดแผลทั้งหมดด้วยแผ่นฟิล์ม Tegaderm (3M) ขนาด 6x7 cm.



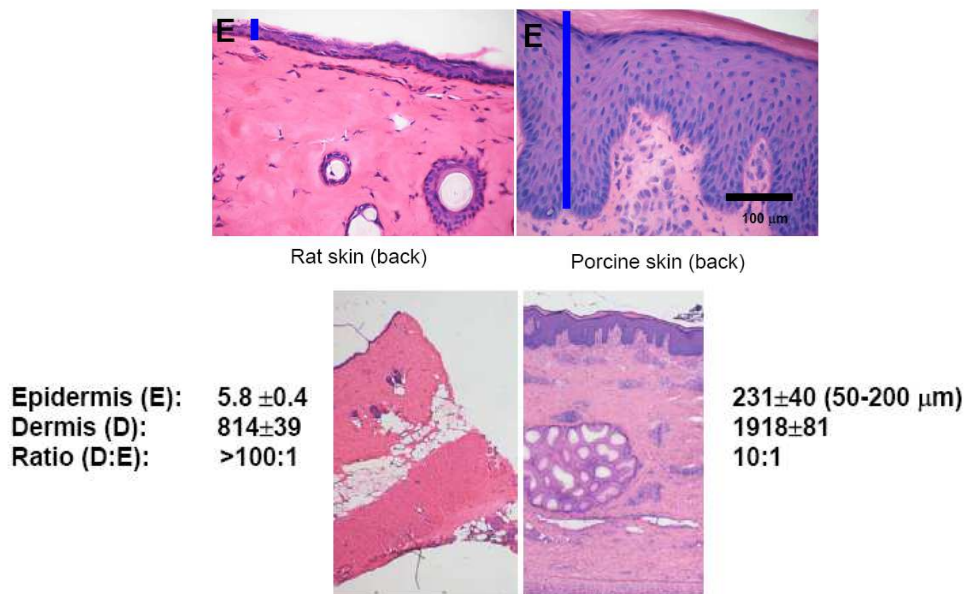
รูปที่ 2.A การดูตำแหน่งเจาะบาดแผลบนหลังหนูใหญ่ (rat) 6 บาดแผล (บริเวณที่แสดงเป็นรูปสี่เหลี่ยม)



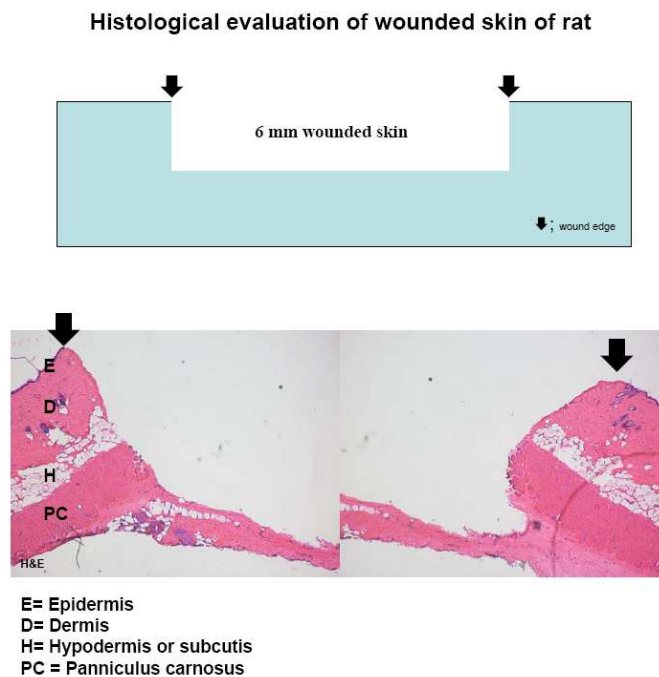
รูปที่ 2.B แสดงตำแหน่งบนหลังหนู rat ที่เจาะจริงของบาดแผล 6 บาดแผล โดยตำแหน่งที่เจาะจะมีการใช้ grid เป็นตัวบ่งตำแหน่ง (รูปบน) ก่อนเจาะบาดแผลโดยใช้ biopsy punch เส้นผ่าศูนย์กลางขนาด 6 มิลลิเมตร (รูปกลาง) และปะทับด้วย Tegaderm film (รูปล่าง)

ทำการวิเคราะห์ผลเบื้องต้นก่อนเริ่มทำการทดลองจริง ซึ่งได้ผลดังนี้

จาก histologic study พบว่าชั้นผิวหนังที่ส่วนหลังของหนู rat จะมีชั้น epidermis หรือหนังแท้ที่บางกว่าของคน และสุกรมาก (5-6 μ m ในหนู rat และ 50-200 μ m ในสุกรและคน) โดยในหนูใหญ่จะมีชั้น epidermis ที่ประกอบด้วยชั้น epidermal cells ประมาณ 2-3 ชั้นเท่านั้น ดังแสดงในรูปที่ 3 บาดแผลที่เจาะบนหลังหนูใหญ่จะมีความลึกถึงชั้นกล้ามเนื้อเรียบชั้นบางๆใต้ผิวหนังที่เรียกว่า panniculus carnosus (PC) ซึ่งถือว่าเป็นความลึกของบาดแผลที่เหมาะสม (กล้ามเนื้อชั้นนี้ไม่ปรากฏในมนุษย์ หรือสุกร) ดังแสดงในรูปที่ 4



รูปที่ 3. Histology แสดงการเปรียบเทียบความหนาของชั้นผิวหนังที่ส่วนหลังของหนูใหญ่ (ภาพด้านซ้าย) และสุกร (ภาพด้านขวา) โดย H&E staining



รูปที่ 4. Histology แสดงชั้นผิวหนังส่วนบาดแผลที่ส่วนหลังของหนูใหญ่ที่ทำการเจาะ โดยมีความลึกของแผลที่ระดับชั้น panniculus carnosus (H&E staining)

นอกจากนั้น ยังพบว่าการทำบาดแผล 6 บาดแผลบนหลังหนู rat นั้นมีความไม่เหมาะสม เนื่องจากจะมีการลาดเททางด้านข้างของบาดแผลที่ไม่เท่ากันทำให้เมื่อใส่สารละลาย หรือเจล จะทำให้สารดังกล่าวไหลออกไปด้านข้างแม้จะติดแผ่น Tegaderm film แล้วก็ตาม และสัตว์ทดลองสามารถเอี้ยวตัวมาทำลายแผ่น Tegaderm film และเลียสารละลายหรือเจลออกไปได้จากบาดแผลคู่ด้านล่างสุดได้ ดังนั้นในการทดลองจริงจะทำการเจาะบาดแผลเพียง 4 บาดแผล และมีการให้ยา ampicillin antibiotic 50mg/kg แก่สัตว์ทดลอง และลดขนาดยาสลบลงเหลือ 40 mg/kg และยกเลิกการใช้ betadine เพื่อหลีกเลี่ยงผลกระทบจากยา betadine

การทดลองจริงโดยมีขั้นตอนต่อไปนี้ (ดู flow chart และภาพประกอบ)

- ใช้สัตว์ทดลอง (Sprague-Dawley rat) ตัวผู้ ขนาดน้ำหนักตัว 200 ถึง 250 กรัม โดยสัตว์ทดลองแต่ละตัวจะถูกสุ่มให้หมายเลข (R9, R10, R11, ..., R48) เพื่อสะดวกในการกำหนดวันการทำบาดแผลและการกำหนดวันของการเก็บบาดแผล ตลอดจนการกำหนดการใช้สารทดสอบในตำแหน่งแต่ละตำแหน่งของบาดแผล (pattern 1, 2, 3, หรือ 4) รูปที่ 5 ประกอบ
- สัตว์ทดลองจะถูกเลี้ยงในกรง 1 ตัวต่อกรง ภายในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส และมีแสงสว่าง 12 ชั่วโมง สลับความมืด 12 ชั่วโมง มีการให้อาหารและน้ำอย่างบริบูรณ์ตลอดการทดลอง สัตว์ทดลองจะถูกเลี้ยงให้เคยชินกับสถานที่ก่อนทำการทดลองอย่างน้อย 1 สัปดาห์
- ในขั้นตอนการทำบาดแผล full thickness wound model กับสัตว์ทดลอง
 - สัตว์ทดลองจะถูกวางยาสลบโดยการฉีดยาสลบ Nembutal ในขนาด 40 mg/kg และ ampicillin 50mg/kg เข้าช่องท้อง (intra-peritoneal)
 - ขนบนหลังสัตว์จะถูกโกนและฆ่าเชื้อโรคโดยใช้ 70% ethanol
 - กำหนดจุดที่จะทำการผ่าตัดเอาส่วนผิวหนังรวมชั้น epidermis และ dermis ออก (ความลึกถึงชั้น panniculus carnosus) ซึ่งตำแหน่งที่กำหนดจะขนานตามแนวกระดูกสันหลังระหว่างขาหน้าและขาหลัง โดยใช้ guiding grid เป็นตัวช่วยกำหนดตำแหน่ง (บาดแผลห่างจากกัน 1 cm และห่างจากแนวกระดูกสันหลัง 0.5 cm.)
 - เจาะบาดแผลโดยใช้ biopsy punch จำนวน 4 บาดแผล (ข้างละ 2 บาดแผล) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.6 cm.
 - ระหว่างการทำบาดแผลหากสัตว์ทดลองมีอาการตื่นจะมีการใช้ halothane ช่วยโดยไม่มีการฉีด Nembutal เพิ่มเติม และใช้ adrenaline 0.1mg/ml in NSS ในการหยุดเลือดที่บาดแผลหากจำเป็น
- กลุ่มการทดลองมี 4 กลุ่มการทดลองดังนี้
 - ยาเตรียมสารสกัดรังไหม fibroin ในรูปแบบเจลที่มีความเข้มข้นของ fibroin 1% in PBS
 - ยาเตรียมสารสกัดรังไหม fibroin ในรูปแบบเจลที่มีความเข้มข้นของ fibroin 2.5% in PBS
 - PBS เพื่อใช้สำหรับกลุ่มควบคุม
 - ยาเตรียม carboxy methyl cellulose (CMC) 1% in PBS เพื่อใช้สำหรับกลุ่มควบคุม (occlusion effect)
- ทำการใส่สารทดสอบแต่ละชนิด จำนวน 20 μ l ในบาดแผลของสัตว์ทดลองตามการสุ่มสัตว์ทดลองข้างต้น (ชุดละ 8 ตัว ยกเว้น D14 มีจำนวน 6 ตัว) และตำแหน่งของบาดแผล (ตาม P1, P2, P3, P4)
- บาดแผลของสัตว์ทดลองจะถูกปิดด้วย elastic film Tegaderm (3M) ขนาด 6x7 cm. เพื่อป้องกันการไหลออกของสารทดสอบและป้องกันบาดแผลจากการติดเชื้อหรือปนเปื้อนวัสดุรองนอน และใส่ปลอกคอสัตว์ทดลองเพื่อป้องกันการกัดแทะหรือเลียบาดแผล
- ผ่าตัดเก็บบาดแผล ในวันที่ 1 (D1), 3 (D3), 5 (D5), 7 (D7), และ 14 (D14) วันหลังทำบาดแผล โดยก่อนการผ่าตัดจะมีการประเมินลักษณะบาดแผล และการฟื้นตัวของบาดแผลก่อน โดยทั้งการถ่ายรูปบาดแผล การวัดขนาดของบาดแผลที่ลดลง และการสังเกตอื่นๆ ประเมินผลการเกิดพิษที่เกิดกับผิวหนัง เช่น การอักเสบ การแพ้ เป็นต้น (โดยผู้เชี่ยวชาญด้านสัตว์ทดลอง หรือสัตวแพทย์)
- ตรวจสอบทาง Gross histology และ Immunohistochemistry ขึ้นบาดแผลทุกชิ้น เพื่อประเมินผลการฟื้นตัวของบาดแผลในระดับเซลล์ และทำการตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนต่างๆที่เกี่ยวข้องกับการฟื้นตัวของบาดแผล เช่น Ki67, CK14, CK10 เป็นต้น

Note: สัตว์ทดลองจะถูกทำให้สิ้นชีวิตอย่างสงบและรวดเร็วโดยใช้ guillotine (ก่อนการเก็บชิ้นบาดแผล)

Rat Wounding Protocol

Sprague Dawley[®] rat; Name marking and weighting (g)



Anesthetic; 40 mg/kg (IP) & Antibiotic; 50 mg/kg (IP)

Nembutal = X ml + 0.2ml NSS
Ex. 250g rat = 0.18ml + 0.2ml NSS



Amp. Injection (μl) = weight (g)/2

Shaving; electric clipper and surgical blade (plus shaving soap with antibacterial agents)



NSS wipe; 3-5 times (remove the residual cream)



70% alcohol wipe; 2-3 times



Carefully, add blocking ring and trim nail



Anesthetic; ¼ dose (IP) or Halothane



Move to wounding section

NSS wipe; 2-3 times



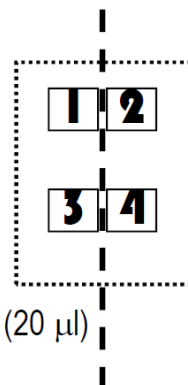
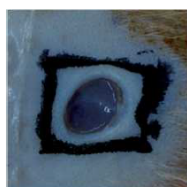
70% alcohol wipe; 2-3 times



Wound (grid) marking; 1 cm²



6 mmØ wound generation (4 wounds)
(Prevent bleeding; **0.1mg/ml adrenaline in NSS**)



Topical treatments; 10 mM PBS, 1% CMC, FN1% and FN2.5% (20 μl)
(see experimental design)



Cover the wounds with Tegaderm; 3M (6X7 cm)



Take a photo; day 0 post-wounding



Housing



Harvest in various time points
(Day 1, 3, 5, 7 and 14)



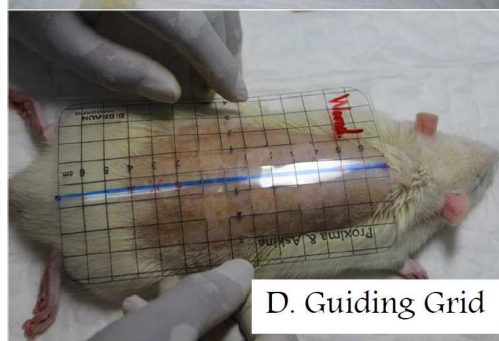
A. SD rat



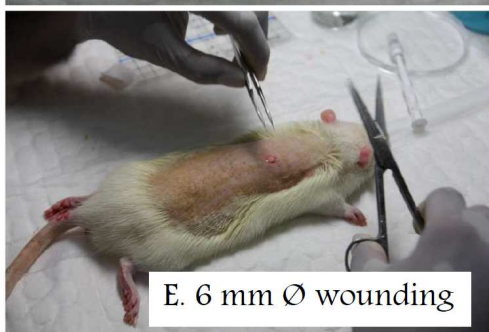
B. Shaving



C. Dorsum area



D. Guiding Grid



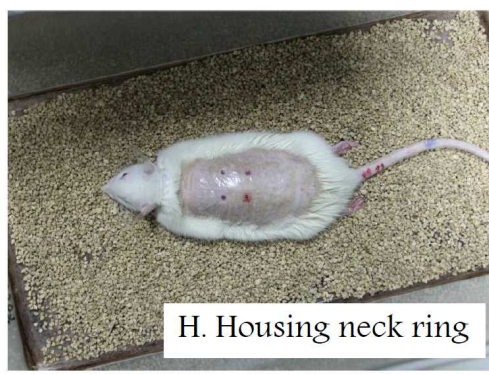
E. 6 mm Ø wounding



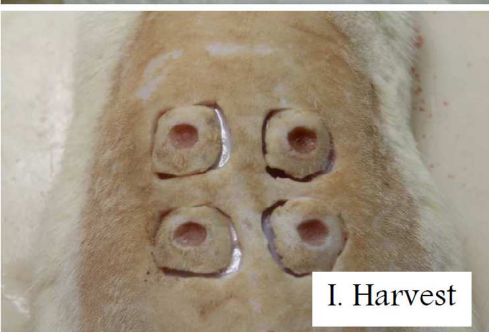
F. 4 wounds



G. Wounds with Tegaderm



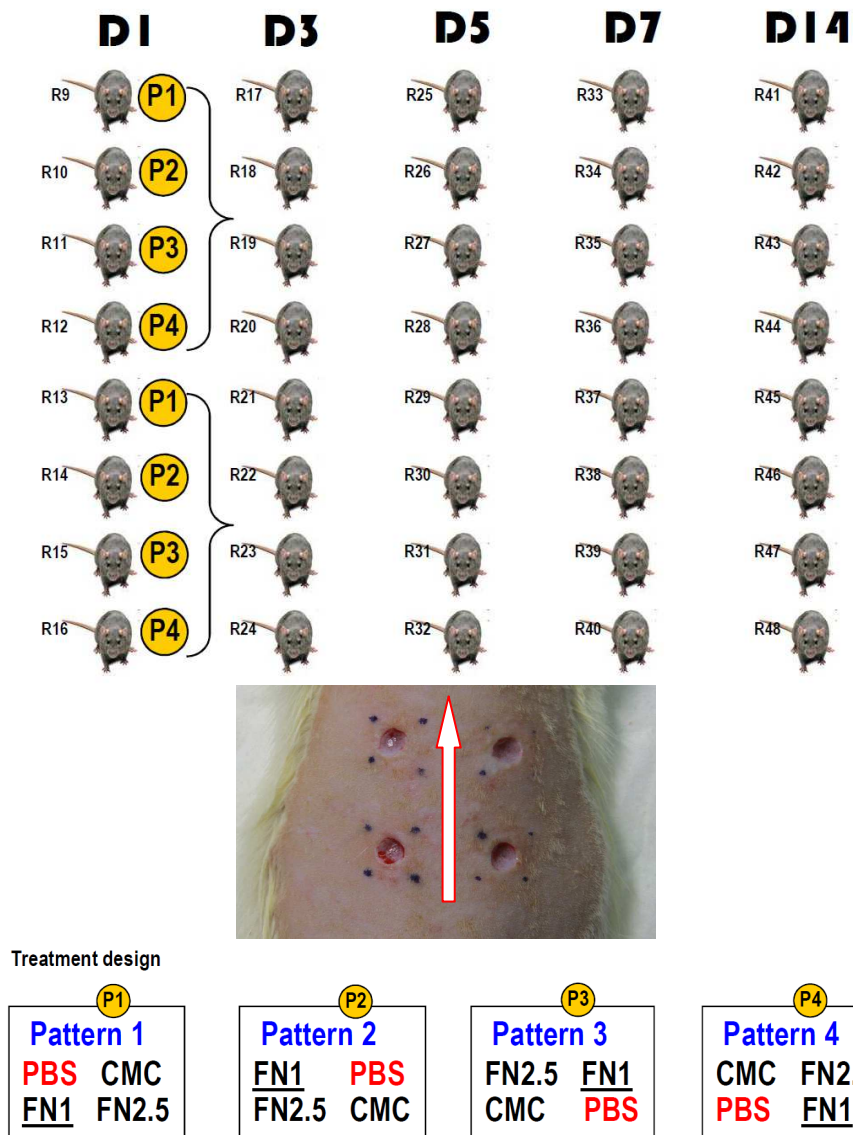
H. Housing neck ring



I. Harvest



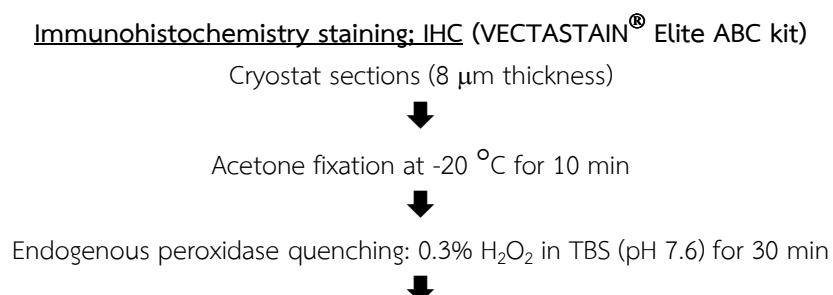
J. Snap frozen

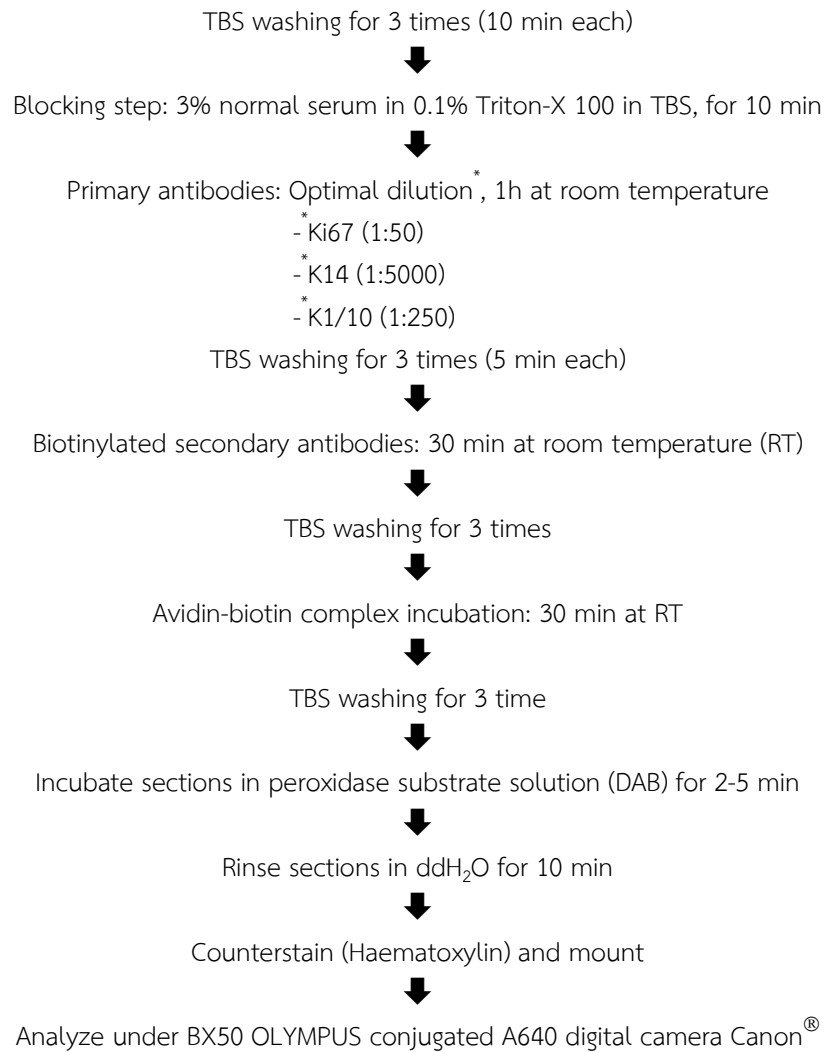


รูปที่ 5. สุ่มให้หมายเลข (R9, R10, R11, ..., R48) สัตว์ทดลองแต่ละตัวการเพื่อสะดวกในการกำหนดวันของการเก็บบาดแผลและการกำหนดการใช้สารทดสอบในตำแหน่งแต่ละตำแหน่งของบาดแผล (pattern 1, 2, 3, หรือ 4)

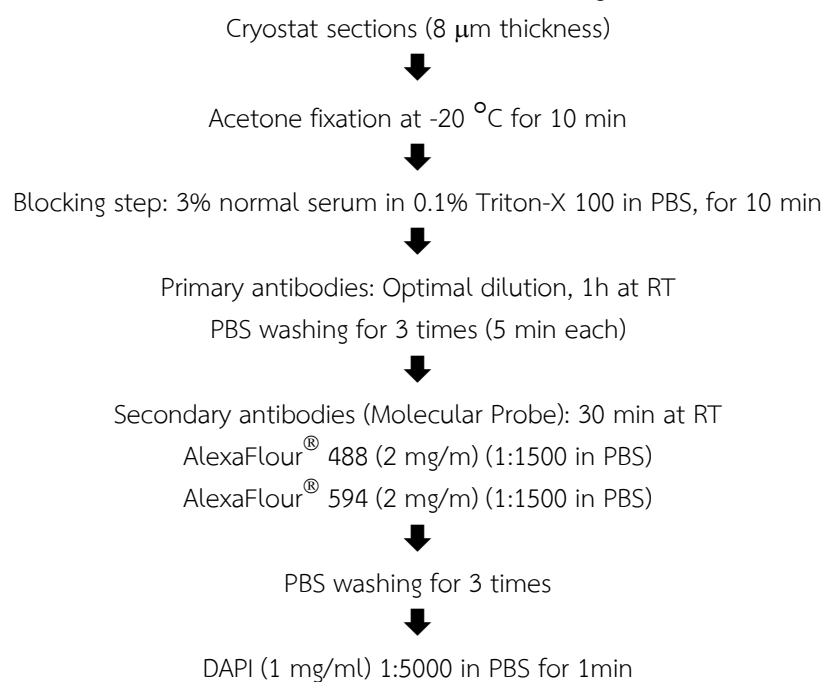
2.3 การศึกษาเพื่อประเมินผล Immunohistochemistry (IHC) และ Immuno-fluorescent (IF) staining

ทำการศึกษาประเมินผลในระดับเซลล์ และระดับโมเลกุลของบาดแผลจากการทดลอง โดยติดตามการแสดงออกของโปรตีนชนิดต่างๆที่เฉพาะเจาะจงกับเซลล์ ต่างๆ โดยใช้วิธี Immunohistochemistry staining (IHC) และ/หรือ Immuno-fluorescent (IF) staining ดังแสดงตาม flowchart ดังนี้





Immuno-fluorescent; IF staining





Rinse sections in ddH₂O for 10 min

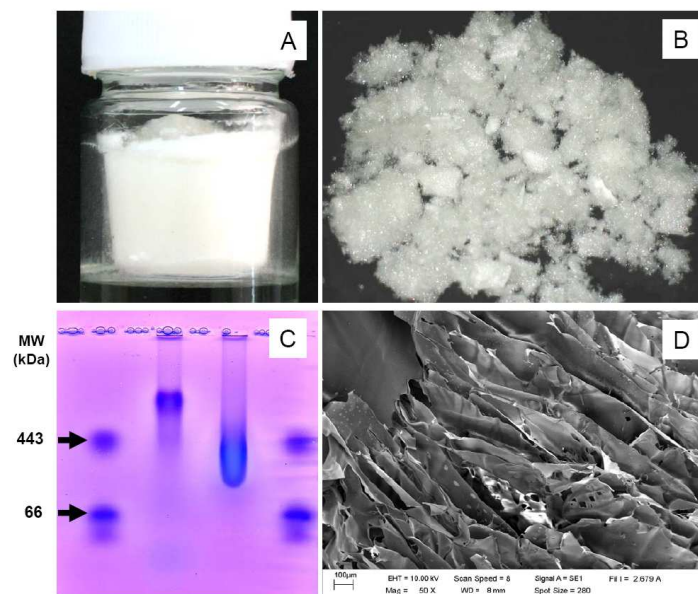


Mount and analyze under fluorescent microscope (Scope. A1, Carl Zeiss, AxioCam HRC CCD camera)
Filters: DAPI, GFP, and Texas Re

3. ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

3.1 การเตรียมและผลิตสารสกัดรังไหม fibroin

- โดยใช้กรรมวิธีที่ทีมผู้วิจัยคิดค้นขึ้น จะได้สารสกัดไฟโบรอินที่มีความบริสุทธิ์สูง คุณภาพสม่ำเสมอ ปราศจากเชื้อ และไม่มี การปนเปื้อนโลหะหนักหรือเกลือ (ดังแสดงในรูปที่ 6)
- การเตรียมสารสำหรับการทดลองในแต่ละกลุ่ม โดยวิธี freshly prepared and sterile technique พบว่ายาทเตรียมสารสกัดรังไหม fibroin รูปแบบเจลที่มีความเข้มข้นของ fibroin 1% และ 2.5% in PBS ได้สารละลายเจลใสไม่มีสี ทนทาน การฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่ง autoclave และยาเตรียม carboxy methyl cellulose 1% in PBS ได้สารละลายเจลใสไม่มี สีเพื่อใช้สำหรับเป็นกลุ่มควบคุมเลียนแบบสภาวะบาดแผลที่มีการให้สารประเภทเจล (occlusion effect)



รูปที่ 6. แสดงผลิตภัณฑ์โปรตีน fibroin บริสุทธิ์ของจากรังไหม (A, B) Agarose gel electrophoresis แสดงขนาดโมเลกุลของ sericin ลูที่ 2 และ fibroin ลูที่ 3 (C) และรูปถ่าย SEM ของผลึก fibroin (D)

3.2 การทดสอบผลพิษและประสิทธิภาพของ fibroin เจลต่อการฟื้นตัวของผิวหนัง หรือเป็นพิษต่อผิวหนัง สัตว์ทดลอง

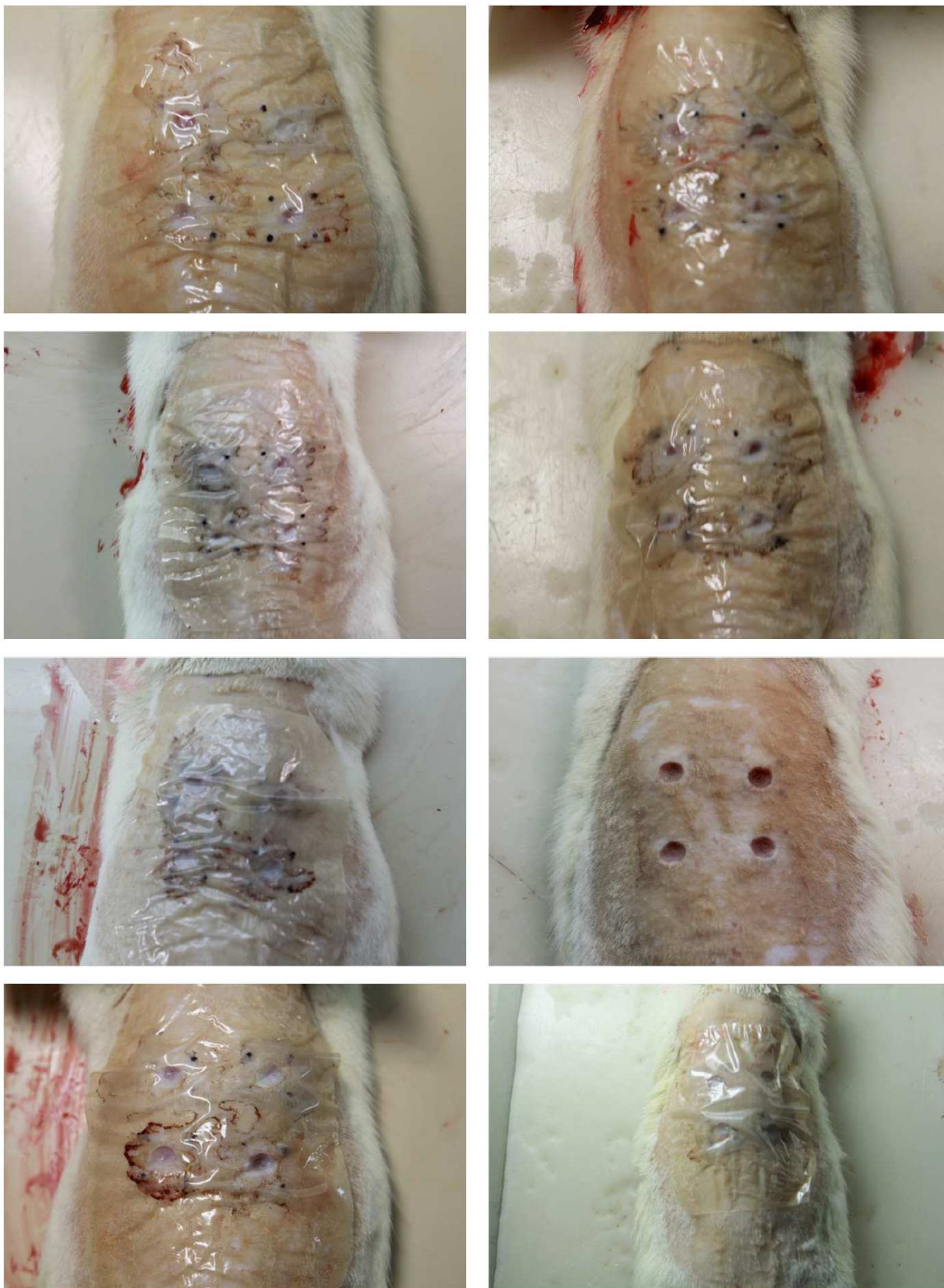
ผลทางกายภาพตรวจสอบทางกายภาพ

สัตว์ทดลองมีสุขภาพแข็งแรงดี น้ำหนักตัวเพิ่มขึ้น ไม่มีการแสดงถึงอาการเครียด และไม่มีการตายของสัตว์ทดลอง ระหว่างการเลี้ยง สภาพทางกายภาพโดยทั่วไปของบาดแผลที่ทำไว้บนหลังสัตว์ทดลอง (ซึ่งแต่ละบาดแผลได้รับการใส่สารทดสอบ 1 ชนิด จาก 4 ชนิดคือ fibroin gel 1% in PBS, fibroin gel 2.5% in PBS, CMC 1% in PBS, หรือ PBS จำนวน 20 μ l เพียงครั้งเดียว) พบว่าไม่มีการติดเชื้อ ไม่มีข้อบ่งชี้การแพ้หรือความเป็นพิษของ สารทดสอบ และสัตว์ทดลองมีการฟื้นตัวของบาดแผลที่เป็นปกติ (ดูรูปที่ 7-11) แผ่น Tegaderm film จะค่อยๆหลุดออกจากตัวสัตว์ทดลองภายในวันที่ 3 หลังการทำบาดแผล และหลุดหมดทุกตัวภายในวันที่ 7 การใช้แผ่น Tegaderm film นี้มีวัตถุประสงค์เพื่อป้องกันไม่ให้สารทดสอบที่ใส่ในบาดแผลไหลออก หรือสัตว์ทดลองเลียทิ้งภายใน 24 ชั่วโมง ตลอดจนการป้องกันบาดแผลไม่ให้ปนเปื้อนวัสดุรองนอนหรือสิ่งขับถ่ายจากสัตว์ทดลอง ดังนั้นการใช้แผ่น film ชนิดนี้จึงมีความเหมาะสมในการทดลองนี้ การประเมินด้วยสายตาพบว่าทุกบาดแผลบนสัตว์ทดลองทุกตัว (ตาม code ในตาราง 3) จะมีการสมานตัวที่หายสนิทภายใน 14 วัน (ดูรูปที่ 7-11 และรูปที่ 12) โดยทั่วไป จำนวนวันที่บาดแผลหายสนิทนั้นจะขึ้นกับขนาดของบาดแผล และสุขภาพของสัตว์ทดลองแต่ละตัว (การทดลองนี้บาดแผลมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6mm.) อย่างไรก็ตามเราไม่สามารถบ่งบอกความแตกต่างได้โดยสายตาว่าบาดแผลที่ได้รับสารทดสอบแต่ละชนิดบนหลังสัตว์ทดลองแต่ละตัวมีอัตราการฟื้นตัวของบาดแผลแตกต่างกันหรือไม่

ตารางที่ 3. แสดง code ของสัตว์ทดลอง (rat) และรายละเอียดของตำแหน่งการให้สารทดสอบของบาดแผลแต่ละตำแหน่งบนหลังสัตว์ทดลอง ของ fibroin gel 1%, fibroin gel 2.5%, CMC 1%, และ PBS (N = 8 ยกเว้น Day14 N = 6)

	Day 1		Day 3		Day 5		Day 7		Day 14
R9	1 PBS	R48	1 CMC	R25	1 PBS	R33	1 PBS	R41	1 PBS
	2 CMC		2 FN2.5		2 CMC		2 CMC		2 CMC
	3 FN1		3 PBS		3 FN1		3 FN1		3 FN1
	4 FN2.5		4 FN1		4 FN2.5		4 FN2.5		4 FN2.5
R10	1 FN1	R18	1 FN1	R26	1 FN1	R34	1 FN1	R42	1 FN1
	2 PBS		2 PBS		2 PBS		2 PBS		2 PBS
	3 FN2.5		3 FN2.5		3 FN2.5		3 FN2.5		3 FN2.5
	4 CMC		4 CMC		4 CMC		4 CMC		4 CMC
R47	1 FN2.5	R19	1 FN2.5	R27	1 FN2.5	R35	1 FN2.5	R43	1 FN2.5
	2 FN1		2 FN1		2 FN1		2 FN1		2 FN1
	3 CMC		3 CMC		3 CMC		3 CMC		3 CMC
	4 PBS		4 PBS		4 PBS		4 PBS		4 PBS
R12	1 CMC	R20	1 CMC	R28	1 CMC	R36	1 CMC	R44	1 CMC
	2 FN2.5		2 FN2.5		2 FN2.5		2 FN2.5		2 FN2.5
	3 PBS		3 PBS		3 PBS		3 PBS		3 PBS
	4 FN1		4 FN1		4 FN1		4 FN1		4 FN1
R13	1 PBS	R21	1 PBS	R29	1 PBS	R37	1 PBS	R45	1 PBS
	2 CMC		2 CMC		2 CMC		2 CMC		2 CMC
	3 FN1		3 FN1		3 FN1		3 FN1		3 FN1
	4 FN2.5		4 FN2.5		4 FN2.5		4 FN2.5		4 FN2.5
R14	1 FN1	R22	1 FN1	R30	1 FN1	R46	1 FN1	R49	1 FN1
	2 PBS		2 PBS		2 PBS		2 PBS		2 PBS
	3 FN2.5		3 FN2.5		3 FN2.5		3 FN2.5		3 FN2.5
	4 CMC		4 CMC		4 CMC		4 CMC		4 CMC
R15	1 FN2.5	R23	1 FN2.5	R31	1 FN2.5	R39	1 FN2.5		
	2 FN1		2 FN1		2 FN1		2 FN1		
	3 CMC		3 CMC		3 CMC		3 CMC		
	4 PBS		4 PBS		4 PBS		4 PBS		
R16	1 CMC	R24	1 CMC	R32	1 CMC	R40	1 CMC		
	2 FN2.5		2 FN2.5		2 FN2.5		2 FN2.5		
	3 PBS		3 PBS		3 PBS		3 PBS		
	4 FN1		4 FN1		4 FN1		4 FN1		

Day 1 wounds



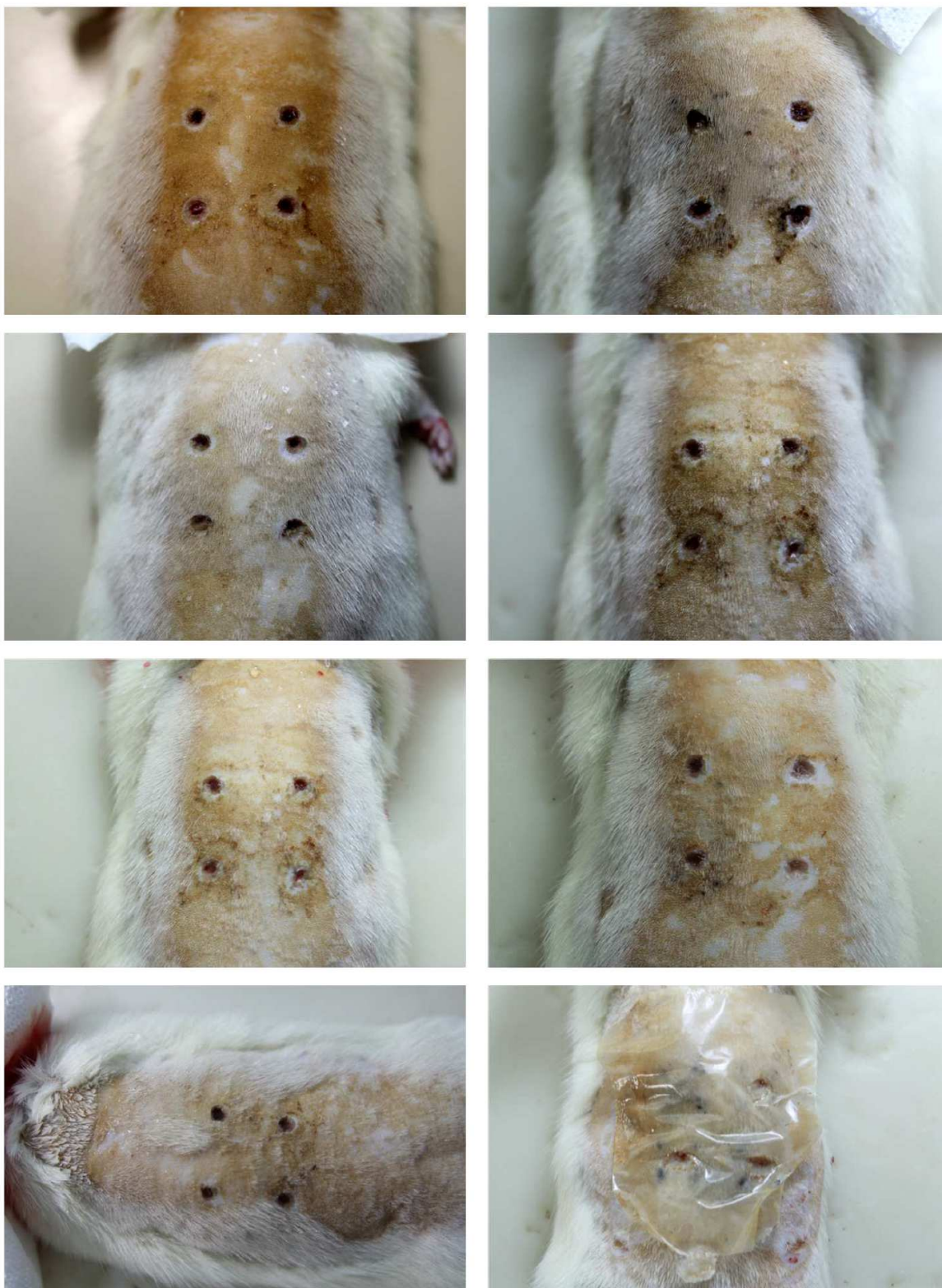
รูปที่ 7. ภาพถ่ายแสดงบาดแผลบนหลังสัตว์ทดลอง (rat) 1 วัน หลังจากการทำบาดแผลและให้สารทดสอบ 4 ชนิด คือ fibroin gel 1% in PBS, fibroin gel 2.5% in PBS, CMC 1% in PBS, หรือ PBS (1 ชนิดต่อบาดแผล) N=8

Day 3 wounds



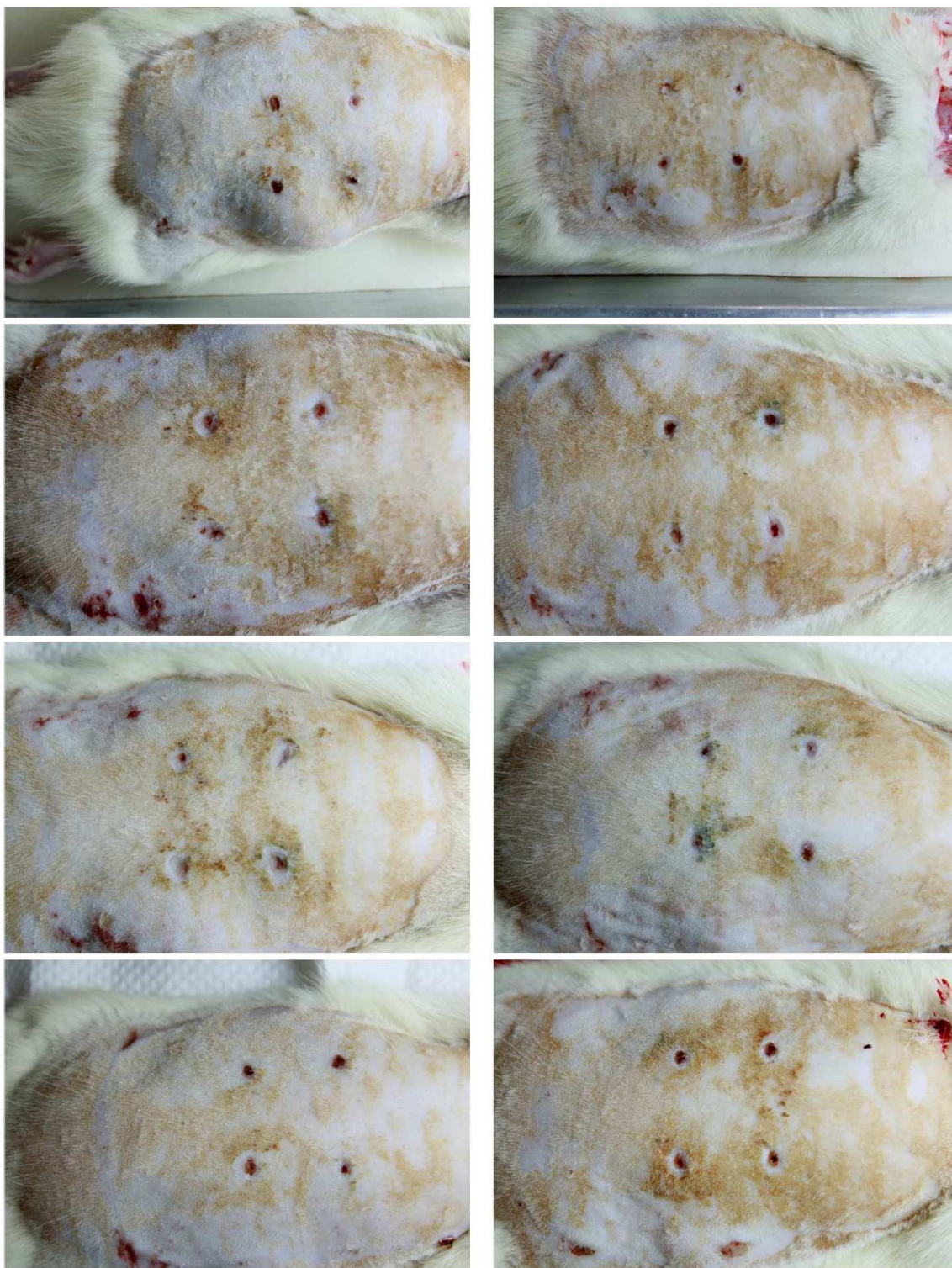
รูปที่ 8. ภาพถ่ายแสดงบาดแผลบนหลังสัตว์ทดลอง (rat) 3 วัน ภายหลังจากการทำบาดแผลและให้สารทดสอบ 4 ชนิด คือ fibroin gel 1% in PBS, fibroin gel 2.5% in PBS, CMC 1% in PBS, หรือ PBS (1 ชนิดต่อบาดแผล) N=8

Day 5 wounds



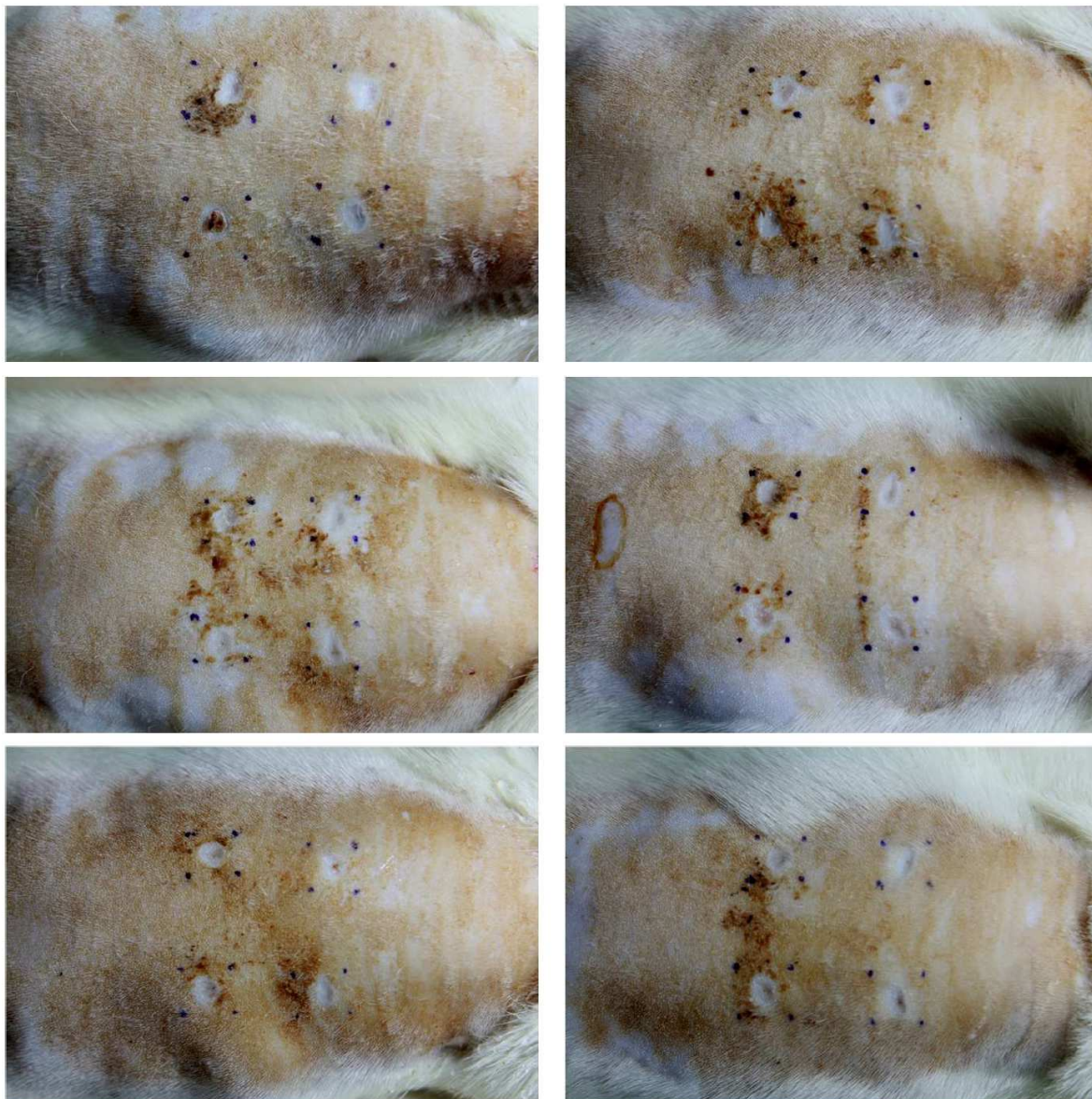
รูปที่ 9. ภาพถ่ายแสดงบาดแผลบนหลังสัตว์ทดลอง (rat) 5 วัน ภายหลังจากการทำบาดแผลและให้สารทดสอบ 4 ชนิด คือ fibroin gel 1% in PBS, fibroin gel 2.5% in PBS, CMC 1% in PBS, หรือ PBS (1 ชนิดต่อบาดแผล) N=8

Day 7 wounds



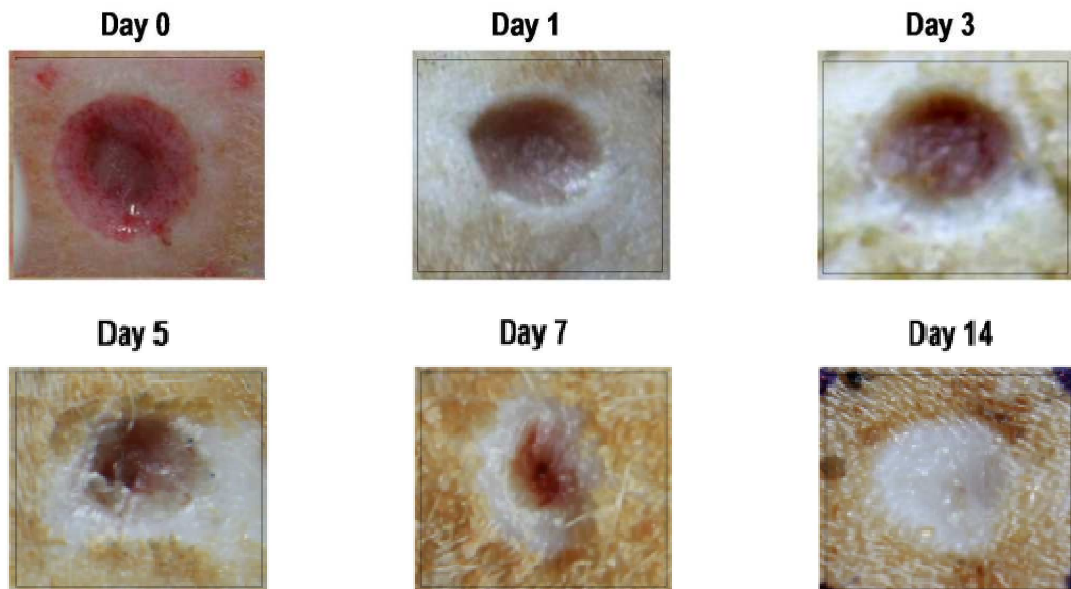
รูปที่ 10. ภาพถ่ายแสดงบาดแผลบนหลังสัตว์ทดลอง (rat) 7 วัน ภายหลังจากการทำบาดแผลและให้สารทดสอบ 4 ชนิด คือ fibroin gel 1% in PBS, fibroin gel 2.5% in PBS, CMC 1% in PBS, หรือ PBS (1 ชนิดต่อบาดแผล) N=8

Day 14 wounds



รูปที่ 11. ภาพถ่ายแสดงบาดแผลบนหลังสัตว์ทดลอง (rat) 14 วัน ภายหลังจากการทำบาดแผลและให้สารทดสอบ 4 ชนิด คือ fibroin gel 1% in PBS, fibroin gel 2.5% in PBS, CMC 1% in PBS, หรือ PBS (1 ชนิดต่อบาดแผล) N=6

Rat Wound Healing



รูปที่ 12. ภาพถ่ายแสดงบาดแผลบนหลังสัตว์ทดลอง (rat) ภายหลังจากการทำบาดแผล 0, 1, 3, 5, 7, และ 14 วัน

ผลทางกายภาพโดยการตรวจสอบทาง histology ของบาดแผล

ผลจากการศึกษา ภาพถ่าย histology ของบาดแผลบนหลังสัตว์ทดลอง (rat) 1, 3, 5, 7, 14 วัน ภายหลังจากการทำบาดแผลและการให้สารทดสอบ คือ fibroin gel 1% in PBS, fibroin gel 2.5% in PBS, CMC 1% in PBS, หรือ PBS (1 ชนิดต่อบาดแผล N=8 ยกเว้น Day14 N=6) โดยในรูปที่ 14-18 จะแสดงเฉพาะตัวแทนในแต่ละกลุ่มวัน (1, 3, 5, 7, 14 วัน) ภาพถ่าย histology ของบาดแผลแต่ละชั้นจะถูกนำมาวัดค่า epidermal layer migration (EM, micron) เพื่อนำมาคำนวณหาค่า % re-epithelialization ($\%RE = [EM/3,000] \times 100$) ซึ่งค่า 3,000 micron ได้มาจากระยะทางจากขอบแผลถึงจุดกึ่งกลางบาดแผลที่ทำไว้ด้วย biopsy punch ขนาด 600 micron (0.6 mm.) ในรูปที่ 13 แสดงตัวอย่างวัดค่า epidermal layer migration (EM) จะได้จากวัดการเคลื่อนที่ของชั้น epidermal (keratinocytes) layer จากขอบบาดแผลเริ่มแรก (wound edge แสดงโดยรูป =>) ไปจนถึง epidermal migrating tip (แสดงโดยรูป *) และการคำนวณหาอัตราส่วนระหว่างความหนาของชั้น epidermis ที่บริเวณบาดแผล (wounded skin, W) ต่อความหนาชั้น epidermis รอบบาดแผลที่มีผิวหนังปกติ (peripheral intact skin, P) ผลสรุปแสดงไว้ในตารางที่ 4 ซึ่งแสดงผลการวัด และคำนวณค่า epidermal layer migration (EM), % of re-epithelialization (%RE), P/W ratio และ complete healing (CH) ของบาดแผลในสัตว์ทดลอง (rat) แต่ละกลุ่มที่ได้รับสารทดสอบ fibroin gel 1%, fibroin gel 2.5%, CMC 1%, หรือ PBS (N = 8 ยกเว้น Day14 N = 6) ในวันที่ 1, 3, 5, 7, 14 วันภายหลังจากการทำบาดแผล และแสดงผลการวิเคราะห์หาค่าสำคัญทางสถิติโดย ANOVA โดยรูปแสดง histogram ที่ 19 และ 20 และในตารางที่ 4

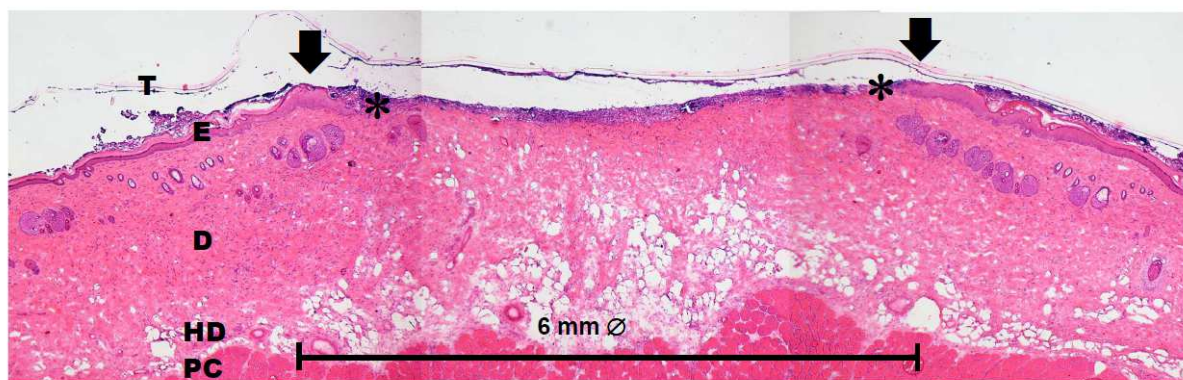
ลักษณะโดยทั่วไป บาดแผลบนหลังสัตว์ทดลอง 1 วันภายหลังจากการทำบาดแผล (รูปที่ 14) จะพบว่าการเคลื่อนตัวเข้ามาของชั้น dermis มาที่บริเวณบาดแผล (ซึ่งมีการผ่าตัดเอาชั้น dermis ออกไปแล้ว - ดูรูปที่ 4) กล้ามเนื้อชั้น PC มีการแตกกระจายของมัดกล้ามเนื้อ และเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างเห็นได้ชัดเพื่อแทนที่กล้ามเนื้อส่วนที่ถูกตัดออกไปตอนทำบาดแผล ทำให้บาดแผลดูตื้นขึ้นมาออกเห็นได้ชัดเจน แต่ต่อมขุมขนจะไม่มีกระจายตัวเข้ามาบริเวณแผล ชั้น epidermis เริ่มมีการเคลื่อนที่เข้าสู่บริเวณบาดแผล ซึ่งในการวิเคราะห์การเคลื่อนที่ของ epidermal migration (EM) (ดู รูปที่ 19) ในรูป % re-epithelialization (%RE) หรือ % wound coverage (ดู รูปที่ 20 ในกลุ่มวันที่ 1) โดย ANOVA ไม่พบว่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของ %RE ของกลุ่มบาดแผลที่ได้รับสารทดสอบ fibroin gel 1% (11.3%), fibroin gel 2.5% (13.5%), CMC 1% (12.6%) , หรือ PBS (12.3%)

ค่า %RE มีความแตกต่างอย่างเห็นได้ชัดในบาดแผลบนหลังสัตว์ทดลอง 3 วันภายหลังจากการทำบาดแผล (ตารางที่ 4, รูปที่ 15 และ 20) กลุ่มบาดแผลที่ได้รับสารทดสอบ fibroin gel 2.5% (70%), จะมี %RE สูงกว่ากลุ่มบาดแผลที่ได้รับสารทดสอบอื่นๆ CMC 1% (49.5%), fibroin gel 1% (47%), และ PBS (42.7%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ANOVA, $p < 0.01$) และเมื่อเทียบผลระหว่างกลุ่มบาดแผลที่ได้รับสารทดสอบ fibroin gel 2.5% กับ fibroin gel 1% กลุ่มบาดแผลที่ได้รับสารทดสอบ fibroin gel 2.5% จะให้ผล %RE ที่สูงที่นัยสำคัญเช่นกัน (ANOVA, $p < 0.05$) นอกจากนั้นในกลุ่มบาดแผลที่ได้รับสารทดสอบ fibroin gel 2.5% จะมีบาดแผลที่เกิดการ re-epithelialization อย่างสมบูรณ์ (complete healing, 100% wound coverage) อยู่ถึง 3 บาดแผลใน 8 บาดแผลของกลุ่ม ในขณะที่กลุ่มบาดแผลที่ได้รับสารทดสอบ fibroin gel 1% มีบาดแผลที่เกิด complete healing เพียง 1 บาดแผลใน 8 บาดแผลของกลุ่มเท่านั้น และในกลุ่ม CMC 1% และ PBS ไม่มีบาดแผลใดเกิด complete wound coverage เลย

ค่า %RE ในบาดแผลบนหลังสัตว์ทดลอง 5, 7, และ 14 วัน ภายหลังจากการทำบาดแผล (รูปที่ 16, 17, 18) จะมีค่าที่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มบาดแผลที่ได้รับสารทดสอบทั้ง 4 กลุ่ม (รูปแสดง 20 และตารางที่ 4) โดยบาดแผลในแต่ละกลุ่มจะมี complete wound coverage มากขึ้น และจะมี complete healing ทั้งหมดในเวลา 14 วัน ในรูปที่ 18 จะสังเกตได้ว่าภายหลัง 14 วันหลังการมีบาดแผลต่อมขมจะไม่มีการเคลื่อนที่เข้าสู่บริเวณที่เคยมีแผล (scar)

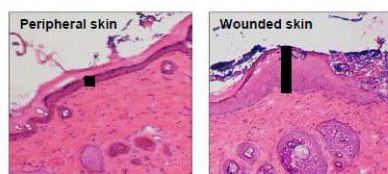
ดังนั้นผลการทดลองนี้จึงสามารถระบุได้ว่า fibroin gel เพียงครั้งเดียว มีผลช่วยเร่งการฟื้นตัวของบาดแผลในสัตว์ทดลองให้เกิดได้เร็วขึ้น โดย fibroin gel 2.5% จะให้ผลดีกว่า fibroin gel ที่ 1% โดยประสิทธิภาพจะสูงสุดประมาณวันที่ 3 ภายหลังจากเกิดบาดแผล แสดงถึงการใช้ระยะเวลาในการออกฤทธิ์ที่ช้า (delayed) ของสารทดสอบ อาจเป็นผลเนื่องจากการฟื้นตัวของบาดแผลจำเป็นต้องมีการสร้างมวลสารทดแทนส่วนที่หายไป ซึ่งจำเป็นต้องใช้เวลาในการสร้าง และพบว่า fibroin gel ทั้งในความเข้มข้น 2.5% และ 1.0% ไม่ก่อให้เกิดพิษต่อเซลล์ หรือขัดขวางกระบวนการฟื้นตัวของบาดแผล และผลของความหนืดเป็นเจลไม่มีผลต่อกระบวนการฟื้นตัวของบาดแผล ซึ่งสังเกตได้จากกลุ่มบาดแผลที่ใส่สารที่มีความหนืดเช่น 1% CMC

จาก ตารางที่ 4 และรูปที่ 21 ในส่วนค่า W/P ratio ซึ่งเป็นอัตราส่วนความหนาของชั้น epidermis ที่บริเวณบาดแผลต่อที่บริเวณผิวหนังปกติรอบบาดแผล พบว่าทุกกลุ่มบาดแผลของทดลองจะมีการเพิ่มขึ้นสูงของค่า W/P ratio ในวันที่ 1 (ระหว่าง 2.6-3.4 เท่า), วันที่ 3 (ระหว่าง 5.5-7.6 เท่า), วันที่ 5 (ระหว่าง 6.3-6.9 เท่า), วันที่ 7 (ระหว่าง 4.1-8.5 เท่า) และค่อยๆ ลดลงไปที่ วันที่ 14 (ระหว่าง 2.2-2.8 เท่า) ซึ่งเป็นเรื่องปกติของกระบวนการฟื้นตัวของบาดแผล เซลล์ keratinocytes จะมีการแบ่งตัวเพิ่มขึ้น และหนาขึ้นขึ้นในบริเวณที่ขอบแผลและเคลื่อนตัวเข้าปกคลุมบาดแผล เมื่อกระบวนการเสร็จสิ้นค่า W/P ratio จะเป็นปกติ (บาดแผลหลังจาก 14 วัน ซึ่งเกิด complete healing แล้ว แต่ยังคงใช้เวลาในระยะของ wound remodeling) เมื่อพิจารณาในวันที่ 3 หลังการทำบาดแผลจะพบว่า ค่า W/P ratio ในกลุ่มบาดแผลที่ได้รับสารทดสอบ fibroin 1% (ratio 7.6) และ 2.5% (ratio 6.0) จะค่าสูงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม PBS (ratio 5.5) และกลุ่ม 1% CMC (ratio 5.6)



Partial-thickness wound

T; 3M Tegaderm™
E; epidermis
D; dermis
HD; hypodermis
PC; panniculus carnosus
↓; wound edge
*; migrating keratinocytes tip

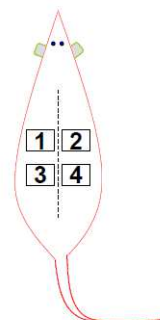


32.6±6.4 μm

100±23.3 μm

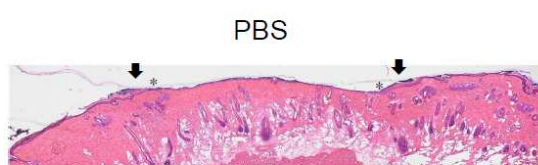
n=8

Viable epidermis

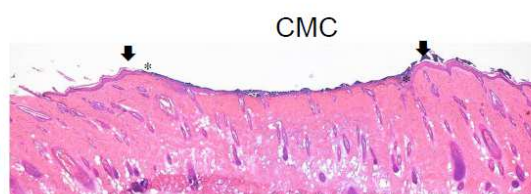


รูปที่ 13. แสดงตัวอย่างวัดค่า epidermal layer migration (EM) จะได้จากวัดการเคลื่อนที่ของชั้น epidermal (keratinocytes) layer จากขอบบาดแผลเริ่มแรก (wound edge แสดงโดยรูป =>) ไปจนถึง epidermal migrating tip (แสดงโดยรูป *) และการคำนวณหาอัตราส่วนระหว่างความหนาของชั้น epidermis ที่บริเวณบาดแผล (wounded skin, W) ต่อความหนาชั้น epidermis รอบบาดแผลที่มีผิวหนังปกติ (peripheral intact skin, P)

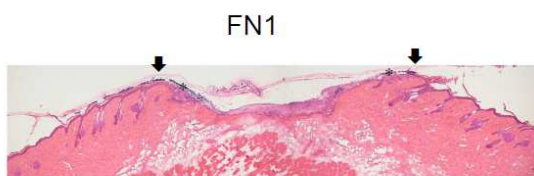
Day 1 post-wounding



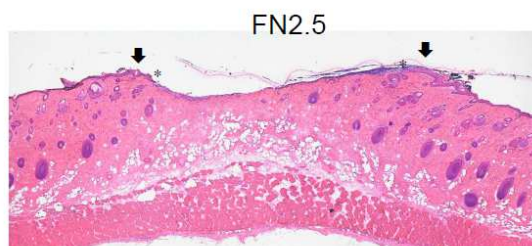
EM; 367.5±39.3
RE; 12.3±1.3



EM; 377.6±34.1
RE; 12.6±1.1



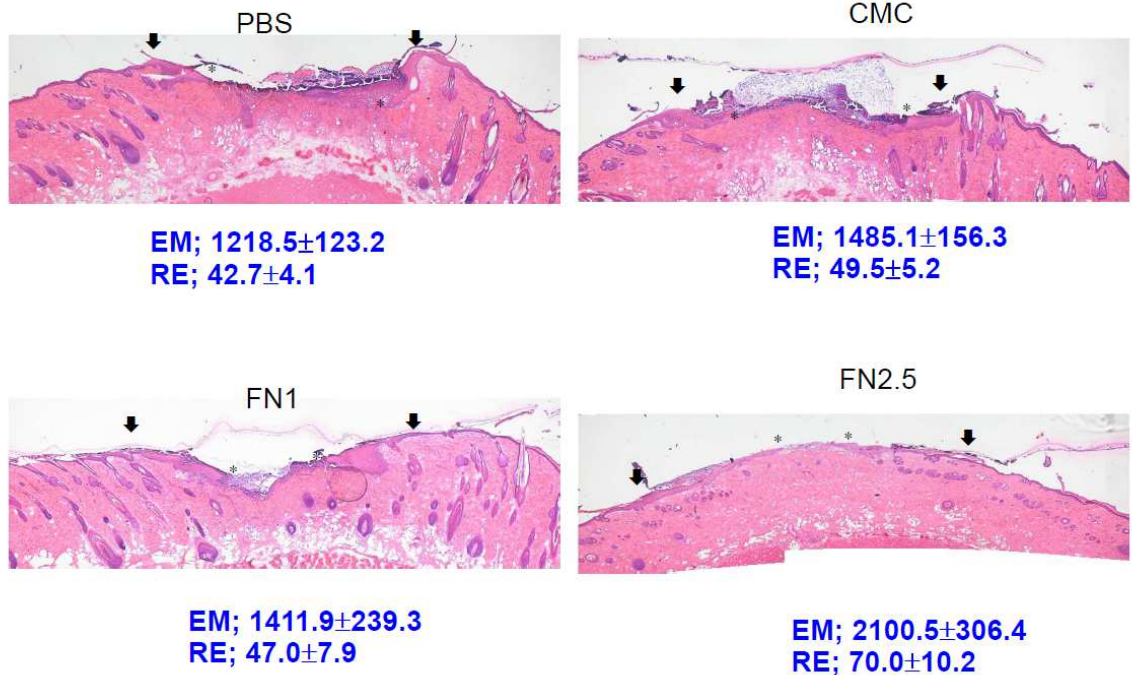
EM; 340.1±37.1
RE; 11.3±1.2



EM; 404.0±32.5
RE; 13.5±1.1

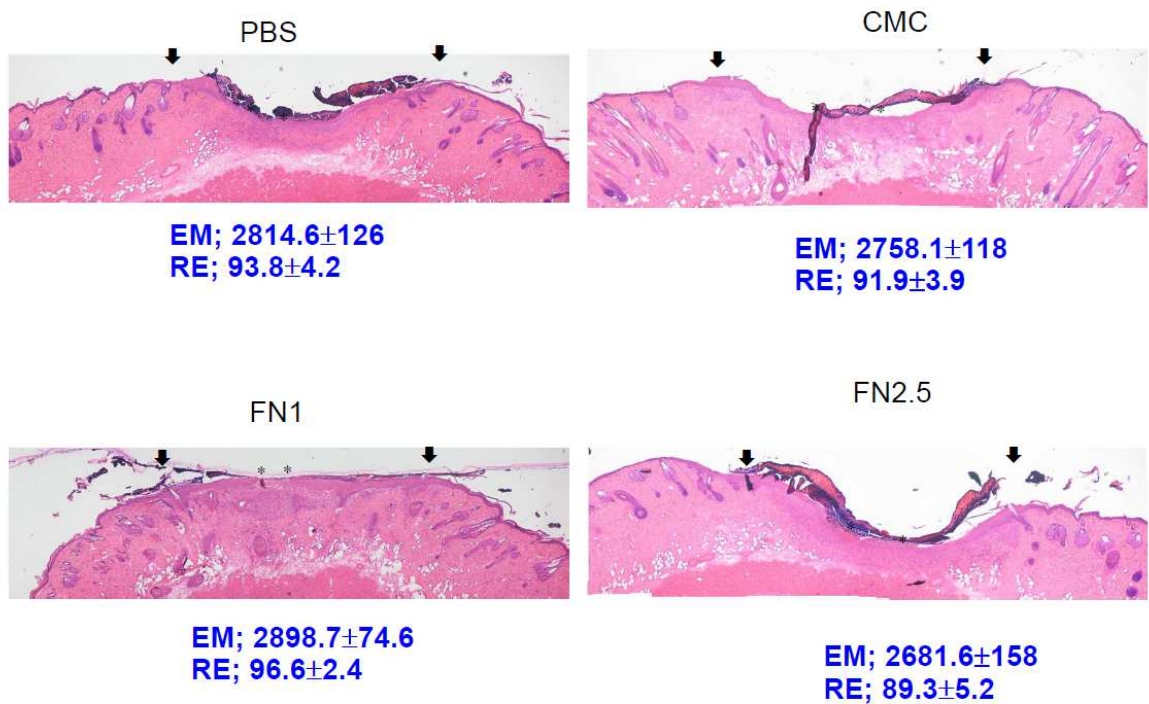
รูปที่ 14. ภาพถ่าย histology แสดงตัวอย่างบาดแผลบนหลังสัตว์ทดลอง (rat) 1 วัน ภายหลังจากการทำบาดแผล ภายหลังการให้สารทดสอบ คือ fibroin gel 1% in PBS, fibroin gel 2.5% in PBS, CMC 1% in PBS, หรือ PBS (1 ชนิดต่อบาดแผล N=8)

Day 3 post-wounding



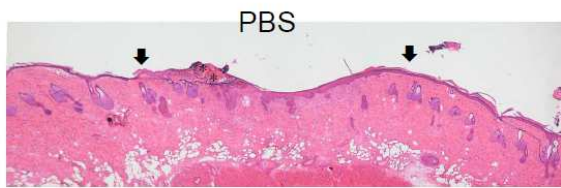
รูปที่ 15. ภาพถ่าย histology แสดงตัวอย่างบาดแผลบนหลังสัตว์ทดลอง (rat) 3 วัน หลังจากการทำการทำบาดแผล ภายหลังการให้สารทดสอบ คือ fibroin gel 1% in PBS, fibroin gel 2.5% in PBS, CMC 1% in PBS, หรือ PBS (1 ชนิดต่อบาดแผล N=8)

Day 5 post-wounding

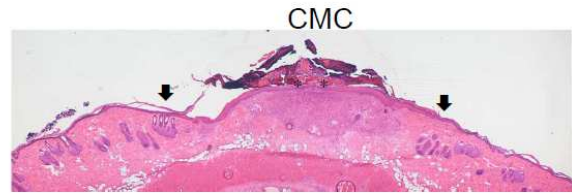


รูปที่ 16. ภาพถ่าย histology แสดงตัวอย่างบาดแผลบนหลังสัตว์ทดลอง (rat) 5 วัน หลังจากการทำการทำบาดแผล ภายหลังการให้สารทดสอบ คือ fibroin gel 1% in PBS, fibroin gel 2.5% in PBS, CMC 1% in PBS, หรือ PBS (1 ชนิดต่อบาดแผล N=8)

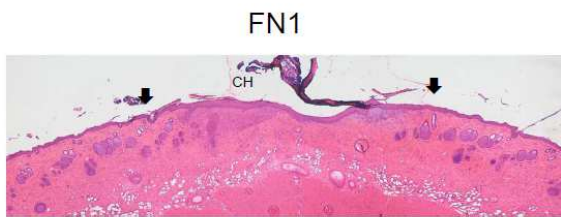
Day 7 post-wounding



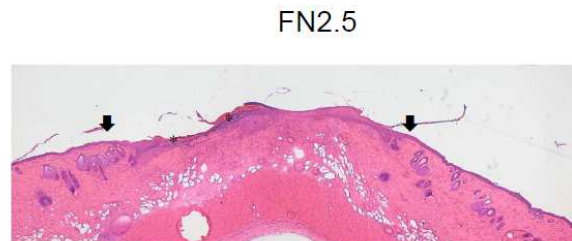
EM; 2864.1 ± 135.8
RE; 95.4 ± 4.5



EM; 2573.2 ± 217.1
RE; 85.7 ± 7.2



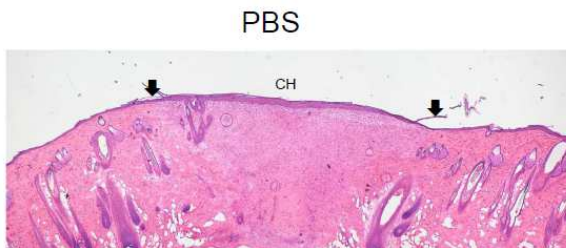
EM; 3000.0 ± 0.0
RE; 100.0 ± 0.0



EM; 2557.6 ± 222.1
RE; 85.2 ± 7.4

รูปที่ 17. ภาพถ่าย histology แสดงตัวอย่างบาดแผลบนหลังสัตว์ทดลอง (rat) 7 วัน ภายหลังจากการทำบาดแผล ภายหลังจากการให้สารทดสอบ คือ fibroin gel 1% in PBS, fibroin gel 2.5% in PBS, CMC 1% in PBS, หรือ PBS (1 ชนิดต่อบาดแผล N=8)

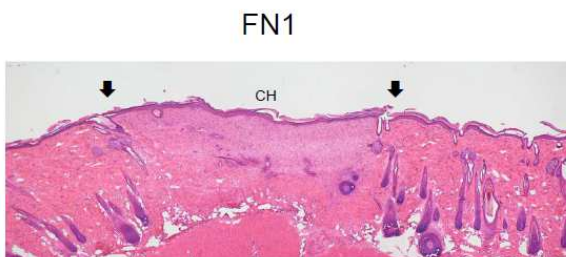
Day 14 post-wounding



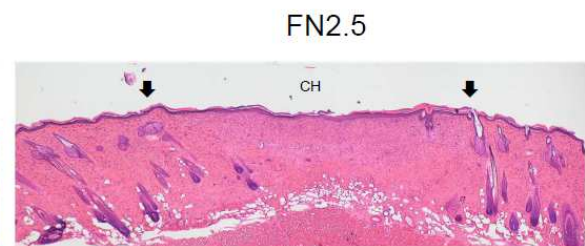
EM; 3000.0 ± 0.0
RE; 100.0 ± 0.0



EM; 3000.0 ± 0.0
RE; 100.0 ± 0.0



EM; 3000.0 ± 0.0
RE; 100.0 ± 0.0



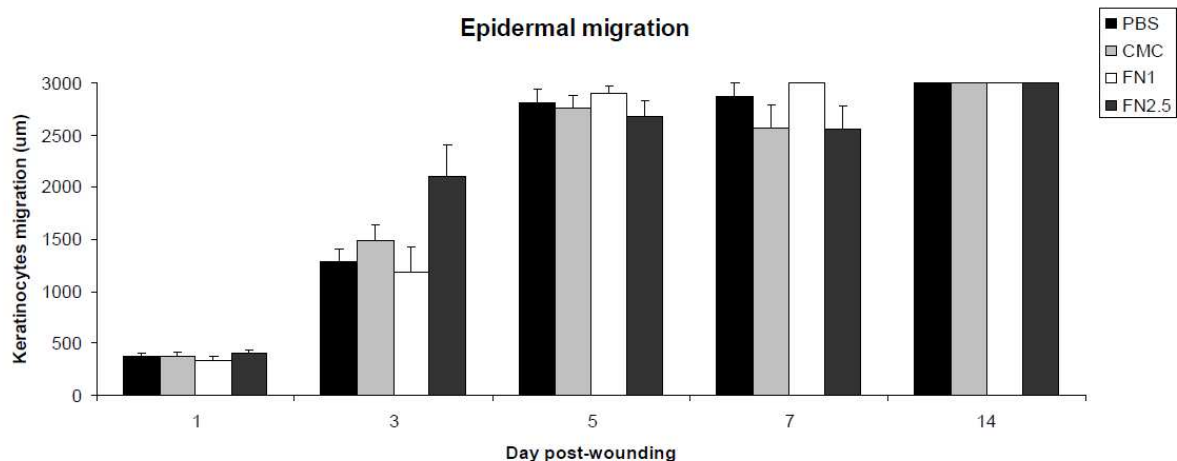
EM; 3000.0 ± 0.0
RE; 100.0 ± 0.0

รูปที่ 18. ภาพถ่าย histology แสดงตัวอย่างบาดแผลบนหลังสัตว์ทดลอง (rat) 14 วัน ภายหลังจากการทำบาดแผล ภายหลังจากการให้สารทดสอบ คือ fibroin gel 1% in PBS, fibroin gel 2.5% in PBS, CMC 1% in PBS, หรือ PBS (1 ชนิดต่อบาดแผล N=6)

ตารางที่ 4. แสดงผลการวัด และคำนวณค่า epidermal layer migration (EM), % of re-epithelialization (%RE), P/W ratio และ complete healing (CH) ของบาดแผลในสัตว์ทดลอง (rat) แต่ละกลุ่มที่ได้รับสารทดสอบ fibroin gel 1%, fibroin gel 2.5%, CMC 1%, หรือ PBS (N = 8 ยกเว้น Day14 N = 6) ในวันที่ 1, 3, 5, 7, 14 วันภายหลังการทำบาดแผล

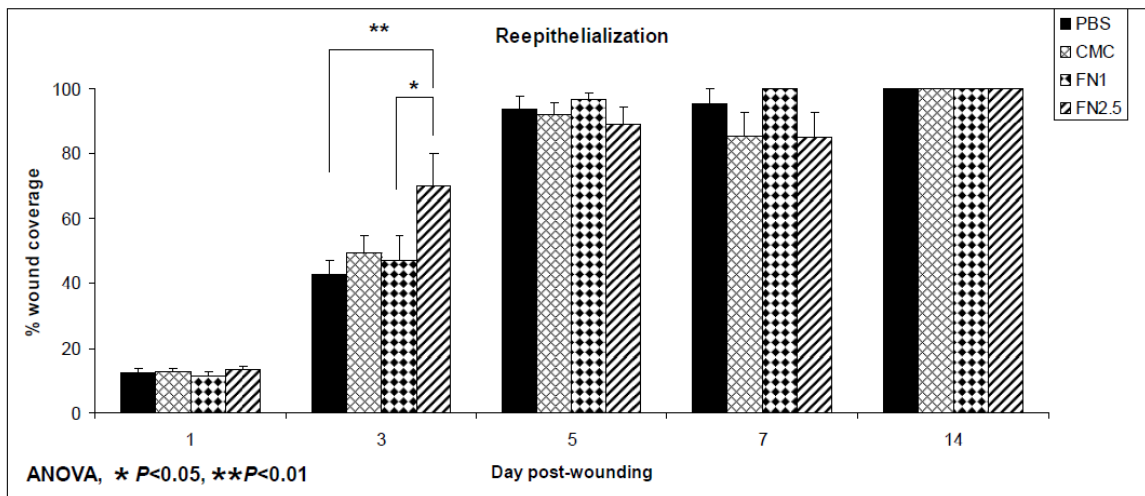
Analysis		PBS			CMC			FN1			FN2.5		
Day	Measure	Mean	SE	CH	Mean	SE	CH	Mean	SE	CH	Mean	SE	CH
1	EM	367.5	39.3	8(0)	377.6	34.1	8(0)	340.1	37.1	8(0)	404	32.5	8(0)
	%RE	12.3	1.3		12.6	1.1		11.3	1.2		13.5	1.1	
	VEP (P)	32.9	2.1		35.0	1.9		35.7	2.2		33.9	2.5	
	VEW (W)	104.9	9.7		110.3	11.0		93.2	9.5		87.3	8.2	
	P/W	3.4	0.2		3.1	0.2		2.6	0.2		2.6	0.3	
3	EM	1281.5	123.2	8(0)	1485.1	156.3	8(0)	1411.9	239.3	8(1)	2100.5	306.4	8(3)
	%RE	42.7	4.4		49.5	5.2		47	7.9		70	10.2	
	VEP (P)	39.5	2.2		38.8	2.0		37.4	1.8		36.0	2.5	
	VEW (W)	217	27.2		216	20.1		285.9	41.8		208.1	21.7	
	P/W	5.5	0.5		5.6	0.4		7.6	0.8		6	0.5	
5	EM	2814.6	126	8(6)	2758.1	118	8(5)	2898.7	74.6	8(6)	2681.6	158	8(5)
	%RE	93.8	4.2		91.9	3.9		96.6	2.4		89.3	5.2	
	VEP (P)	39.5	2.0		36.1	1.7		39.3	1.2		35.8	1.3	
	VEW (W)	255.4	34.1		259.9	45.4		253.2	31.6		246.3	17.1	
	P/W	6.9	0.8		6.8	1		6.3	0.6		6.9	0.2	
7	EM	2864.14	135.8	8(7)	2573.2	217.1	8(5)	3000	0	8(8)	2557.6	222.1	8(5)
	%RE	95.4	4.5		85.7	7.2		100	0		85.2	7.4	
	VEP (P)	35.4	1.0		35.1	1.3		35.3	1.5		35.0	1.8	
	VEW (W)	180.4	12.8		138.3	11.7		224.5	30.9		258.5	42.3	
	P/W	5.1	0.4		4.1	0.3		6.3	0.7		8.5	1.6	
14	EM	3000	0	6(6)	3000	0	6(6)	3000	0	6(6)	3000	0	6(6)
	%RE	100	0		100	0		100	0		100	0	
	VEP (P)	32.8	1.1		34.6	1.5		32.6	2.0		33.7	2.5	
	VEW (W)	103.6	12.5		73.9	6.0		78.3	7.0		80.6	5.7	
	P/W	2.8	0.4		2.2	0.2		2.5	0.2		2.5	0.2	

n=8



รูปที่ 19. ภาพ histogram แสดง epidermal migration ของชั้นผิวหนัง (epidermal layer) ของบาดแผลบนหลังสัตว์ทดลอง (rat) 1, 3, 5, 7, และ 14 วัน ภายหลังจากการทำบาดแผล ภายหลังการให้สารทดสอบ คือ fibroin gel 1% in PBS, fibroin gel 2.5% in PBS, CMC 1% in PBS, หรือ PBS (N=8 ยกเว้นวันที่ 14 N=6)

Healing effect of silk fibroin in animal (rat) model



n=8

รูปที่ 20. ภาพ histogram แสดง re-epithelialization ตัวของชั้นผิวหนัง (epidermal layer) ขอบบาดแผลบนหลังสัตว์ทดลอง (rat) 1, 3, 5, 7, และ 14 วัน ภายหลังจากการทำบาดแผล ภายหลังจากการให้สารทดสอบ คือ fibroin gel 1% in PBS, fibroin gel 2.5% in PBS, CMC 1% in PBS, หรือ PBS (N=8 ยกเว้นวันที่ 14 N=6)

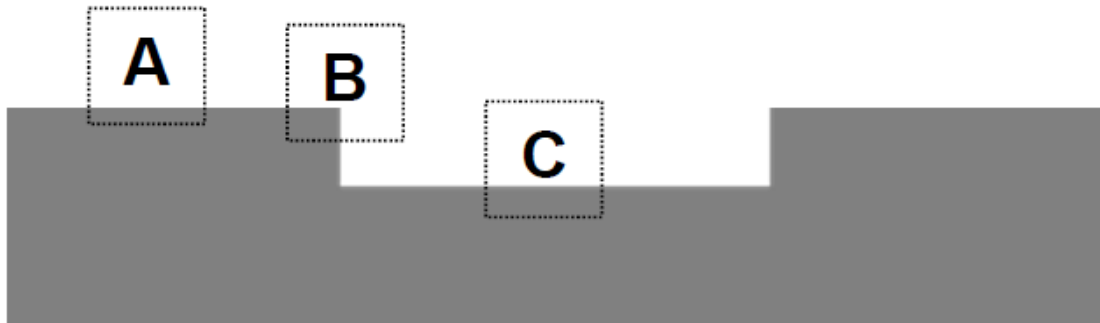
Epidermal thickness ratio of epidermal layer at wounded/peripheral skin



รูปที่ 21. ภาพ histogram แสดงอัตราส่วนความหนาตัวของชั้นผิวหนัง (epidermal layer) ของบริเวณบาดแผลกับบริเวณรอบๆ บาดแผล (ผิวหนังปกติ) บนหลังสัตว์ทดลอง (rat) 1, 3, 5, 7, และ 14 วัน ภายหลังจากการทำบาดแผล ภายหลังจากการให้สารทดสอบ คือ fibroin gel 1% in PBS, fibroin gel 2.5% in PBS, CMC 1% in PBS, หรือ PBS (N=8 ยกเว้นวันที่ 14 N=6)

3.3 การศึกษาเพื่อประเมินผล Immunohistochemistry (IHC) หรือ Immuno-fluorescent (IF) staining

เนื่องจากในการทดลอง immunostaining นั้นผู้วิจัยได้ถ่ายภาพโดยเน้นในจุดที่สำคัญในแต่ละบริเวณของบาดแผล ดังนั้นเพื่อความเข้าใจได้ง่ายขึ้นในแต่ละภาพจะแสดงตำแหน่งบนบาดแผลของภาพนั้นๆ ดังแสดงในรูปที่ 22



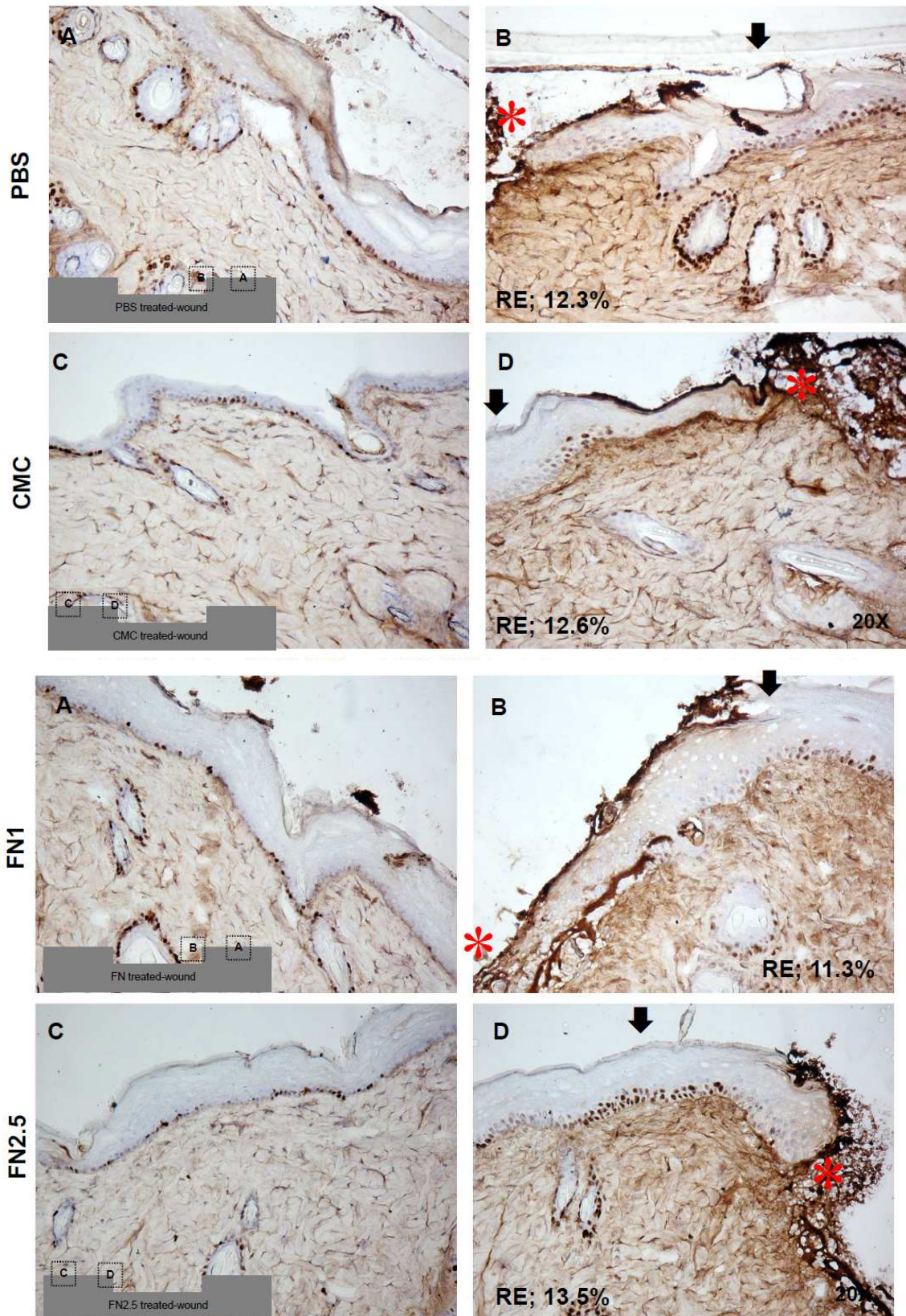
รูปที่ 22. ภาพจำลองแสดงตำแหน่งของภาพบนบาดแผลบนหลังสัตว์ทดลอง (สีทึบ) โดยตำแหน่ง A = intact or peripheral skin area, B = edge of wound, และ C = middle of wound

การศึกษาเพื่อประเมินผล Immunohistochemistry (IHC) โปรตีน Ki67

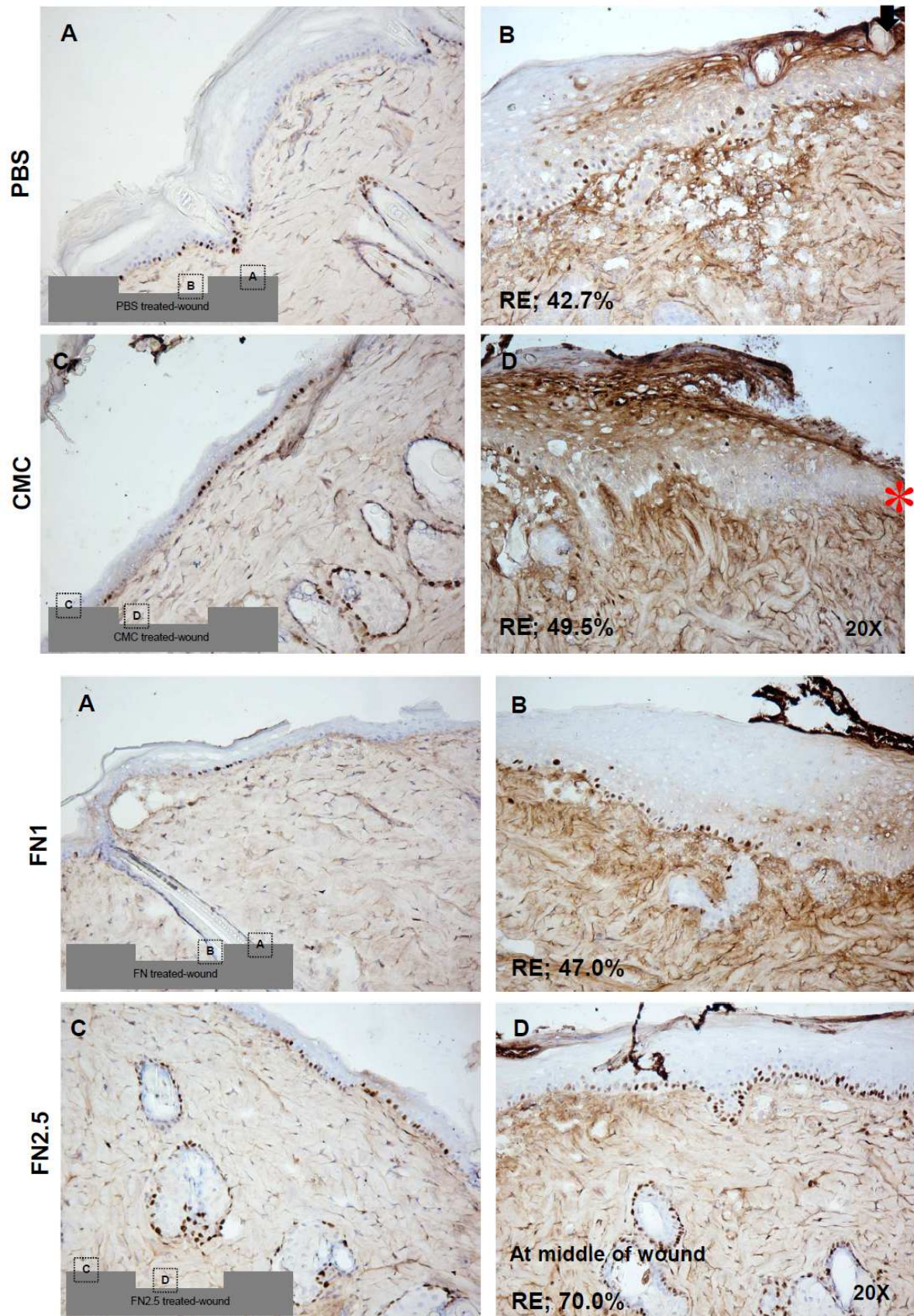
โปรตีน Ki-67 เป็นโปรตีนที่อยู่ใน nucleus ทำหน้าที่ร่วมกับ ribosomes ระหว่าง RNA transcription (Jorn, *et al.* 2006) โปรตีน Ki-67 จะมีการแสดงออก เมื่อเซลล์อยู่ในช่วงการเพิ่มจำนวนและจะไม่มีการแสดงออกในขณะที่เซลล์อยู่ในช่วงพัก (ระยะ G0, resting cell) (Klein, *et al.*, 2000) ดังนั้นจึงสามารถนำผลการแสดงออกของโปรตีน Ki-67 มาใช้เป็นตัวบ่งชี้สถานะ cell proliferation ที่กำลังเกิดขึ้นในระหว่างการฟื้นตัวของบาดแผลได้ดี (Onuma, *et al.*, 2001; Usui, *et al.*, 2008)

จากการสุ่มตัวอย่างสัตว์ทดลอง 1 ตัว ในแต่ละกลุ่มวันของการทดลอง (1, 3, 5, 7, 14 วันหลังทำบาดแผล) มาทำ immunostaining ด้วย antibody ต่อโปรตีน Ki67 (ผลแสดงในรูปที่ 23-27 และสรุปใน รูปที่ 28 และ 29 และในตารางที่ 5 และ 6) ซึ่งพอสรุปได้ว่า อัตราส่วนของจำนวนเซลล์ในชั้นผิวหนัง epidermis ที่มีการแสดงออกของโปรตีน Ki67 ระหว่างผิวหนังบริเวณบาดแผล (W) กับผิวหนังปกติรอบๆบาดแผล (P, ผิวหนังปกติ) บนหลังสัตว์ทดลอง (rat) 1, 3, 5, 7, และ 14 วัน ภายหลังจากการทำบาดแผล ภายหลังการให้สารทดสอบ คือ fibroin gel 1% in PBS, fibroin gel 2.5% in PBS, CMC 1% in PBS, หรือ PBS ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 5 และรูปที่ 28) โดยการใช้สูตรคำนวณ ด้านล่าง ยกเว้นในวันที่ 5 ซึ่งพบว่ากลุ่ม fibroin 2.5% มีจำนวนบริเวณบาดแผลมีเซลล์ที่อยู่ในระยะ proliferation (Ki67) มากกว่ากลุ่มที่ได้รับสารทดสอบอื่นๆ หากคิดเฉพาะร้อยละจำนวนเซลล์ในชั้นผิวหนัง epidermis ที่มีการแสดงออกของโปรตีน Ki67 ผิวหนังบริเวณบาดแผล (รูปที่ 29 และตารางที่ 6) จะเห็นผลที่ชัดเจนขึ้น โดยผลแสดงบ่งถึงร้อยละของเซลล์ในชั้น epidermis ที่บริเวณบาดแผลที่อยู่ในระยะ proliferation phase จะไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในช่วงฟื้นตัวของบาดแผลไม่ว่าจะได้รับการทดสอบใดๆ แต่จะขึ้นอยู่กับว่ามีปริมาณเซลล์ทั้งหมดเท่าใด ซึ่งในกลุ่ม fibroin gel จะมีปริมาณเซลล์มากกว่า โดยเฉพาะวันที่ 3 (รูปที่ 20 และ 21)

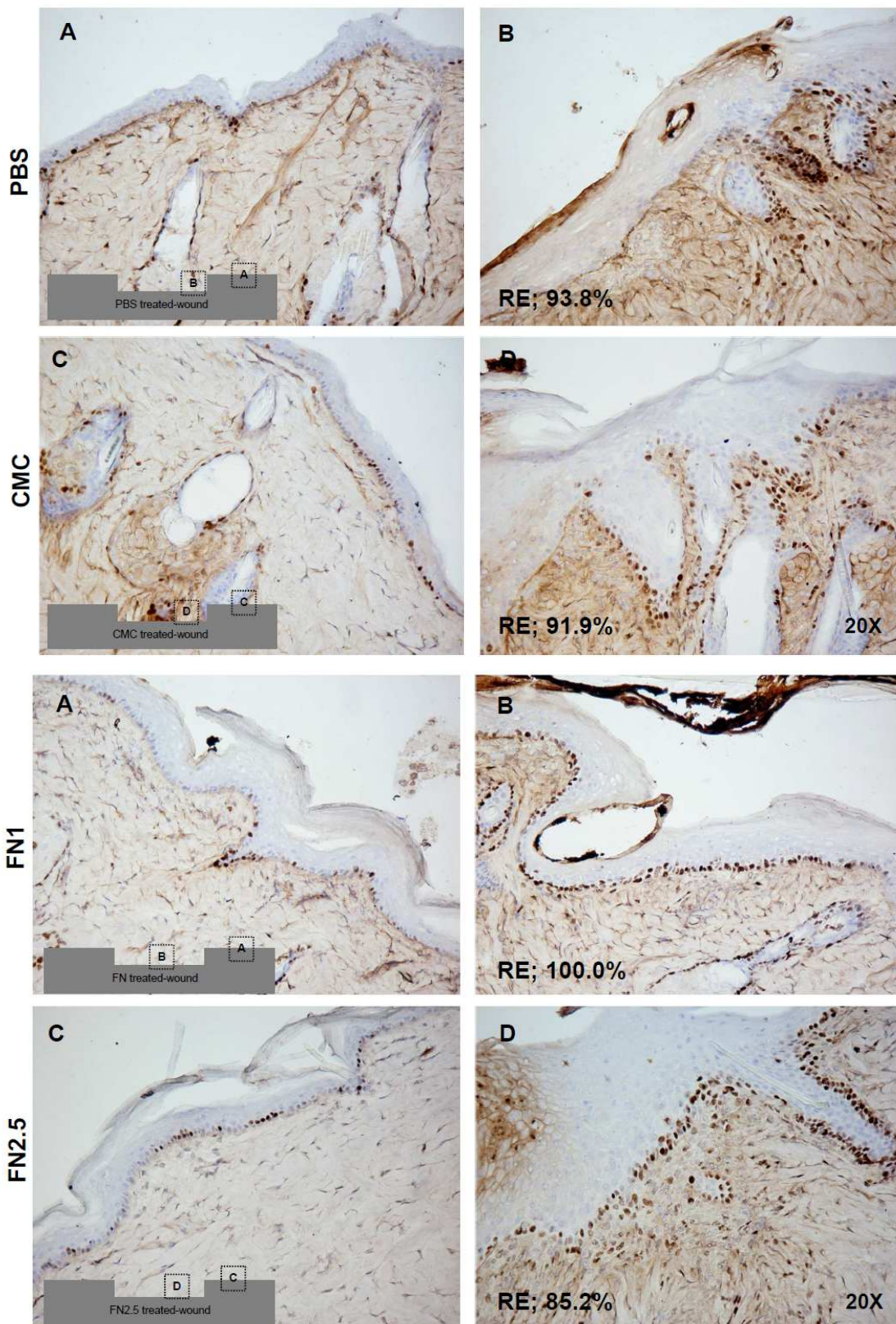
% mean ratio ของเซลล์ในชั้นผิวหนัง epidermis ที่มีการแสดงออกของโปรตีน Ki67 ระหว่างผิวหนังบริเวณบาดแผลกับผิวหนังปกติ = $[(\text{Wound} - \text{Intact})/\text{Intact}] \times 100$



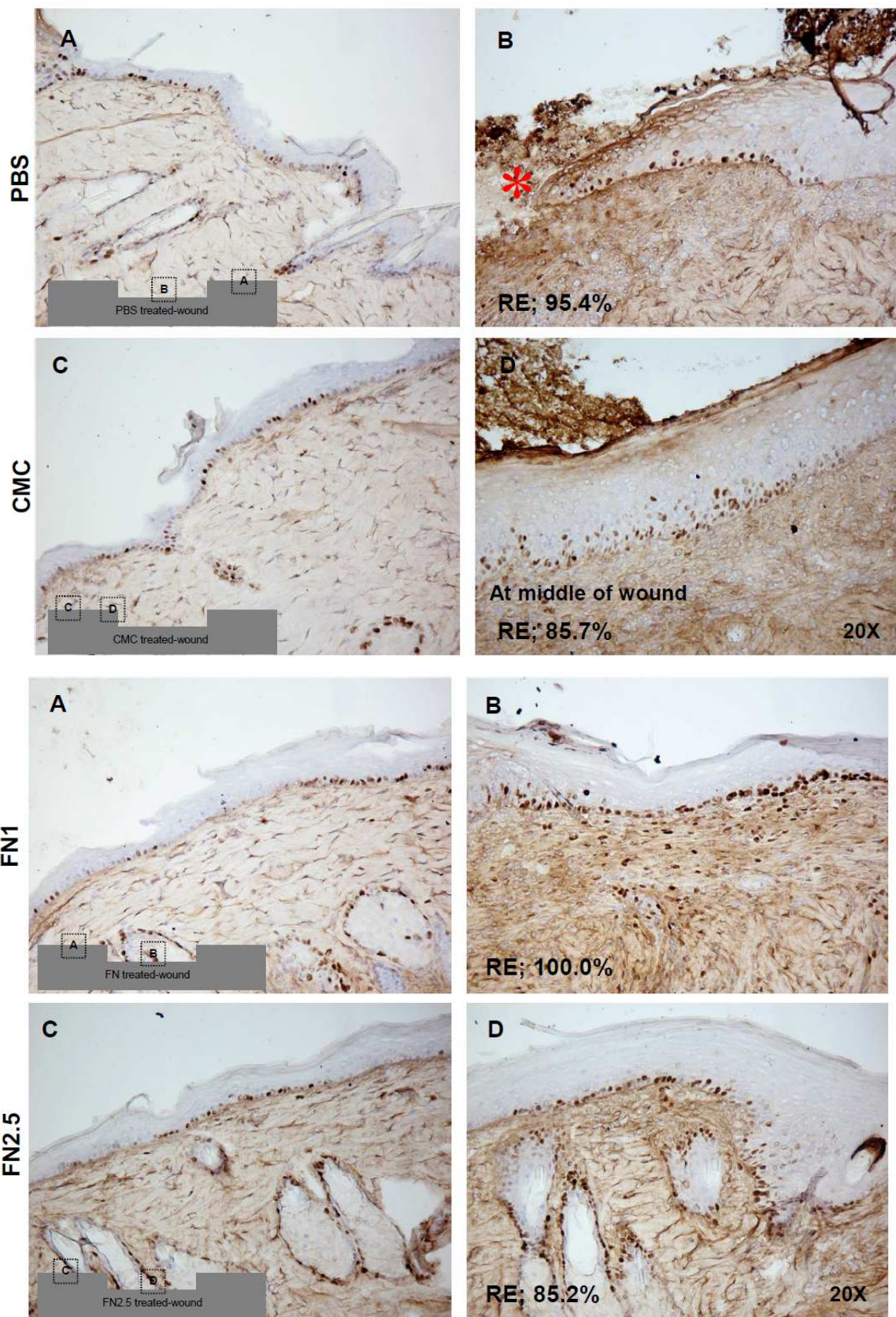
รูปที่ 23. ภาพถ่าย immune-staining ของโปรตีน Ki67 บนบาดแผลบนหลังสัตว์ทดลอง (rat) 1 วัน ภายหลังจากการทำบาดแผล ภายหลังจากการให้สารทดสอบ คือ fibroin gel 1% in PBS, fibroin gel 2.5% in PBS, CMC 1% in PBS, หรือ PBS



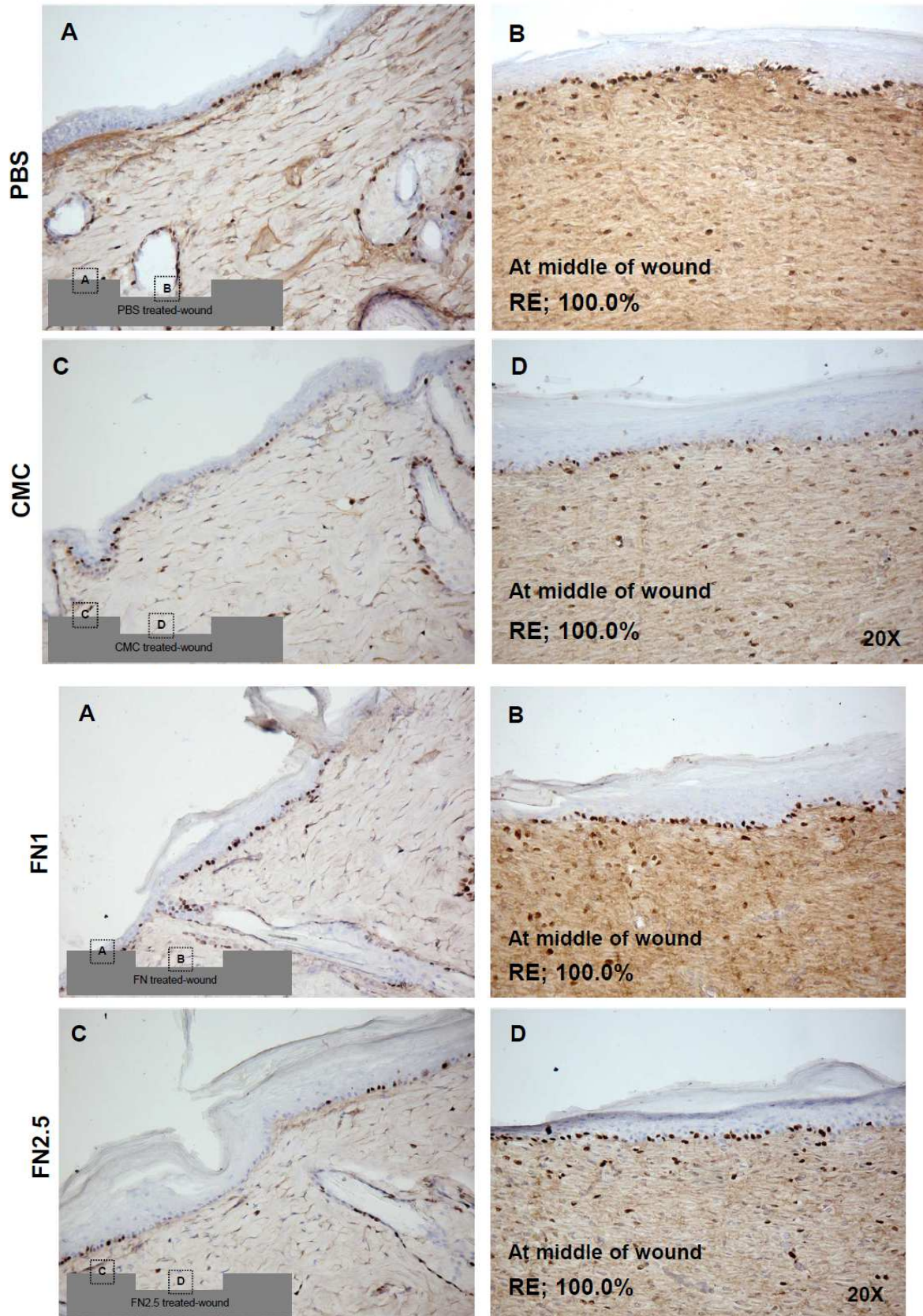
รูปที่ 24. ภาพถ่าย immune-staining ของโปรตีน Ki67 บนบาดแผลบนหลังสัตว์ทดลอง (rat) 3 วัน ภายหลังจากการทำบาดแผล ภายหลังจากการให้สารทดสอบ คือ fibroin gel 1% in PBS, fibroin gel 2.5% in PBS, CMC 1% in PBS, หรือ PBS



รูปที่ 25. ภาพถ่าย immune-staining ของโปรตีน Ki67 บนบาดแผลบนหลังสัตว์ทดลอง (rat) 5 วัน ภายหลังจากการทำบาดแผล ภายหลังจากการให้สารทดสอบ คือ fibroin gel 1% in PBS, fibroin gel 2.5% in PBS, CMC 1% in PBS, หรือ PBS



รูปที่ 26. ภาพถ่าย immune-staining ของโปรตีน Ki67 บนบาดแผลบนหลังสัตว์ทดลอง (rat) 7 วัน ภายหลังจากการทำบาดแผล ภายหลังจากการให้สารทดสอบ คือ fibroin gel 1% in PBS, fibroin gel 2.5% in PBS, CMC 1% in PBS, หรือ PBS



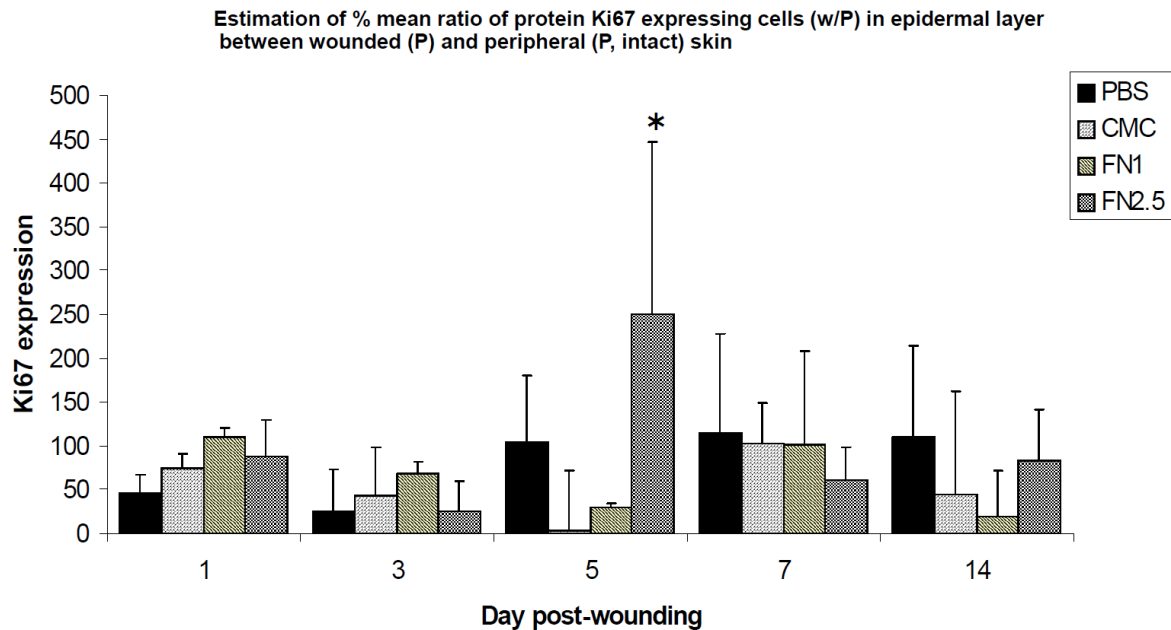
รูปที่ 27. ภาพถ่าย immune-staining ของโปรตีน Ki67 บนบาดแผลบนหลังสัตว์ทดลอง (rat) 14 วัน หลังจากการทำการทำบาดแผล ภายหลังการให้สารทดสอบ คือ fibroin gel 1% in PBS, fibroin gel 2.5% in PBS, CMC 1% in PBS, หรือ PBS

ตารางที่ 5 แสดงค่าโดยประมาณเป็นร้อยละของจำนวนเซลล์ในชั้นผิวหนัง epidermis ที่มีการแสดงออกของโปรตีน Ki67 และแสดงค่าอัตราส่วนของ Ki67 expression ระหว่างผิวหนังบริเวณบาดแผล กับผิวหนังปกติรอบๆบาดแผล

Estimation of % protein Ki67 expressing cells in epidermal layer at peripheral (intact) and wounded skins, and % mean ratio of Ki67 expression between wounded and peripheral skin

Cell proliferation index (Ki67)														
Day 1			Day 3			Day 5			Day 7			Day 14		
Treats	Intact	±SD	W	±SD	%Mean±SD	Intact	±SD	W	±SD	%Mean±SD	Intact	±SD	W	±SD
PBS	42.0	16.5	58.6	15.2	45.4±22.0	48.3	13.5	56.6	4.9	26.0±46.9	30.6	7.5	59.0	5.0
											104.6±75.1	34.6	14.5	63.3
											1.5	114.2±112.9	31.3	14.0
													56.3	2.8
														110.3±104.5
CMC	35.6	8.3	61.3	10.2	74.3±16.5	42.0	10.1	56.3	10.6	43.0±54.9	39.3	10.4	39.3	22.0
											3.7±67.8	35.3	9.0	69.0
											7.0	102.3±46.6	33.6	12.6
													39.0	14.7
														44.1±117.9
FN1	31.6	4.9	67.0	13.0	110.6±9.4	36.0	5.2	61.0	11.5	69.0±12.5	48.6	16.0	63.3	20.5
											30.4±3.1	39.6	17.0	67.6
											3.0	101.3±107.2	49.3	15.9
													53.6	5.1
														19.7±51.1
FN2.5	32.6	7.5	60.0	12.7	87.6±41.5	49.3	6.4	60.0	7.9	24.6±34.4	22.3	8.1	67.6	7.5
											250.2±196.5	37.0	12.4	57.0
											11.3	60.5±37.8	35.0	6.2
													62.0	11.7
														82.7±58.9

N=1, 3 measurements



รูปที่ 28. ภาพ histogram แสดงแสดงค่าโดยประมาณเป็นอัตราส่วนของจำนวนเซลล์ในชั้นผิวหนัง epidermis ที่มีการแสดงออกของโปรตีน Ki67 ระหว่างผิวหนังบริเวณบาดแผล (W) กับผิวหนังปกติรอบๆบาดแผล (P, ผิวหนังปกติ) บนหลังสัตว์ทดลอง (rat) 1, 3, 5, 7, และ 14 วัน ภายหลังจากการทำบาดแผล ภายหลังจากให้สารทดสอบ คือ fibroin gel 1% in PBS, fibroin gel 2.5% in PBS, CMC 1% in PBS, หรือ PBS (N=1, 3 measurement)

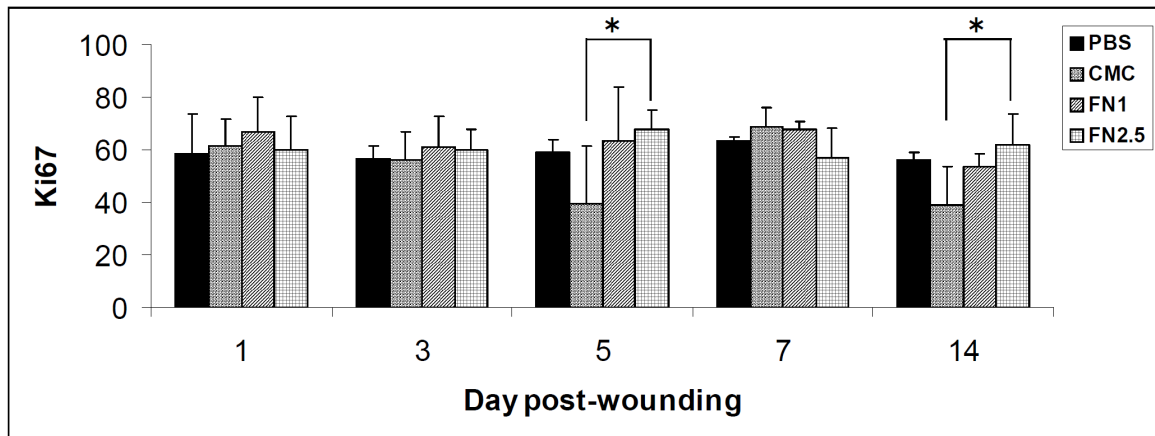
ตารางที่ 6. แสดงค่าโดยประมาณเป็นร้อยละของจำนวนเซลล์ในชั้นผิวหนัง epidermis ที่มีการแสดงออกของโปรตีน Ki67 ที่ผิวหนังบริเวณบาดแผล

Estimation of % protein Ki67 expressing cells in epidermal layer at wounded skin

Cell proliferatin (Ki67)										
Treats	Day 1		Day 3		Day 5		Day 7		Day 14	
	Wound	±SD	Wound	±SD	Wound	±SD	Wound	±SD	Wound	±SD
PBS	58.6	15.2	56.6	4.9	59.0	5.0	63.3	1.5	56.3	2.8
CMC	61.3	10.2	56.3	10.6	39.3	22.0	69.0	7.0	39.0	14.7
FN1	67.0	13.0	61.0	11.5	63.3	20.5	67.6	3.0	53.6	5.1
FN2.5	60.0	12.7	60.0	7.9	67.6	7.5	57.0	11.3	62.0	11.7

N=1, 3 measurements

Estimation of % protein Ki67 expressing cells in epidermal layer at wounded skin



ANOVA, * $P < 0.05$ N=1, 3 measurements

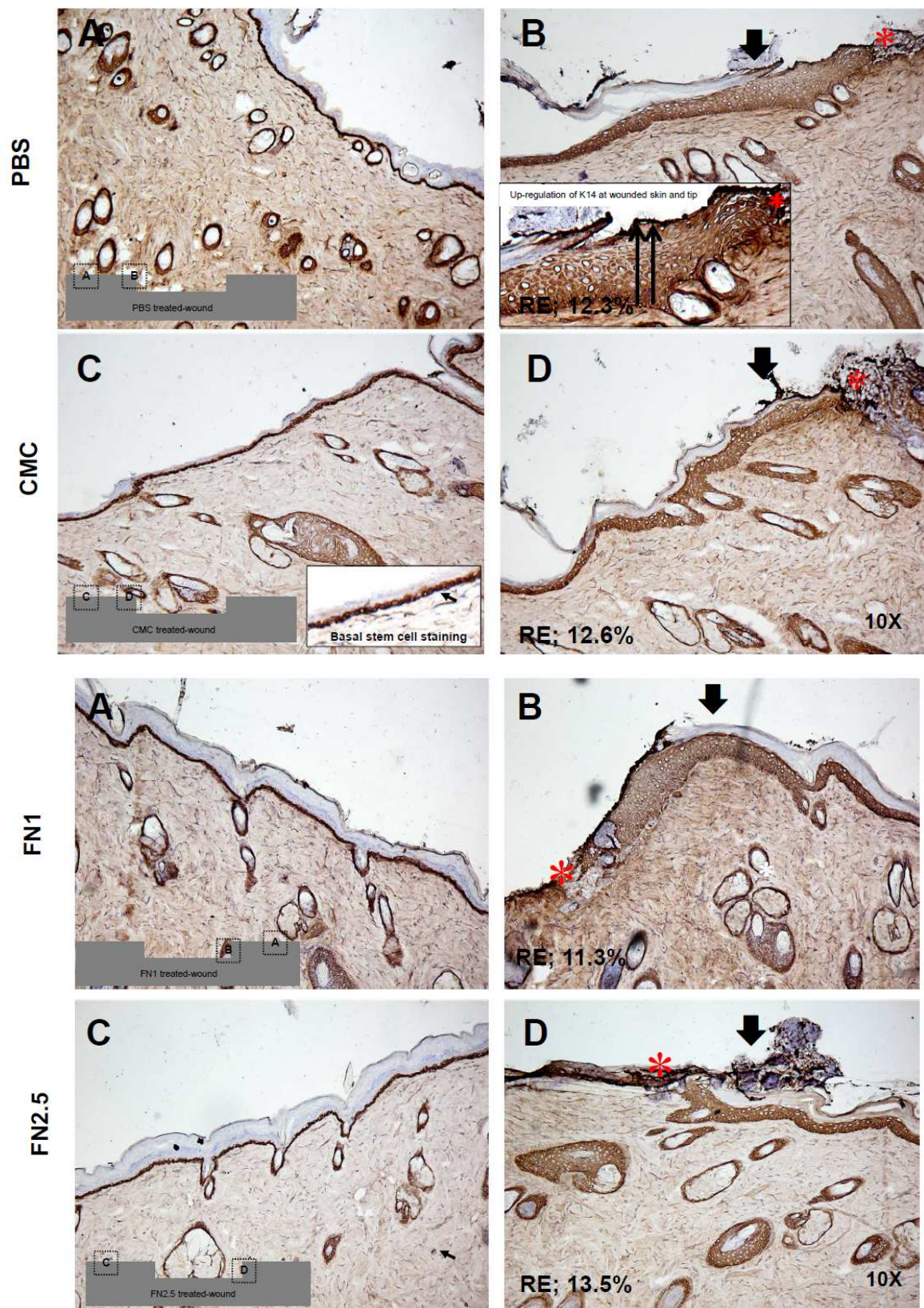
รูปที่ 29. ภาพ histogram แสดงค่าโดยประมาณเป็นร้อยละของจำนวนเซลล์ในชั้นผิวหนัง epidermis ที่มีการแสดงออกของโปรตีน Ki67 ที่ผิวหนังบริเวณบาดแผล (W) บนหลังสัตว์ทดลอง (rat) 1, 3, 5, 7, และ 14 วัน หลังจากการทำการบาดแผล หลังจากการให้สารทดสอบ คือ fibroin gel 1% in PBS, fibroin gel 2.5% in PBS, CMC 1% in PBS, หรือ PBS (N=1, 3 measurement)

การศึกษาเพื่อประเมินผล Immunohistochemistry (IHC) โปรตีน CK14, CK1/10 และ collagen

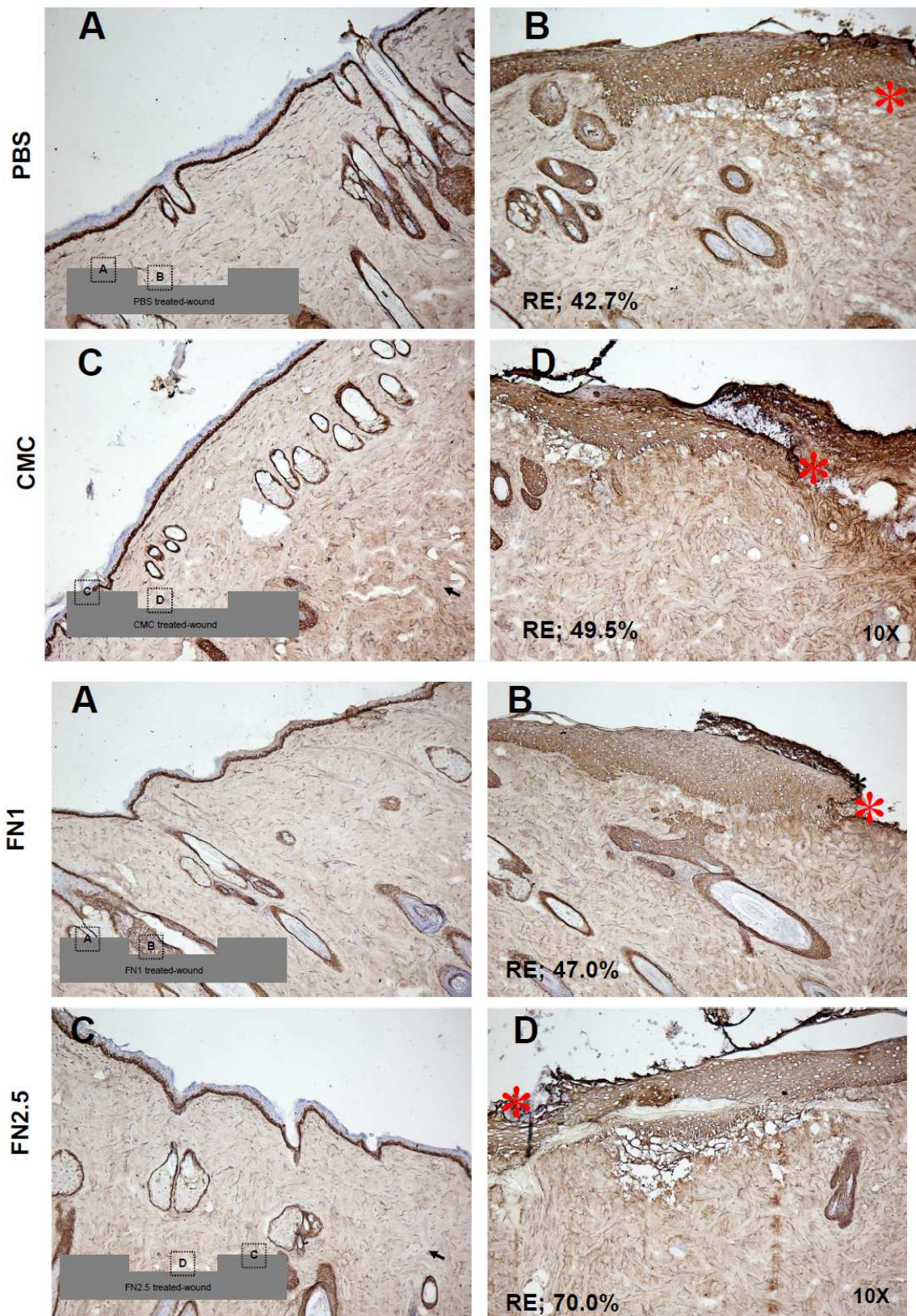
โปรตีน cytokeratins เป็นโปรตีนที่สร้างโดยเซลล์ keratinocytes ของผิวหนัง โดยจะถูกสร้างและทำหน้าที่อยู่ใน cytoplasm โดยปกติ cytokeratins มีหลายรูปแบบมากกว่า 20 รูปแบบ (isoforms) และจะจับคู่กันแบบ hetero-dimers ระหว่าง cytokeratin ที่ต่างรูปแบบกันแบบเจาะจง เช่น cytokeratin14 (K14) จะจับคู่กับ cytokeratin5 (K5) cytokeratin1 (K1) จะจับคู่กับ cytokeratin10 (K10) เป็นต้น cytokeratins ทำหน้าที่เป็นโครงสร้างให้เกิดการเสถียรของชั้นผิวหนัง (epidermal stability) (Moll, *et al.*, 1998) รวมถึงการทำปฏิกิริยา (interact) กับโปรตีนชนิดอื่นๆ ในสภาวะผิวหนังปกติการแสดงออกของโปรตีน cytokeratin 1/10 (K1/10) จะปรากฏในชั้น spinous และชั้น granular layer (suprabasal layer) ของ epidermis เป็นการบ่งบอกถึงสภาวะการเปลี่ยนแปลงแบบ differentiation ของเซลล์ keratinocytes ในชั้นนั้นๆ ในทางกลับกัน การแสดงออกของโปรตีน cytokeratin 5/14 (K5/14) ในชั้น basal layer ของ epidermis เป็นการบ่งบอกถึงสภาวะ un-differentiation ของเซลล์ keratinocytes ในผิวหนังที่อยู่ระหว่างการฟื้นตัวของบาดแผลจะพบการแสดงออกของโปรตีน K5 และ K14 ที่ epidermal migrating tip

โปรตีน collagen เป็นโปรตีนส่วนประกอบของ connective tissue โดยเฉพาะ fibrous tissues เช่น tendon, ligament, ผิวหนัง เป็นต้น เซลล์ fibroblast จะเป็นเซลล์ที่สร้าง collagen ซึ่ง collagen จะประกอบด้วยสายโปรตีน 3 สาย (triple helix) และจะมี common motifs ของ amino acid sequence คือ glycine-proline-X และ glycine-X-hydroxyproline (โดย X จะเป็น amino acid อื่นๆ) อย่างน้อย collagen มีมากกว่า 28 ชนิดที่พบบ่อยมีอยู่ 5 ชนิด คือ collagen I, II, III, IV, และ V โดย ผิวหนังจะพบ collagen type I มากที่สุด

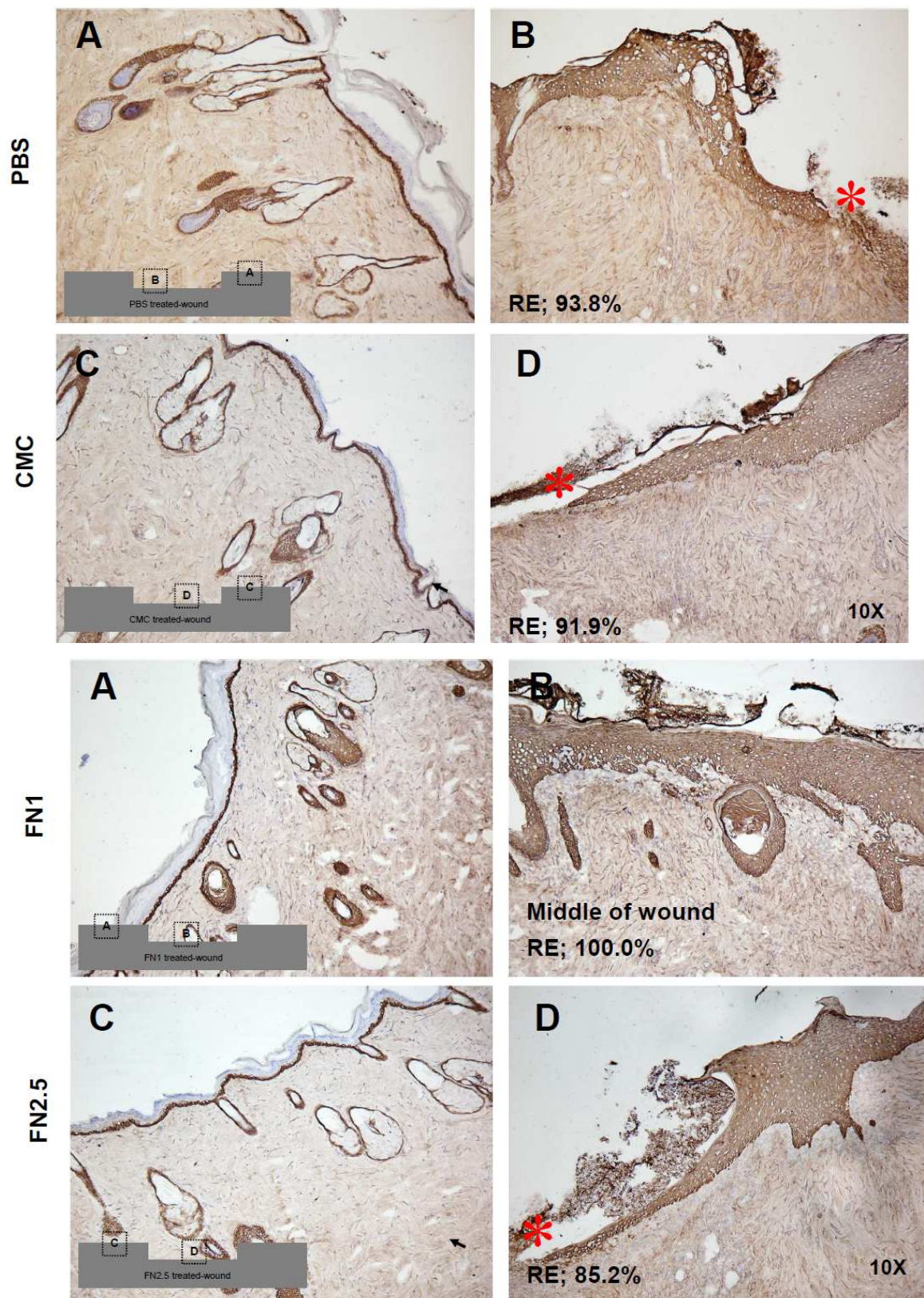
จากผลการย้อม immunostaining ของ CK14 (รูปที่ 30-34), CK1/10 (รูปที่ 35-39) และ collagen type I (รูปที่ 40-45) พบว่าบาดแผลทุกกลุ่มมีการแสดงออกของโปรตีนพื้นฐานของผิวหนังที่เป็นปกติ



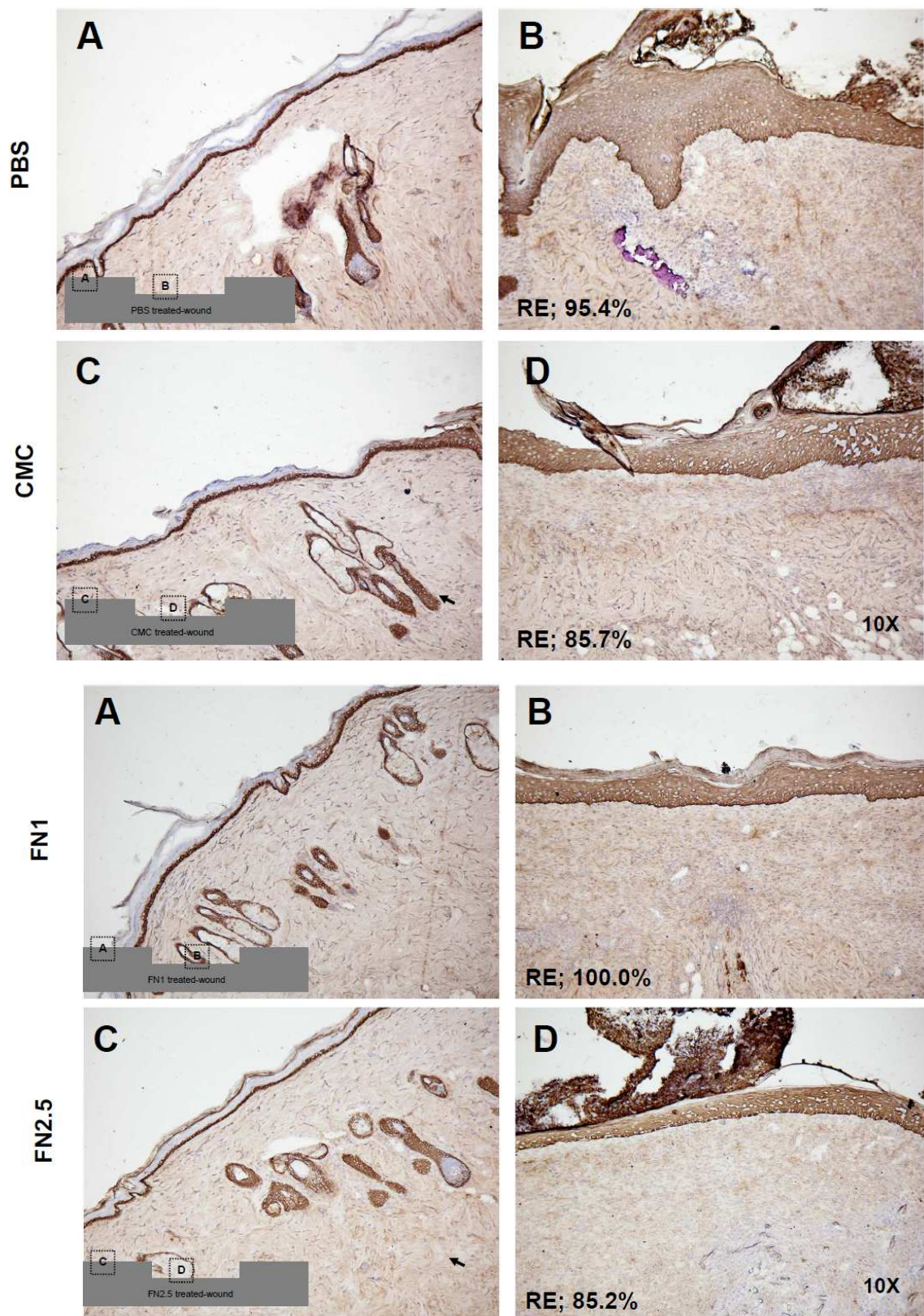
รูปที่ 30. ภาพถ่าย immune-staining ของโปรตีน CK14 บนบาดแผลบนหลังสัตว์ทดลอง (rat) 1 วัน หลังจากการทำการทำบาดแผล ภายหลังการให้สารทดสอบ คือ fibroin gel 1% in PBS, fibroin gel 2.5% in PBS, CMC 1% in PBS, หรือ PBS



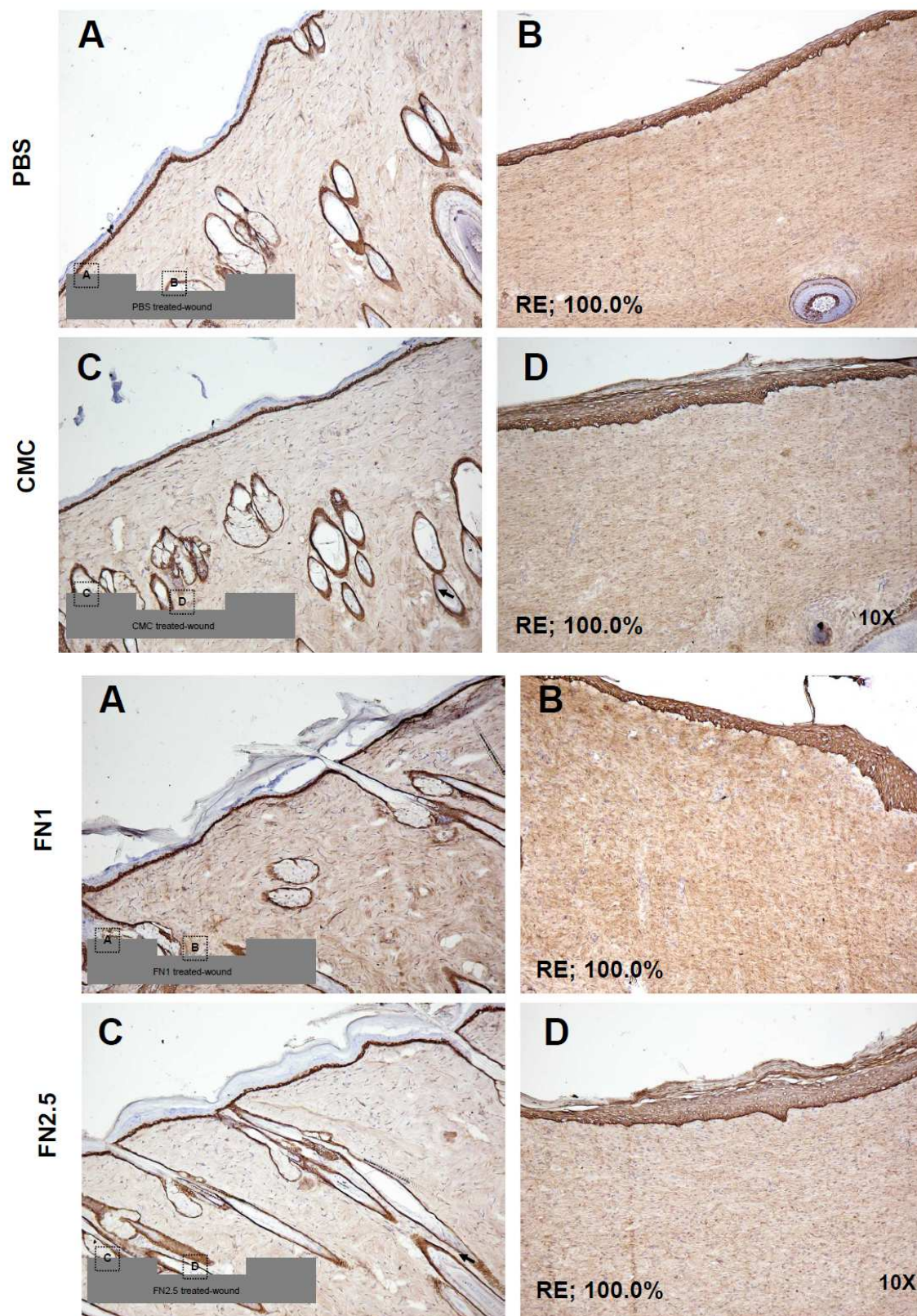
รูปที่ 31. ภาพถ่าย immune-staining ของโปรตีน CK14 บนบาดแผลบนหลังสัตว์ทดลอง (rat) 3 วัน ภายหลังจากการทำบาดแผล ภายหลังจากให้สารทดสอบ คือ fibroin gel 1% in PBS, fibroin gel 2.5% in PBS, CMC 1% in PBS, หรือ PBS



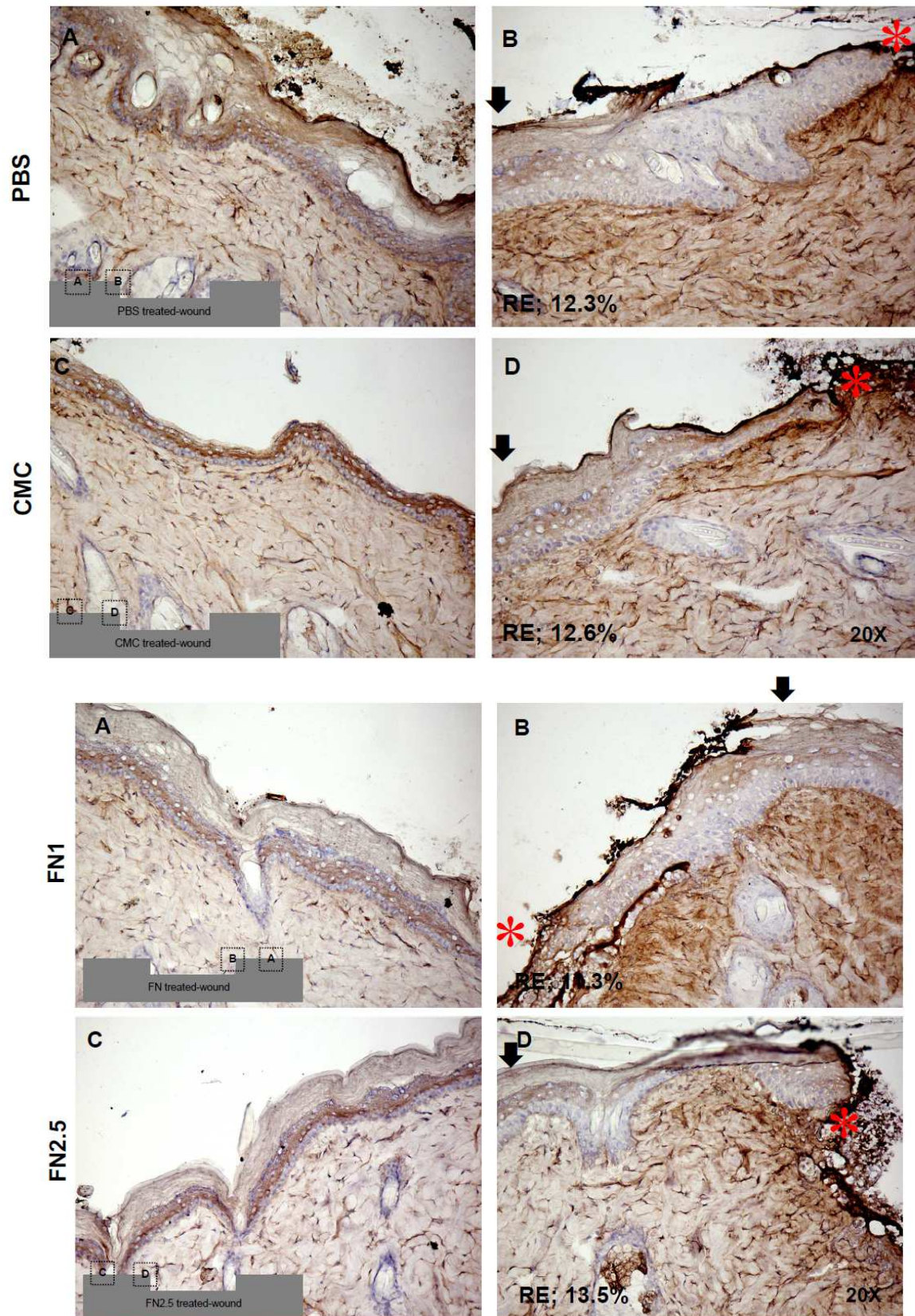
รูปที่ 32. ภาพถ่าย immune-staining ของโปรตีน CK14 บนบาดแผลบนหลังสัตว์ทดลอง (rat) 5 วัน หลังจากการทำการบำบัดแผล ภายหลังการให้สารทดสอบ คือ fibroin gel 1% in PBS, fibroin gel 2.5% in PBS, CMC 1% in PBS, หรือ PBS



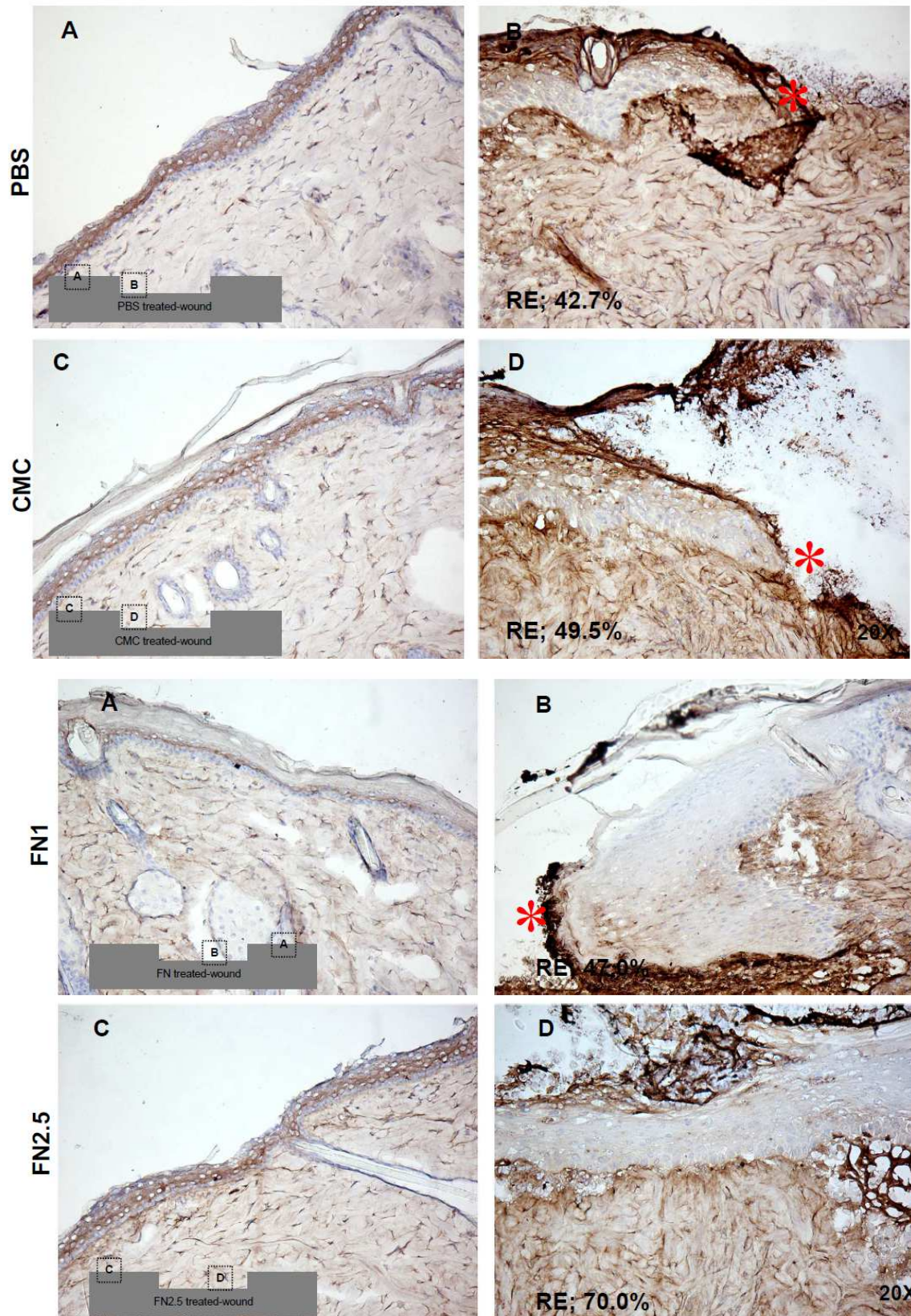
รูปที่ 33. ภาพถ่าย immune-staining ของโปรตีน CK14 บนบาดแผลบนหลังสัตว์ทดลอง (rat) 7 วัน ภายหลังจากการทำบาดแผล ภายหลังจากการให้สารทดสอบ คือ fibroin gel 1% in PBS, fibroin gel 2.5% in PBS, CMC 1% in PBS, หรือ PBS



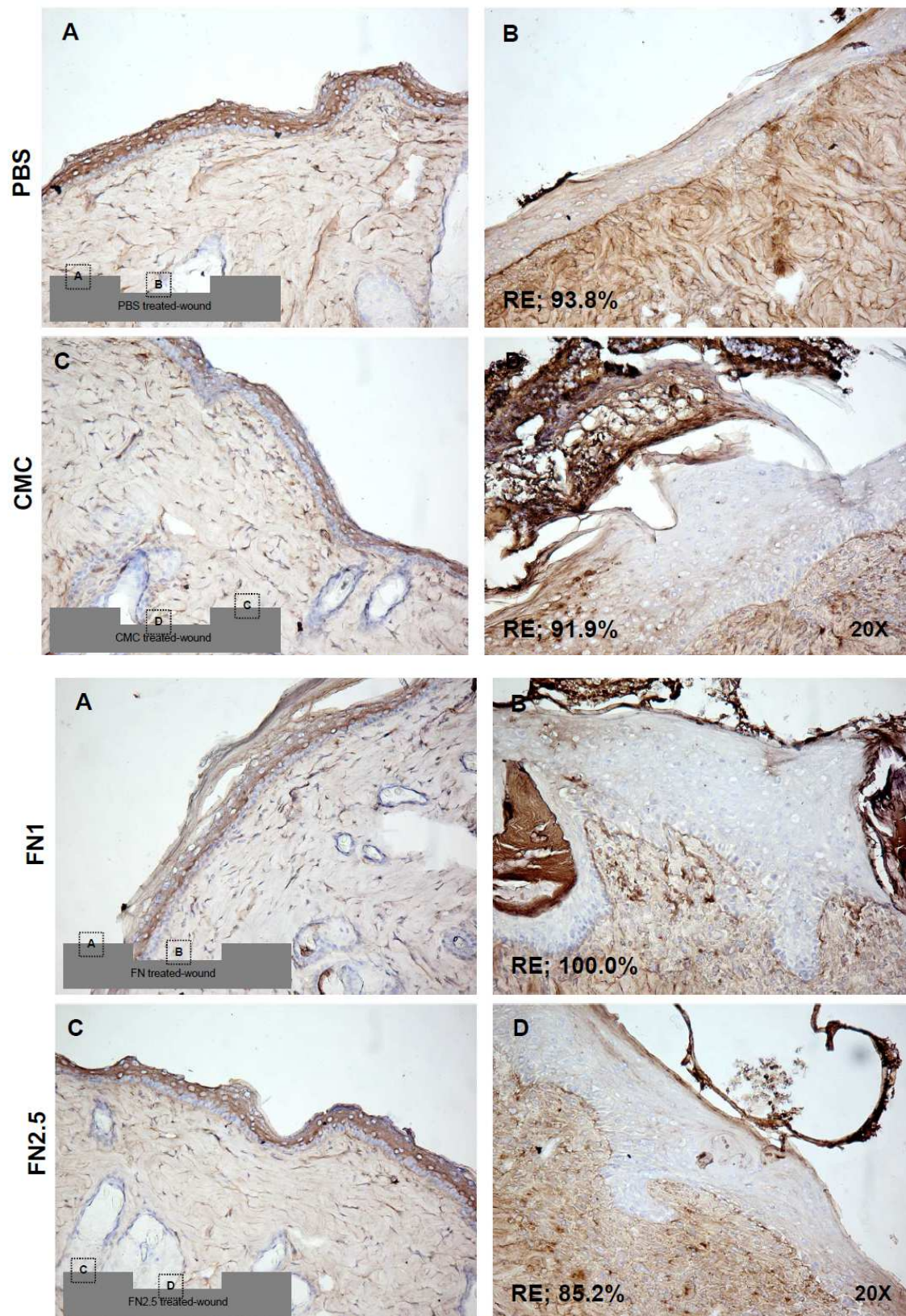
รูปที่ 34. ภาพถ่าย immune-staining ของโปรตีน CK14 บนบาดแผลบนหลังสัตว์ทดลอง (rat) 14 วัน หลังจากการทำการทำบาดแผล ภายหลังการให้สารทดสอบ คือ fibroin gel 1% in PBS, fibroin gel 2.5% in PBS, CMC 1% in PBS, หรือ PBS



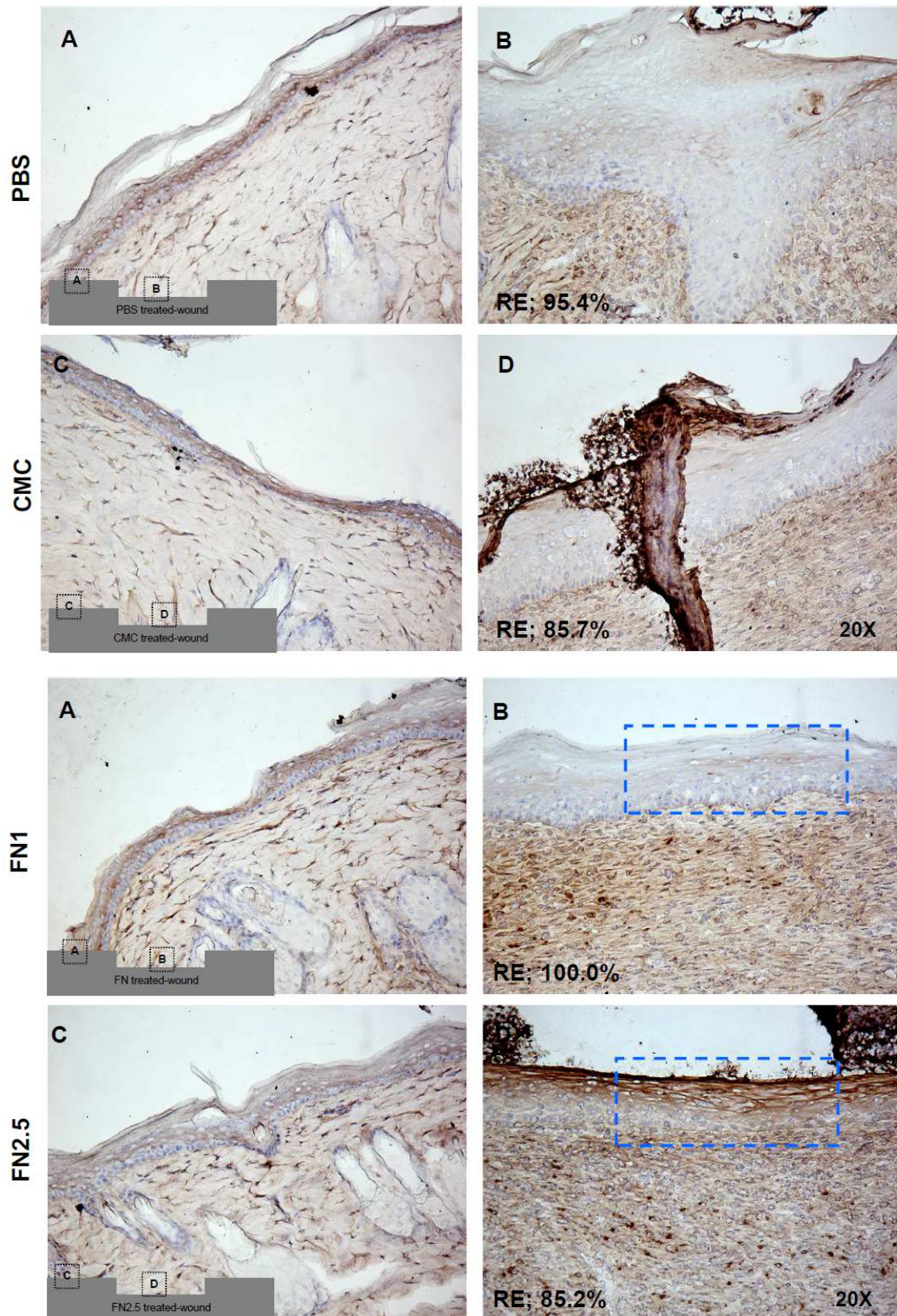
รูปที่ 35. ภาพถ่าย immune-staining ของโปรตีน CK1/10 บนบาดแผลบนหลังสัตว์ทดลอง (rat) 1 วัน หลังจากการทำการทำบาดแผล ภายหลังการให้สารทดสอบ คือ fibroin gel 1% in PBS, fibroin gel 2.5% in PBS, CMC 1% in PBS, หรือ PBS



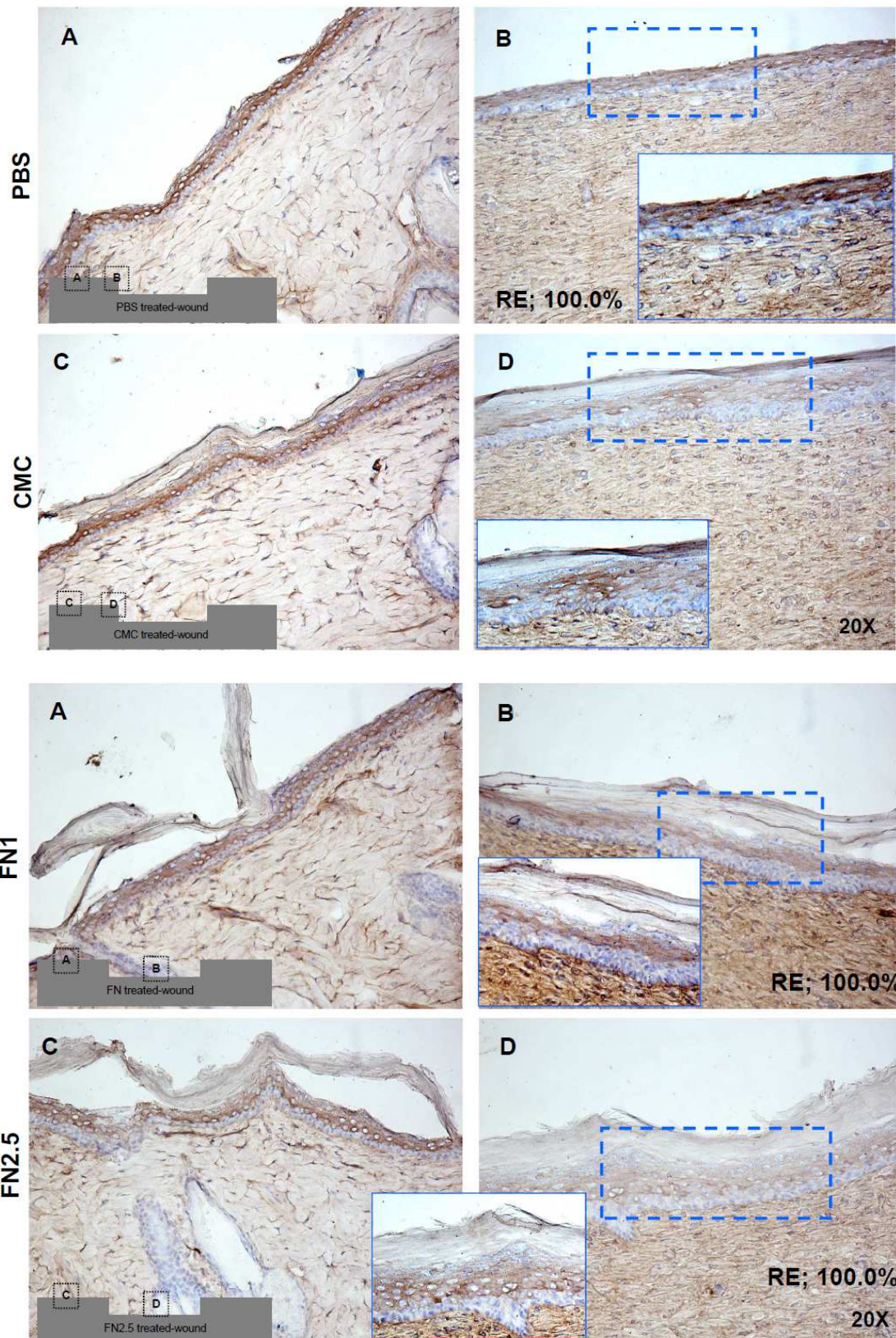
รูปที่ 36. ภาพถ่าย immune-staining ของโปรตีน CK1/10 บนบาดแผลบนหลังสัตว์ทดลอง (rat) 3 วัน ภายหลังจากการทำบาดแผล ภายหลังจากให้สารทดสอบ คือ fibroin gel 1% in PBS, fibroin gel 2.5% in PBS, CMC 1% in PBS, หรือ PBS



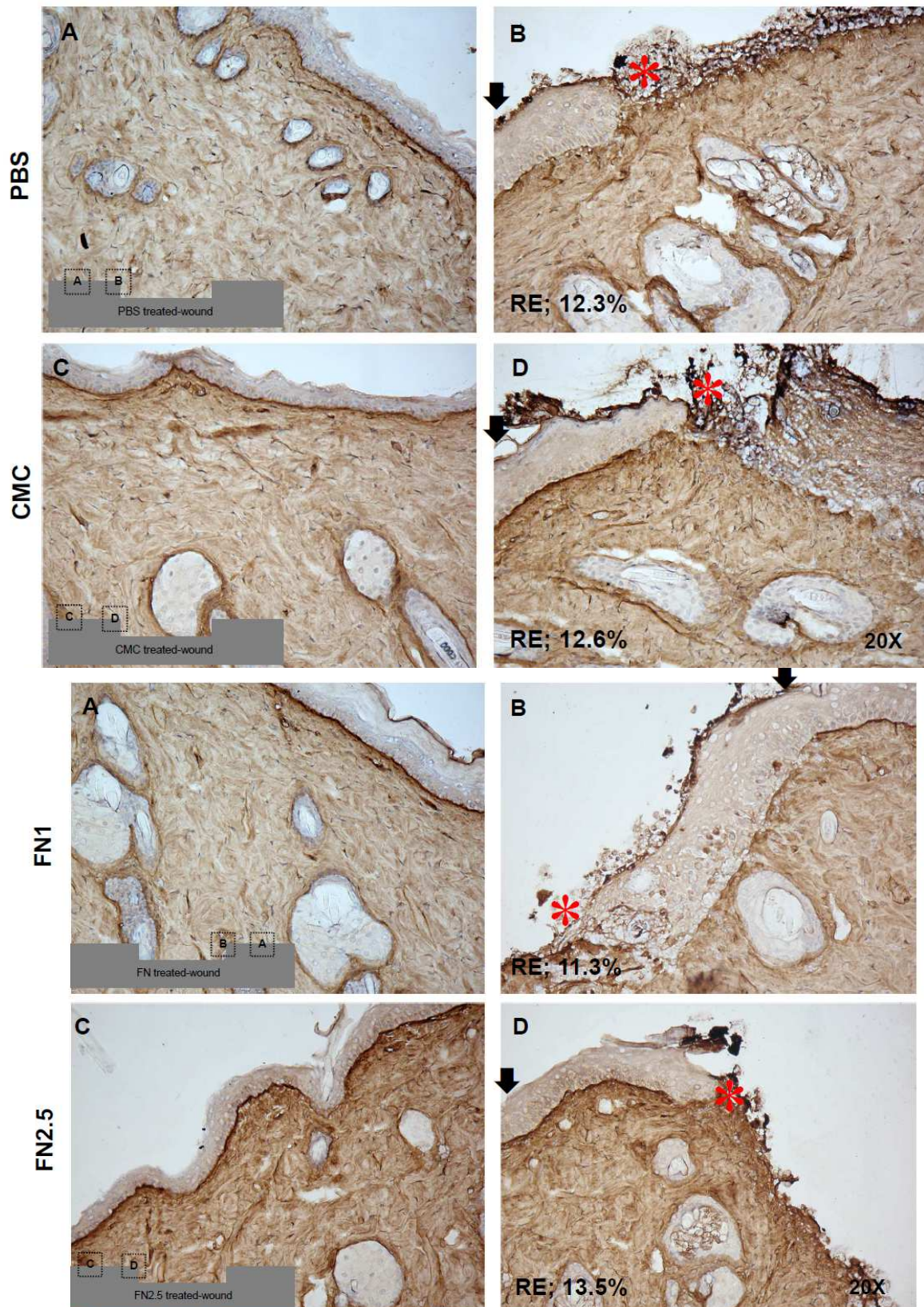
รูปที่ 37. ภาพถ่าย immune-staining ของโปรตีน CK1/10 บนบาดแผลบนหลังสัตว์ทดลอง (rat) 5 วัน ภายหลังจากการทำบาดแผล ภายหลังการให้สารทดสอบ คือ fibroin gel 1% in PBS, fibroin gel 2.5% in PBS, CMC 1% in PBS, หรือ PBS



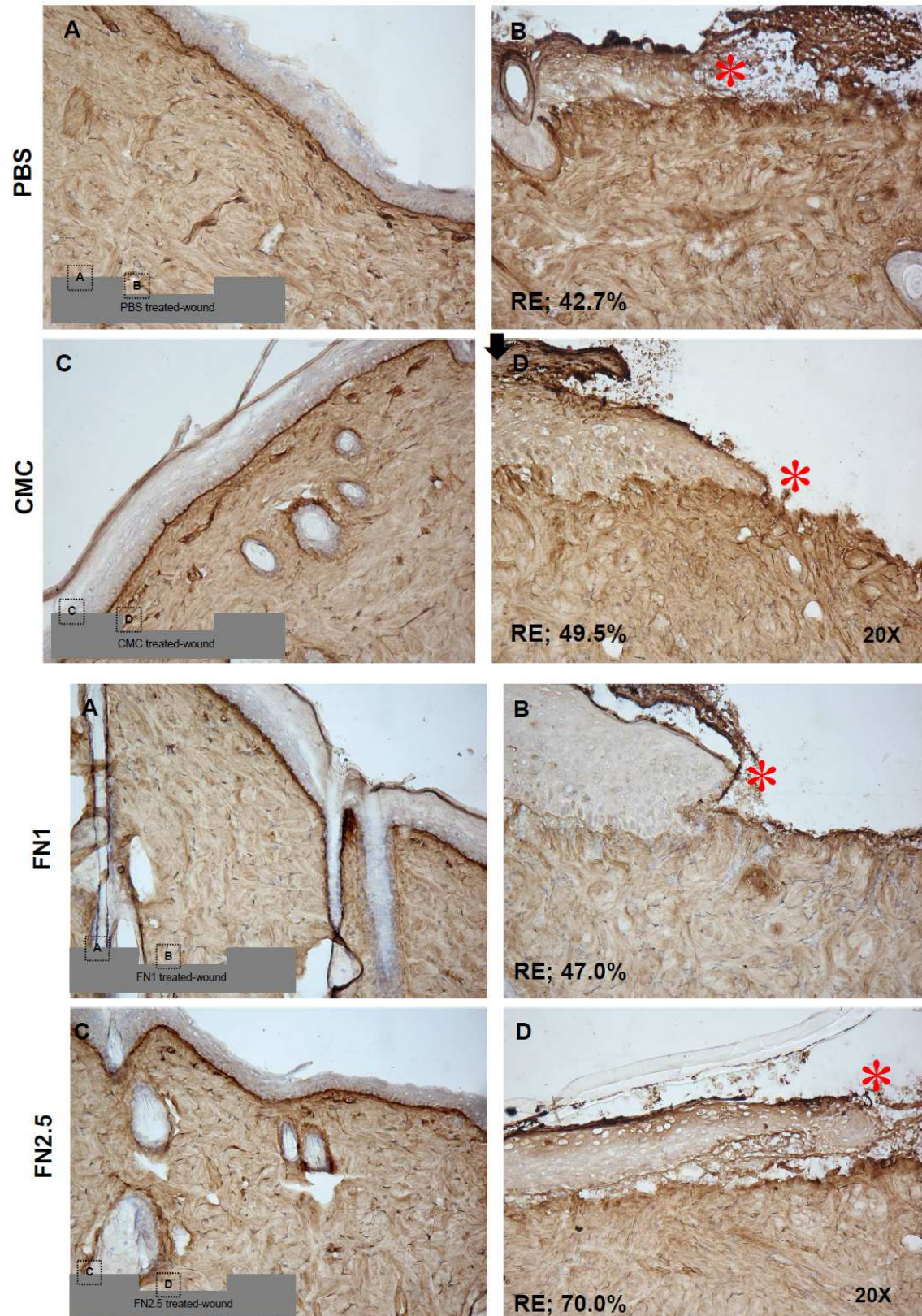
รูปที่ 38. ภาพถ่าย immune-staining ของโปรตีน CK1/10 บนบาดแผลบนหลังสัตว์ทดลอง (rat) 7 วัน หลังจากการทำการทำบาดแผล ภายหลังการให้สารทดสอบ คือ fibroin gel 1% in PBS, fibroin gel 2.5% in PBS, CMC 1% in PBS, หรือ PBS



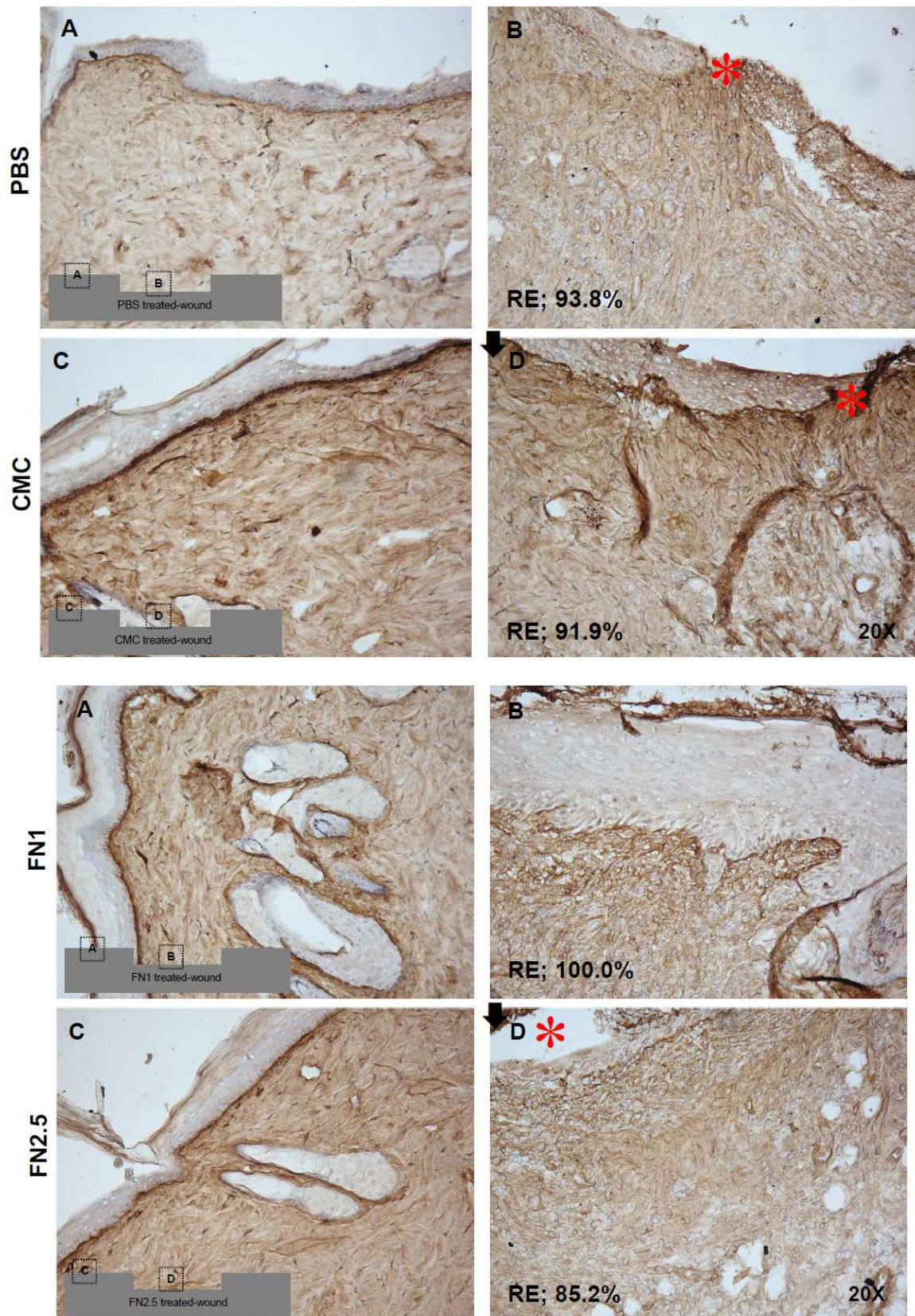
รูปที่ 39. ภาพถ่าย immune-staining ของโปรตีน CK1/10 บนบาดแผลบนหลังสัตว์ทดลอง (rat) 14 วัน หลังจากการทำการทำบาดแผล ภายหลังการให้สารทดสอบ คือ fibroin gel 1% in PBS, fibroin gel 2.5% in PBS, CMC 1% in PBS, หรือ PBS



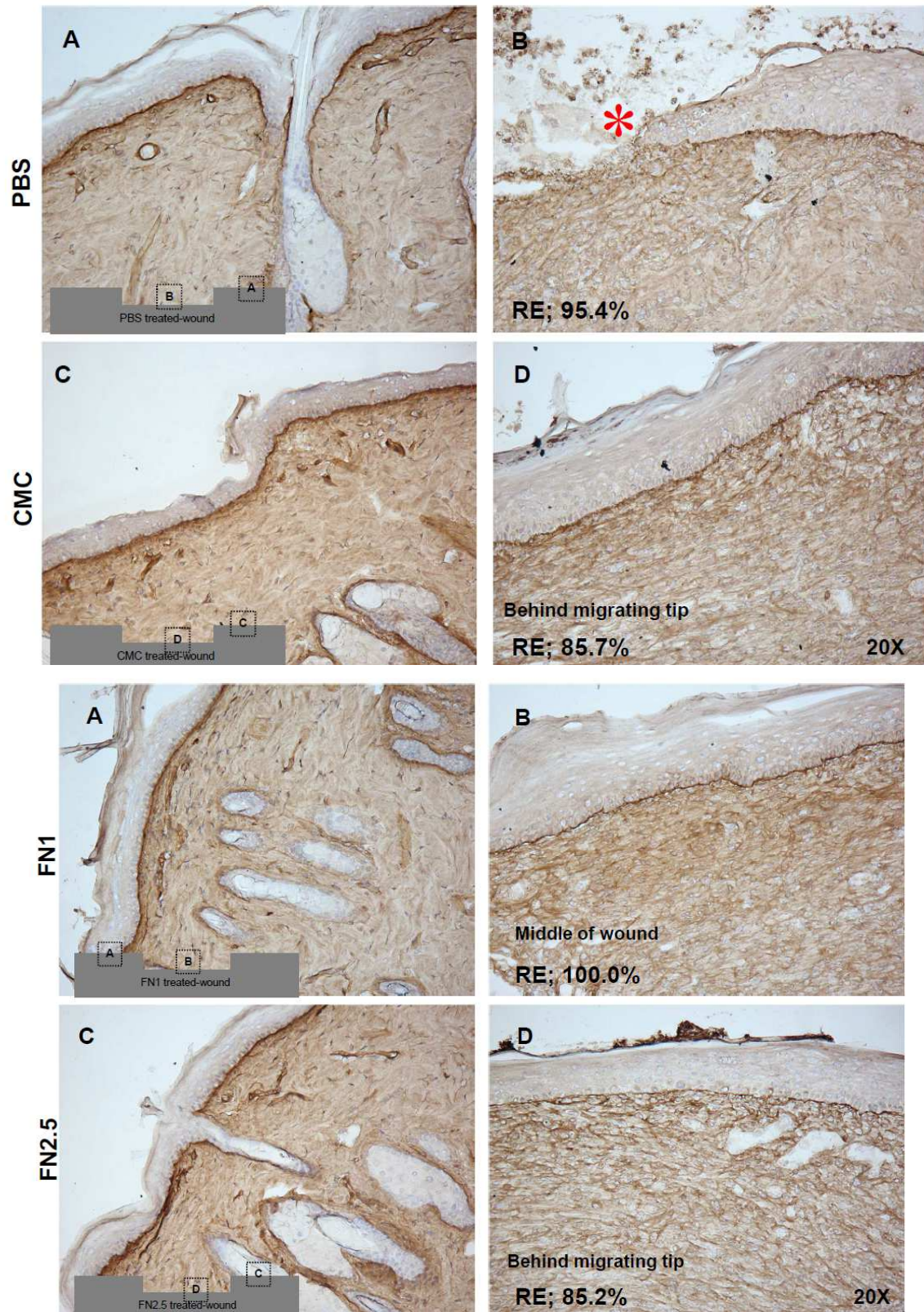
รูปที่ 40. ภาพถ่าย immune-staining ของโปรตีน collagen I บนบาดแผลบนหลังสัตว์ทดลอง (rat) 1 วัน หลังจากการทำการทำบาดแผล ภายหลังการให้สารทดสอบ คือ fibroin gel 1% in PBS, fibroin gel 2.5% in PBS, CMC 1% in PBS, หรือ PBS



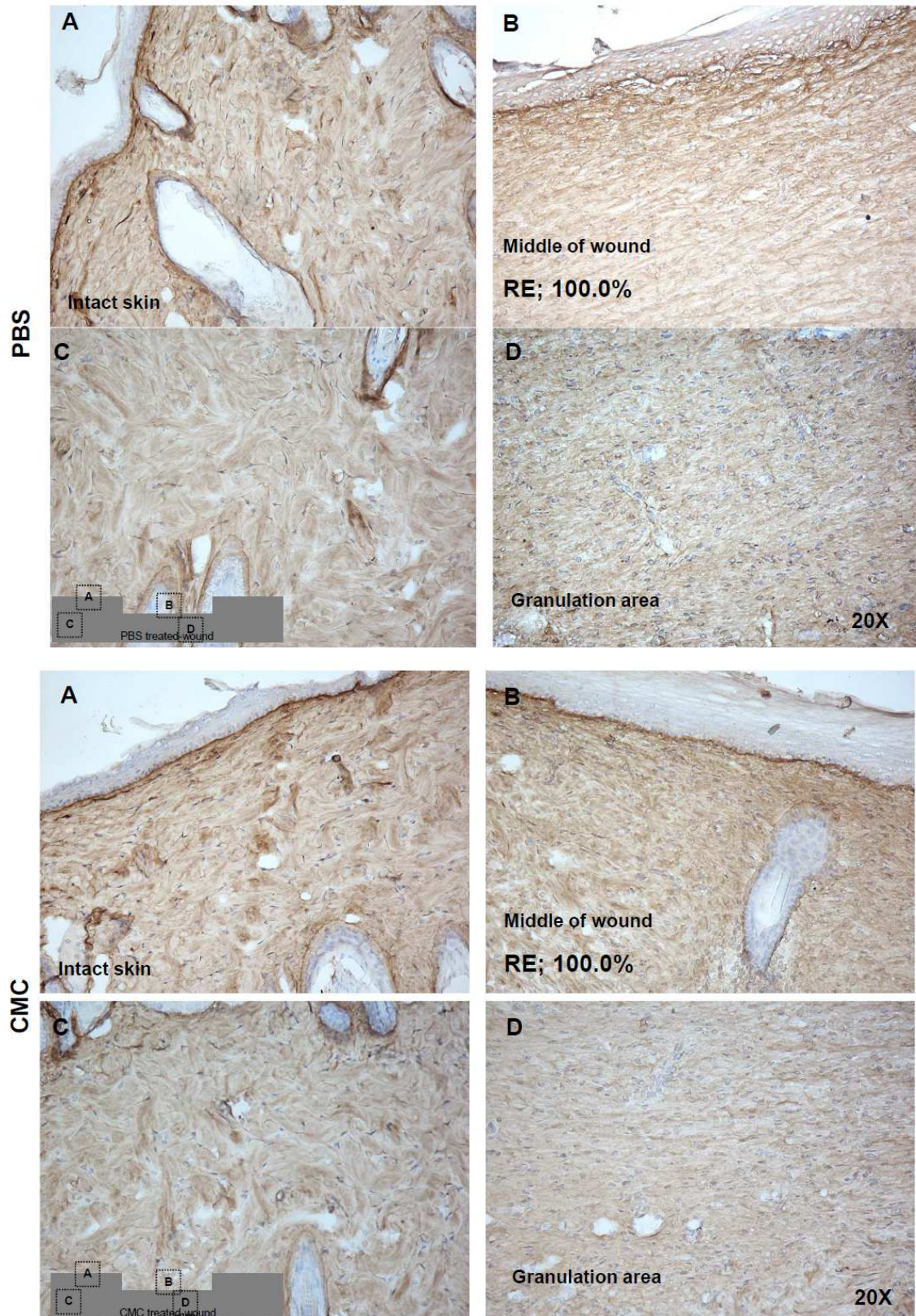
รูปที่ 41. ภาพถ่าย immune-staining ของโปรตีน collagen I บนบาดแผลบนหลังสัตว์ทดลอง (rat) 3 วัน หลังจากการทำการบำบัดแผล ภายหลังการให้สารทดสอบ คือ fibroin gel 1% in PBS, fibroin gel 2.5% in PBS, CMC 1% in PBS, หรือ PBS



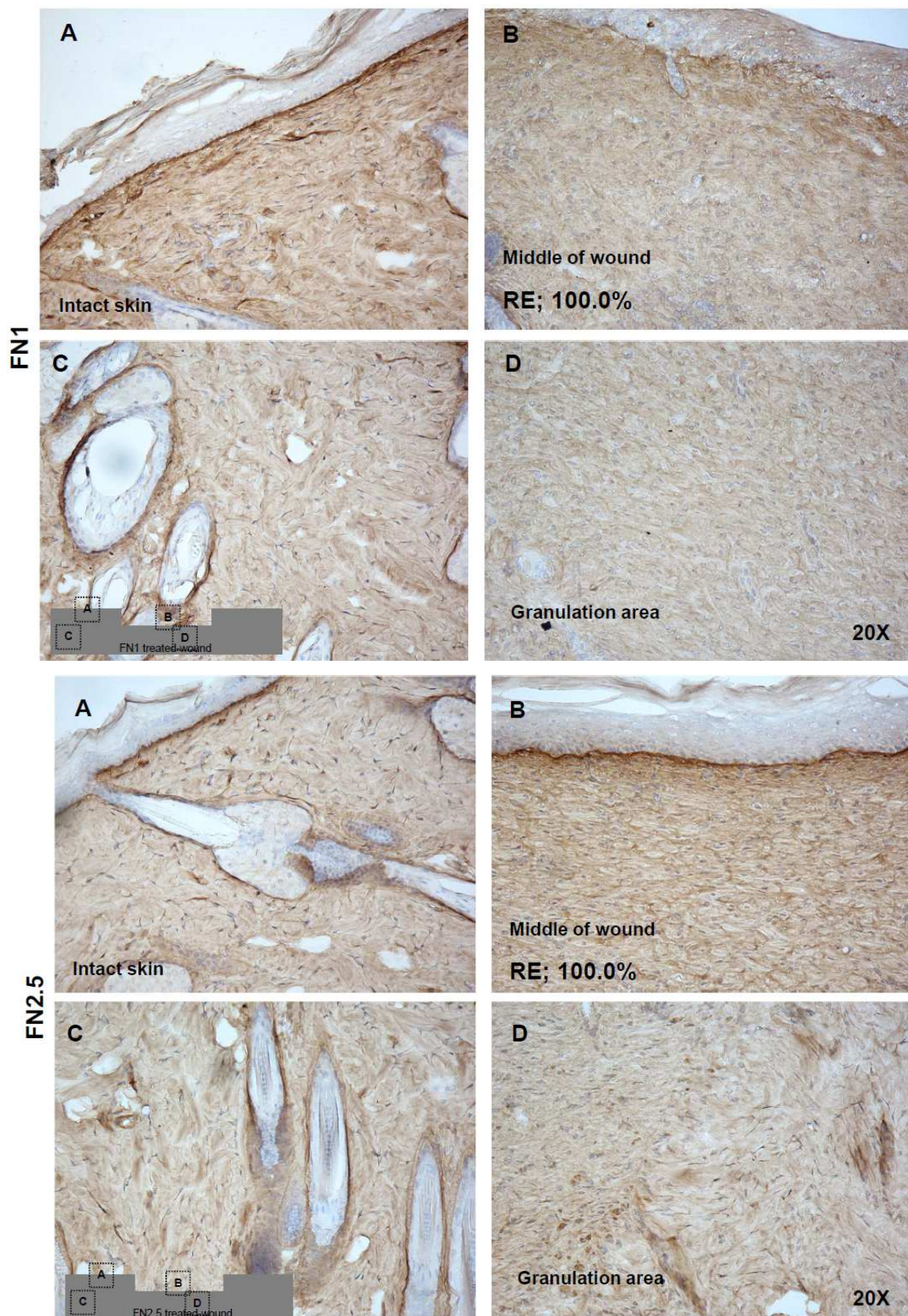
รูปที่ 42. ภาพถ่าย immune-staining ของโปรตีน collagen I บนบาดแผลบนหลังสัตว์ทดลอง (rat) 5 วัน หลังจากทำการทำบาดแผล ภายหลังการให้สารทดสอบ คือ fibroin gel 1% in PBS, fibroin gel 2.5% in PBS, CMC 1% in PBS, หรือ PBS



รูปที่ 43. ภาพถ่าย immune-staining ของโปรตีน collagen I บนบาดแผลบนหลังสัตว์ทดลอง (rat) 7 วัน หลังจากการทำการทำบาดแผล ภายหลังการให้สารทดสอบ คือ fibroin gel 1% in PBS, fibroin gel 2.5% in PBS, CMC 1% in PBS, หรือ PBS



รูปที่ 44. ภาพถ่าย immune-staining ของโปรตีน collagen I บนบาดแผลบนหลังสัตว์ทดลอง (rat) 14 วัน หลังจากการทำการทำบาดแผล
 ภายหลังการให้สารทดสอบ คือ CMC 1% in PBS, หรือ PBS



รูปที่ 45. ภาพถ่าย immune-staining ของโปรตีน collagen I บนบาดแผลบนหลังสัตว์ทดลอง (rat) 14 วัน ภายหลังจากการทำบาดแผล ภายหลังการให้สารทดสอบ คือ fibroin gel 1% in PBS หรือ fibroin gel 2.5% in PBS

4. สรุปผลการศึกษา

วัตถุประสงค์หลักของโครงการนี้ จะมุ่งเน้นศึกษาศึกษาความเป็นพิษต่อผิวหนัง และประสิทธิภาพผลการเร่งการฟื้นตัวของบาดแผลของสารสกัดโปรตีนจากรังไหม fibroin ในรูปแบบยาเตรียมแบบเจล (gel) ในสัตว์ทดลอง (*in-vivo* animal model) และมีการวางแผนของโครงการในอนาคตที่คณะผู้วิจัยตั้งเป้าที่จะพัฒนาสูตรตำรับเพื่อพัฒนาเป็นยาช่วยเร่งการฟื้นตัวของบาดแผลในมนุษย์ต่อไป

โครงการนี้ เป็นโครงการสืบเนื่องจากผลการวิจัยก่อนหน้าของทีมวิจัย ที่มุ่งเน้นศึกษาศึกษาความเป็นพิษต่อผิวหนัง และประสิทธิภาพผลการเร่งการฟื้นตัวของบาดแผลของสารสกัดโปรตีนจากรังไหม fibroin ซึ่งทราบเป็นเวลายาวนานแล้วว่า โปรตีน fibroin มีคุณสมบัติเข้ากันได้กับร่างกาย ไม่ก่อให้เกิดการแพ้ และสามารถย่อยสลายได้ในร่างกาย มีความปลอดภัยสูง ตลอดจนมีรายงานหลายชิ้นระบุผลของสารสกัดโปรตีน fibroin อาจเสริมสร้างหรือเร่งกระบวนการฟื้นตัวของบาดแผล โดยสามารถช่วยเร่งการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนของเซลล์ มีฤทธิ์ยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระ และป้องกันการตายของเซลล์จากการขาดซิริม แต่ส่วนใหญ่ของรายงานจะเป็นการทดลองใน *in-vitro* model นอกจากนั้น ผู้วิจัยพบว่าผลิตภัณฑ์ fibroin ที่นำมาทดสอบหากผลิตจากรังไหมต่างชนิดกัน แหล่งผลิตที่ต่างกัน จะมีคุณลักษณะที่มีแตกต่างกันมากทั้งด้านกายภาพและเคมี ตลอดจนประสิทธิภาพการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เหตุของความแตกต่างนี้อาจมีสาเหตุจากความแตกต่างในกระบวนการผลิต หรือปัจจัยอื่นๆ เช่น ชนิดของสายพันธุ์ไหม ปัจจัยจากสภาวะแวดล้อมของการเพาะเลี้ยงไหม เป็นต้น เพื่อหลีกเลี่ยงผลกระทบข้างต้น ทีมผู้วิจัยจึงได้พัฒนาคิดค้นวิธีการสกัดโปรตีนไหม fibroin จากรังไหมสีเหลืองของไทย และทำการพิสูจน์คุณลักษณะของผลิตภัณฑ์ ซึ่งทีมผู้วิจัยประสบความสำเร็จในการแยกสกัดโปรตีน fibroin จากรังไหมเหลืองพันธุ์ไทยได้สำเร็จ โดยได้สารสกัดโปรตีนที่มีคุณภาพสูง ขนาดของโมเลกุลค่อนข้างคงที่ มีการละลายได้ดีที่ pH ต่างๆ และทนความร้อนได้ ผู้วิจัยได้นำโปรตีน fibroin ที่แยกสกัดนี้มาทดสอบกับ cell lines (*in-vitro* model) และ กับโมเดลผิวหนังสุกรที่เพาะเลี้ยงที่พัฒนามาทดสอบผลต่อการฟื้นตัวของบาดแผล (*ex-vivo* porcine skin wound healing model) ซึ่งโมเดลนี้พัฒนาขึ้นโดยทีมวิจัยเช่นกัน ผลการทดลองสนับสนุนว่า fibroin สามารถเร่งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ และเร่งการฟื้นตัวของบาดแผลดีกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นเพื่อเป็นการยืนยันว่าสามารถใช้ *ex-vivo* porcine skin wound healing model แทนการทำการทดลองในสัตว์ทดลองหรือมนุษย์ จึงมีการทำวิจัยของโครงการ *in-vivo* animal model ชุดนี้ขึ้นเพื่อที่จะได้ข้อมูลในการสนับสนุนให้ใช้โมเดลนี้แทนการใช้สัตว์ทดลองหรือมนุษย์ในการทดลองในอนาคต และเพื่อให้ได้ข้อมูลขนาดยา ความเป็นพิษ ประสิทธิภาพของสารสกัด fibroin เพื่อเป็นแนวทางพัฒนาตำรับของโปรตีน fibroin สู่ clinical trial ต่อไป

การทดลองโดยย่อมีดังนี้ ใช้สัตว์ทดลอง (Sprague-Dawley rat) ตัวผู้ น้ำหนักตัว 200-250 กรัม โดยสัตว์ทดลองแต่ละตัวจะถูกสุ่มให้หมายเลขเพื่อสะดวกในการกำหนดวันการทำบาดแผลและการกำหนดวันของการเก็บบาดแผล ตลอดจนการกำหนดการใช้สารทดสอบในตำแหน่งแต่ละตำแหน่งของบาดแผล สัตว์ทดลองจะถูกเลี้ยงในกรง 1 ตัวต่อกรง ภายในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส และมีแสงสว่าง 12 ชั่วโมงสลับความมืด 12 ชั่วโมง มีการให้อาหารและน้ำอย่างบริบูรณ์ สัตว์ทดลองจะถูกเลี้ยงให้เคยชินกับสถานที่ก่อนทำการทดลองอย่างน้อย 1 สัปดาห์ (โครงการนี้ผ่านการเห็นชอบจากคณะกรรมการจริยบรรณการใช้สัตว์ทดลอง มหาวิทยาลัยนเรศวรเป็นที่เรียบร้อยแล้ว) ในขั้นตอนการทำบาดแผล สัตว์ทดลองจะถูกวางยาสลบโดยการฉีดยาสลบ Nembutal ในขนาด 40 mg/kg และ ampicillin 50mg/kg เข้าช่องท้อง (intra-peritoneal) ขนบนหลังสัตว์จะถูกโกนและฆ่าเชื้อโรค กำหนดจุดที่จะทำการผ่าตัดเอาส่วนผิวหนังรวมชั้น epidermis และ dermis ออก ซึ่งตำแหน่งที่กำหนดจะขนานตามแนวกระดูกสันหลังระหว่างขาหน้าและขาหลัง โดยใช้ guiding grid เป็นตัวช่วยกำหนดตำแหน่ง บาดแผลห่างจากกัน 1 cm และห่างจากแนวกระดูกสันหลัง 0.5 cm. ทำการเจาะบาดแผลโดยใช้ biopsy punch จำนวน 4 บาดแผล (ข้างละ 2 บาดแผล) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.6 cm. กลุ่มการทดลองมี 4 กลุ่มการทดลองดังนี้ 1. ยาเตรียมสารสกัดรังไหม fibroin ในรูปแบบเจลที่มีความเข้มข้นของ fibroin 1% in PBS, 2. ยาเตรียมสารสกัดรังไหม fibroin ในรูปแบบเจลที่มีความเข้มข้นของ fibroin 2.5% in PBS, 3. PBS เพื่อใช้สำหรับกลุ่มควบคุม, 4. ยาเตรียม carboxy methyl cellulose (CMC) 1% in PBS เพื่อใช้สำหรับกลุ่มควบคุม (occlusion effect) โดยจะใส่สารทดสอบแต่ละชนิด จำนวน 20µl ในบาดแผลของสัตว์ทดลองตามการสุ่มสัตว์ทดลองข้างต้น (ชุดละ 8 ตัว ยกเว้น D14 มีจำนวน 6 ตัว) และตำแหน่งของบาดแผล บาดแผลของสัตว์ทดลองจะถูกปิดด้วย Tegaderm film (3M) ขนาด 6x7 cm. เพื่อป้องกันการไหลออกของสารทดสอบและป้องกันบาดแผลจากการติดเชื้อหรือปนเปื้อนวัสดุรองนอน และใส่ปลอกคอสัตว์ทดลองเพื่อป้องกันการกัดแทะหรือเลียบาดแผล ผ่าตัดเก็บบาดแผล ในวันที่ 1 (D1), 3 (D3), 5 (D5), 7 (D7), และ 14 (D14) วันหลังทำบาดแผล โดยก่อนการผ่าตัดจะมีการประเมินลักษณะบาดแผล และการฟื้นตัวของบาดแผลก่อน โดยทั้งการถ่ายรูปบาดแผล

การวัดขนาดของบาดแผลที่ลดลง และการสังเกตอื่นๆ ประเมินผลการเกิดพิษที่เกิดกับผิวหนัง เช่น การอักเสบ การแพ้ เป็นต้น (โดยผู้เชี่ยวชาญด้านสัตว์ทดลอง หรือสัตวแพทย์) ตรวจสอบทาง gross histology และ Immunohistochemistry ขึ้น บาดแผลทุกชั้น เพื่อประเมินผลการฟื้นตัวของบาดแผลในระดับเซลล์ และทำการตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนต่างๆ ที่ เกี่ยวข้องกับการฟื้นตัวของบาดแผล เช่น Ki67, CK14, CK10 เป็นต้น สัตว์ทดลองจะถูกทำให้สิ้นชีวิตอย่างสงบและรวดเร็วโดย ใช้ guillotine (ก่อนการเก็บชิ้นบาดแผล) ผลการศึกษาสามารถนำเสนอสรุปดังนี้

ผลทางกายภาพตรวจสอบทางกายภาพ สัตว์ทดลองมีสุขภาพแข็งแรงดี น้ำหนักตัวเพิ่มขึ้น ไม่มีการแสดงถึงอาการ เครียด และไม่มีการตายของสัตว์ทดลองระหว่างการเลี้ยง สภาพทางกายภาพโดยทั่วไปของบาดแผลที่ทาไว้บนหลังสัตว์ทดลอง พบว่าไม่มีการติดเชื้อ ไม่มีข้อบ่งชี้การแพ้หรือความเป็นพิษของ สารทดสอบ และสัตว์ทดลองมีการฟื้นตัวของบาดแผลที่เป็น ปกติ แผ่น Tegaderm film จะค่อยๆหลุดออกจากตัวสัตว์ทดลองภายในวันที่ 3 หลังการทำบาดแผล และหลุดหมดทุกตัว ภายในวันที่ 7 การใช้แผ่น Tegaderm film นี้มีวัตถุประสงค์เพื่อป้องกันไม่ให้สารทดสอบที่ใส่ในบาดแผลไหลออก หรือ สัตว์ทดลองเลียทิ้งภายใน 24 ชั่วโมง ตลอดจนการป้องกันบาดแผลไม่ให้ปนเปื้อนวัสดุรองนอนหรือสิ่งขับถ่ายจากสัตว์ทดลอง ดังนั้นการใช้แผ่น film ชนิดนี้จึงมีความเหมาะสมในการทดลองนี้ การประเมินด้วยสายตาพบว่าทุกบาดแผลบนสัตว์ทดลองทุก ตัวจะมีการสมานตัวที่หายสนิทภายใน 14 วัน โดยทั่วไป จำนวนวันที่บาดแผลหายสนิทนั้นจะขึ้นกับขนาดของบาดแผล และ สุขภาพของสัตว์ทดลองแต่ละตัว (การทดลองนี้บาดแผลมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6mm.) อย่างไรก็ตามเราไม่สามารถบอก ความแตกต่างได้โดยสายตาว่า บาดแผลที่ได้รับสารทดสอบแต่ละชนิดบนหลังสัตว์ทดลองแต่ละตัวมีอัตราการฟื้นตัวของ บาดแผลแตกต่างกันหรือไม่

ผลทางกายภาพโดยการตรวจสอบทาง histology ของบาดแผล ผลจากการศึกษาจากภาพถ่าย histology ของ บาดแผลบนหลังสัตว์ทดลอง 1, 3, 5, 7, 14 วัน ภายหลังจากการทำบาดแผลและการให้สารทดสอบ คือ fibroin gel 1% in PBS, fibroin gel 2.5% in PBS, CMC 1% in PBS, หรือ PBS (1 ชนิดต่อบาดแผล N=8 ยกเว้น Day14 N=6) และภาพถ่าย histology ของบาดแผลแต่ละชิ้นจะถูกนำมาวัดค่า epidermal layer migration (EM, micron) โดยวัดการเคลื่อนที่ของชั้น epidermal (keratinocytes) layer จากขอบบาดแผลเริ่มแรก เพื่อนำมาคำนวณหาค่า %RE (% re-epithelialization) และ คำนวณหาอัตราส่วนระหว่างความหนาของชั้น epidermis ที่บริเวณบาดแผลต่อความหนาชั้น epidermis รอบบาดแผลที่มี ผิวหนังปกติ (P/W ratio) และ complete healing (CH) ของบาดแผลในสัตว์ทดลองแต่ละกลุ่ม และแสดงผลการวิเคราะห์ หานัยสำคัญทางสถิติโดย ANOVA ลักษณะโดยทั่วไป บาดแผลบนหลังสัตว์ทดลอง 1 วันภายหลังจากการทำบาดแผลจะพบว่ามี การเคลื่อนตัวเข้ามาของชั้น dermis มาที่บริเวณบาดแผล กล้ามเนื้อชั้น PC มีการแตกกระจายของมัดกล้ามเนื้อ และเพิ่ม จำนวนขึ้นอย่างเห็นได้ชัดเพื่อแทนที่กล้ามเนื้อส่วนที่ถูกตัดออกไปตอนทำบาดแผล ทำให้บาดแผลดูตื้นขึ้นมาออกเห็นได้ชัดเจน แต่ต่อมขุมขนจะไม่มีการกระจายตัวเข้ามาบริเวณแผล ชั้น epidermis เริ่มมีการเคลื่อนที่เข้าสู่บริเวณบาดแผล ซึ่งในการวิเคราะห์ การเคลื่อนที่ของ epidermal migration (EM) ในรูป %RE หรือ % wound coverage โดย ANOVA ไม่พบว่าความแตกต่าง อย่างมีนัยสำคัญของ %RE ของกลุ่มบาดแผลที่ได้รับสารทดสอบ fibroin gel 1% (11.3%), fibroin gel 2.5% (13.5%), CMC 1% (12.6%) , หรือ PBS (12.3%) ค่า %RE มีความแตกต่างอย่างเห็นได้ชัดเจนในบาดแผลบนหลังสัตว์ทดลอง 3 วัน ภายหลังจากการทำบาดแผล กลุ่มบาดแผลที่ได้รับสารทดสอบ fibroin gel 2.5% (70%), จะมี %RE สูงกว่ากลุ่มบาดแผลที่ ได้รับสารทดสอบอื่นๆ CMC 1% (49.5%), fibroin gel 1% (47%), และ PBS (42.7%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ANOVA, $p < 0.01$) และเมื่อเทียบผลระหว่างกลุ่มบาดแผลที่ได้รับสารทดสอบ fibroin gel 2.5% กับ fibroin gel 1% กลุ่มบาดแผลที่ ได้รับสารทดสอบ fibroin gel 2.5% จะให้ผล %RE ที่สูงที่นัยสำคัญเช่นกัน (ANOVA, $p < 0.05$) นอกจากนั้นในกลุ่มบาดแผล ที่ได้รับสารทดสอบ fibroin gel 2.5% จะมีบาดแผลที่เกิดการ re-epithelialization อย่างสมบูรณ์ (complete wound coverage) อยู่ถึง 3 บาดแผลใน 8 บาดแผลของกลุ่ม ในขณะที่กลุ่มบาดแผลที่ได้รับสารทดสอบ fibroin gel 1% มีบาดแผลที่เกิด complete healing เพียง 1 บาดแผลใน 8 บาดแผลของกลุ่มเท่านั้น และในกลุ่ม CMC 1% และ PBS ไม่มีบาดแผลใด เกิด complete wound coverage เลย ส่วนการคำนวณค่า %RE ในบาดแผลบนหลังสัตว์ทดลอง 5, 7, และ 14 วัน ภายหลังจากการทำบาดแผลจะไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มบาดแผลที่ได้รับสารทดสอบทั้ง 4 กลุ่ม โดย บาดแผลในแต่ละกลุ่มจะมี complete wound coverage มากขึ้น และจะมี complete healing ทั้งหมดในเวลา 14 วัน และจะสังเกตได้ว่าภายหลัง 14 วันหลังการมีบาดแผลต่อมขุมขนจะไม่มีการเคลื่อนที่เข้าสู่บริเวณที่เคยมีแผล (scar) ในส่วนค่า W/P ratio ซึ่งเป็นอัตราส่วนความหนาของชั้น epidermis ที่บริเวณบาดแผลต่อที่บริเวณผิวหนังปกติรอบบาดแผล พบว่าทุก กลุ่มบาดแผลของทดลองจะมีการเพิ่มขึ้นสูงของค่า W/P ratio ในวันที่ 1 (ระหว่าง 2.6-3.4 เท่า), วันที่ 3 (ระหว่าง 5.5-7.6 เท่า), วันที่ 5 (ระหว่าง 6.3-6.9 เท่า), วันที่ 7 (ระหว่าง 4.1-8.5 เท่า) และค่อยๆ ลดลงไป วันที่ 14 (ระหว่าง 2.2-2.8 เท่า)

ซึ่งเป็นเรื่องปกติของกระบวนการฟื้นตัวของบาดแผล เซลล์ keratinocytes จะมีการแบ่งตัวเพิ่มขึ้น และหนาขึ้นขึ้นในบริเวณที่ขอบแผลและเคลื่อนตัวเข้าปกคลุมบาดแผล เมื่อกระบวนการเสร็จสิ้นค่า W/P ratio จะเป็นปกติ (บาดแผลหลังจาก 14 วัน ซึ่งเกิด complete healing แล้ว แต่ยังคงใช้เวลาในระยะของ wound remodeling) เมื่อพิจารณาในวันที่ 3 หลังการทำบาดแผลจะพบว่า ค่า W/P ratio ในกลุ่มบาดแผลที่ได้รับสารทดสอบ fibroin 1% (ratio 7.6) และ 2.5% (ratio 6.0) จะค่าสูงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม PBS (ratio 5.5) และกลุ่ม 1% CMC (ratio 5.6) ดังนั้นผลการทดลองนี้จึงสามารถระบุได้ว่า fibroin gel เพียงครั้งเดียว มีผลช่วยเร่งการฟื้นตัวของบาดแผลในสัตว์ทดลองให้เกิดได้เร็วขึ้น โดย fibroin gel 2.5% จะให้ผลดีกว่า fibroin gel ที่ 1% โดยประสิทธิภาพจะสูงสุดประมาณวันที่ 3 ภายหลังการเกิดบาดแผล แสดงถึงการใช้ระยะเวลาในการออกฤทธิ์ที่ช้า (delayed) ของสารทดสอบ อาจเป็นผลเนื่องจากการฟื้นตัวของบาดแผลจำเป็นต้องมีการสร้างมวลสารทดแทนส่วนที่เสียไป ซึ่งจำเป็นต้องใช้เวลาในการสร้าง และพบว่า fibroin gel ทั้งในความเข้มข้น 2.5% และ 1.0% ไม่ก่อให้เกิดพิษต่อเซลล์ หรือขัดขวางกระบวนการฟื้นตัวของบาดแผล และผลของความหนืดเป็นเจลไม่มีผลต่อกระบวนการฟื้นตัวของบาดแผล ซึ่งสังเกตได้จากกลุ่มบาดแผลที่ใส่สารที่มีความหนืดเช่น 1% CMC

ในการศึกษาเพื่อประเมินผล Immunohistochemistry ของโปรตีน Ki67 ซึ่งใช้เป็นตัวบ่งชี้สถานะ cell proliferation ที่กำลังเกิดขึ้นในระหว่างการฟื้นตัวของบาดแผล จากการสุ่มตัวอย่างสัตว์ทดลอง 1 ตัว ในแต่ละกลุ่มวันของการทดลอง (1, 3, 5, 7, 14 วันหลังทำบาดแผล) มาทำ immunostaining ด้วย antibody ต่อโปรตีน Ki67 พอสรุปได้ว่า อัตราส่วนของจำนวนเซลล์ในชั้นผิวหนัง epidermis ที่มีการแสดงออกของโปรตีน Ki67 ระหว่างผิวหนังบริเวณบาดแผลกับผิวหนังปกติรอบๆบาดแผลบนหลังสัตว์ทดลอง (rat) 1, 3, 5, 7, และ 14 วัน ภายหลังจากการทำบาดแผล ภายหลังการให้สารทดสอบ คือ fibroin gel 1% in PBS, fibroin gel 2.5% in PBS, CMC 1% in PBS, หรือ PBS ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ยกเว้นในวันที่ 5 ซึ่งพบว่ากลุ่ม fibroin 2.5% มีจำนวนบริเวณบาดแผลมีเซลล์ที่อยู่ในระยะ proliferation มากกว่ากลุ่มที่ได้รับสารทดสอบอื่นๆ หากคิดเฉพาะร้อยละจำนวนเซลล์ในชั้นผิวหนัง epidermis ที่มีการแสดงออกของโปรตีน Ki67 ผิวหนังบริเวณบาดแผลจะเห็นผลที่ชัดเจนขึ้น โดยผลแสดงบ่งถึงร้อยละของเซลล์ในชั้น epidermis ที่บริเวณบาดแผลที่อยู่ในระยะ proliferation phase จะไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในช่วงฟื้นตัวของบาดแผลไม่ว่าจะได้รับการทดสอบใดๆ แต่จะขึ้นอยู่กับว่ามีปริมาณเซลล์ทั้งหมดเท่าใด ซึ่งในกลุ่ม fibroin gel จะมีปริมาณเซลล์มากกว่าโดยเฉพาะวันที่ 3

การศึกษาเพื่อประเมินผล Immunohistochemistry ของโปรตีน CK14, CK1/10 และ collagen โปรตีน CK1/10 จะปรากฏในชั้น spinous และชั้น granular layer (suprabasal layer) ของ epidermis เป็นการบ่งบอกถึงสถานะการเปลี่ยนแปลงแบบ differentiation ของเซลล์ keratinocytes ในชั้นนั้นๆ ในทางกลับกัน การแสดงออกของโปรตีน CK14 จะจำกัดเฉพาะในชั้น basal layer ของ epidermis เป็นการบ่งบอกถึงสถานะ un-differentiation ของเซลล์ keratinocytes ในผิวหนังที่อยู่ระหว่างการฟื้นตัวของบาดแผลจะพบการแสดงออกของโปรตีน CK14 ที่ epidermal migrating tip ส่วนโปรตีน collagen เป็นโปรตีนส่วนประกอบของ connective tissue โดยเฉพาะ fibrous tissues เช่น tendon, ligament, ผิวหนัง เป็นต้น เซลล์ fibroblast จะเป็นเซลล์ที่สร้าง collagen โดยที่ผิวหนังจะพบ collagen type I มากที่สุด จากผลการย้อม immunostaining ของ CK14, CK1/10 และ collagen type I พบว่าบาดแผลทุกกลุ่มมีการแสดงออกของโปรตีนพื้นฐานของผิวหนังที่เป็นปกติ และไม่มี ความแตกต่างกันระหว่างกลุ่มการทดลอง

สรุปโดยย่อ จากผลการทดลองนี้สามารถระบุได้ว่า fibroin gel เพียงครั้งเดียว มีผลช่วยเร่งการฟื้นตัวของบาดแผลในสัตว์ทดลองให้เกิดได้เร็วขึ้น โดย fibroin gel 2.5% จะให้ผลดีกว่า fibroin gel ที่ 1% โดยประสิทธิภาพจะสูงสุดประมาณวันที่ 3 ภายหลังการเกิดบาดแผล และพบว่า fibroin gel ทั้งในความเข้มข้นไม่ก่อให้เกิดพิษต่อเซลล์ หรือขัดขวางกระบวนการฟื้นตัวของบาดแผล ซึ่งเป็นการยืนยันผลของโปรตีน fibroin ของทีมผู้วิจัยค้นพบทั้งใน cell line และ ex-vivo porcine skin wound healing models ซึ่งสามารถนำผลการวิจัยของโครงการนี้ไปสู่การทดลองทางคลินิกต่อไป

5. เอกสารอ้างอิง

- Brandner JM., et al. (2004) Connexin 26, 30 and 43: differences among spontaneous, chronic and accelerated human wound healing. *J Invest Dermatol* 122:1310-20.
- Jorn, B., B.-L. Bettina, L. Anja, W. Claudia, G. Johannes, and S. Thomas, *Ki-67 protein is associated with ribosomal RNA transcription in quiescent and proliferating cells*. *Journal of Cellular Physiology*, 2006. **206**(3): p. 624-635.
- Kato, N., S. Sato, A. Yamanaka, H. Yamada, N. Fuwa, and M. Nomura, *Silk protein, sericin, inhibits lipid peroxidation and tyrosinase activity*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1998. 62(1): p. 145-7.
- Klein, C.L., M. Wagner, C.J. Kirkpatrick, and T.G. Van Kooten, A new quantitative test method for cell proliferation based on detection of the Ki-67 protein. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 2000. 11(2): p. 125-132.
- Middelkoop E. et al. (2004). Porcine wound models for skin substitution and burn treatment. *Biomaterials* 25:1559-67.
- Moll, I., P. Houdek, H. Schmidt, and R. Moll, *Characterization of Epidermal Wound Healing in a Human Skin Organ Culture Model: Acceleration by Transplanted Keratinocytes*. 1998. **111**(2): p. 251-258.
- Noll M., et al. (1999). Reconstructed human skin (AST2000) as a tool for pharmaco-toxicology. *ATLA* 27: 302.
- Onuma, H., C. Mastui, and M. Morohashi, *Quantitative analysis of the proliferation of epidermal cells using a human skin organ culture system and the effect of DbcAMP using markers of proliferation (BrdU, Ki-67, PCNA)*. *Archives of Dermatological Research*, 2001. **293**(3): p. 133-138.
- Stark HJ., et al. (2004). Organotypic cocultures as skin equivalents; a complex and sophisticated in vitro system. *Biol. Proceed.* Online 6:55-60.
- Sullivan TP., et al. (2001). The pig as a model for human wound healing. *Wound Rep. Reg.* 9: 66-76.
- Takahashi, M., K. Tsujimoto, H. Yamada, H. Takagi, and S. Nakamori, *The silk protein, sericin, protects against cell death caused by acute serum deprivation in insect cell culture*. *Biotechnology Letters*, 2003. **25**(21): p. 1805-1809.
- Takahashi, M., K. Tsujimoto, Y. Kato, H. Yamada, H. Takagi, and S. Nakamori, *A Sericin-Derived Peptide Protects Sf9 Insect Cells from Death Caused by Acute Serum Deprivation*. *Biotechnology Letters*, 2005. **27**(13): p. 893-897.
- Terada, S., M. Sasaki, K. Yanagihara, and H. Yamada, *Preparation of silk protein sericin as mitogenic factor for better mammalian cell culture*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2005. **100**(6): p. 667-671.
- Tonello C., et al. (2005) In vitro reconstruction of an endothelialized skin substitute provide with a microcapillary network using biopolymer scaffolds. *FASAB* published online June 21 2005.
- Usui, M.L., J.N. Mansbridge, W.G. Carter, M. Fujita, and J.E. Olerud, *Keratinocyte Migration, Proliferation, and Differentiation in Chronic Ulcers From Patients With Diabetes and Normal Wounds*. *J. Histochem. Cytochem.*, 2008. **56**(7): p. 687-696.

- Wang JF et al. (2001). The pig as a model for excisional skin wound healing: Characterization of the molecular and cellular biology, and bacteriology of the healing process. *Comp. Med* 54:292-299.

6. ภาคผนวก

1. ประวัติผู้วิจัย ผศ.ดร.ณัฏฐิ์ แซ่ลิ้ม
2. ความก้าวหน้าตามตัวชี้วัดเพื่อการประเมินผลสำเร็จของโครงการ
 - 2.1. นำเสนอผลงานในรูปแบบ Oral presentation และตีพิมพ์ใน Proceedings โดย นายนิคม นาคสุพรรณ นิสิตบัณฑิตศึกษา คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ชื่อเรื่อง “Toxicity Testing and Wound Healing Efficacy of Fibroin Gel in Animal Model” ในโครงการประชุมนานาชาติ แม่ฟ้าหลวง วิชาการ ประจำปี พ.ศ. 2555 “Future Challenges towards ASEAN Integration” ณ มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง ระหว่างวันที่ 29-30 พฤศจิกายน และ 1 ธันวาคม 2555
 - 2.2. วิทยากรรับเชิญบรรยาย หัวข้อ “Wound Healing Efficacy and Wound Toxicity of Fibroin Silk Protein” ในการประชุม “International Conference on the Advances in Natural Products Science and Development of Natural Medicine” ณ มหาวิทยาลัย Kangwon National University ประเทศเกาหลี ระหว่างวันที่ 18 – 20 พฤศจิกายน 2555 โดยคำเชิญของ Prof. Dr. Cheol Ho Park, Director of Institute of Bioscience & Biotechnology, Kangwon National University, Chuncheon, Korea.



ผศ. ดร. นัฐวุฒิ แซ่ลิ้ม, Pharm.D., Ph.D.

ที่อยู่ทำงาน:

ภาควิชาเภสัชกรรมปฏิบัติ

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก 65000

โทรศัพท์ 04-6207980 โทรสาร 055-261057 อีเมล: nut456zz@yahoo.com

ตำแหน่งปัจจุบัน

อาจารย์ และนักวิจัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

ประวัติการศึกษา และการวิจัย

วิจัยหลังปริญญาเอก	2548	มหาวิทยาลัย University of Hamburg, Hamburg, ประเทศเยอรมัน (ก.ย.-ธ.ค.)
วิจัยหลังปริญญาเอก	2547	มหาวิทยาลัย Toyama Medical and Pharmaceutical University, Toyama, ประเทศญี่ปุ่น (ก.ย.-พ.ย.)
ปริญญาเอก	2546	มหาวิทยาลัยศูนย์การแพทย์เท็กซัส ณ ซานแอนโทนีโอ เมืองซานแอนโทนีโอ มลรัฐเท็กซัส ประเทศอเมริกา สาขาชีววิทยาของเซลล์และโครงสร้าง University of Texas Health Science Center at San Antonio (UTHSCSA) in Cellular and Structural Biology ภายใต้การดูแลของ J. D. Lechleiter, Asso.Prof.
Doctor of Pharmacy	2541	มหาวิทยาลัยวิสคอนซิน เมืองเมดิสัน มลรัฐวิสคอนซิน ประเทศอเมริกา University of Wisconsin, Madison, USA.
ปริญญาโทสาขาวิทยาศาสตร์ประยุกต์	2538	มหาวิทยาลัยนิวเซาท์เวลส์ เมืองซิดนีย์ ประเทศออสเตรเลีย สาขาวิทยาศาสตร์ทางอาหารและเทคโนโลยี University of New South Wales, Sydney, Australia (Master of Applied Sciences in Food Science and Technology)
ปริญญาตรีสาขาเภสัชศาสตร์	2529	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา Prince of Songkla University, School of Pharmacy, Songkla, Thailand

ประวัติการทำงาน

2539 – ปัจจุบัน

อาจารย์ และนักวิจัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

2550 – 2552

รองคณบดีฝ่ายวิจัยและบริการสังคม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

งานวิจัยขณะนี้

- The role of silk protein extracts, sericin and fibroin, on wound healing using *ex-vivo* porcine skin model and *in-vivo* animal model.
- Application of the *ex-vivo* porcine skin model for the study of wound healing effects of herbal extracts coated scaffolds.
- Application of the *ex-vivo* porcine skin model for melanoma study.

- Application of the *ex-vivo* porcine skin model for screening of wound healing promoting agents from herbal extracts.
- Development of cell-based model of NFAT nuclear-cytoplasm translocation for screening of immunosuppressant and immuno-enhancing agents.
- Acceleration of the wound healing rate by fibroin gel with targeting connexin43 antisense on *ex-vivo* porcine skin wound healing model.
- Isolation, identification, and characterization of active compounds as wound healing promoter from black and white jelly fungi.
- Searching for molecular targets and mechanism of actions of saponin glycosides from *Bacopa monnieri* on cardiovascular system.

ทุนวิจัย

- หัวหน้าโครงการวิจัยเรื่อง “บทบาทของสารสกัดโปรตีนจากรังไหมเซอร์ริซินและไฟโบรอินต่อกระบวนการฟื้นตัวของบาดแผลเมื่อศึกษาด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงผิวหนัง” ระยะเวลา 2 ปี ศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ปี 2552 - 2553 จำนวนเงิน 894,300 บาท โครงการวิจัยเสร็จสิ้น
- หัวหน้าโครงการวิจัยเรื่อง “ความสัมพันธ์ระหว่าง single nucleotide polymorphisms (C3445T และ G2677T/A) ของยีน MDR1 กับการแสดงออกของ P-glycoprotein ในกลุ่มอาสาสมัครชาวไทย โดยใช้ตัวอย่างจากเม็ดเลือดขาว” ระยะเวลา 1 ปี งบประมาณแผ่นดินปี 2552 จำนวนเงิน 300,000 บาท โครงการวิจัยเสร็จสิ้น
- หัวหน้าโครงการวิจัยเรื่อง “การสร้าง cell-based model สำหรับ NFAT nuclear-cytoplasm translocation” ระยะเวลา 1 ปี มหาวิทยาลัยนเรศวรปี 2553 จำนวนเงิน 80,000 บาท โครงการวิจัยเสร็จสิ้น
- หัวหน้าโครงการวิจัยเรื่อง “บทบาทของโครงสร้างเพื่อให้เซลล์ยึดเกาะที่เคลือบสารสมุนไพรรต่อการฟื้นตัวของบาดแผลบนผิวหนัง” ระยะเวลา 1 ปี งบประมาณแผ่นดินปี 2553 จำนวนเงิน 900,000 บาท โครงการวิจัยเสร็จสิ้น
- หัวหน้าโครงการวิจัยเรื่อง “การพัฒนาต้นแบบผิวหนังเทียมเพื่อใช้ศึกษามะเร็งผิวหนังชนิดเมลาโนมาในระดับเซลล์และโมเลกุล” ระยะเวลา 1 ปี งบประมาณแผ่นดินปี 2553 จำนวนเงิน 300,000 บาท โครงการวิจัยเสร็จสิ้น
- หัวหน้าโครงการวิจัยเรื่อง “การทดสอบความเป็นพิษและประสิทธิภาพผลการเร่งการฟื้นตัวของบาดแผลของเจลไฟโบรอินในสัตว์ทดลอง” ระยะเวลา 1 ปี งบประมาณแผ่นดินปี 2554 จำนวนเงิน 365,000 บาท โครงการวิจัยเสร็จสิ้น
- หัวหน้าโครงการวิจัยเรื่อง “การแยกสกัดและตรวจสอบคุณลักษณะของสารออกฤทธิ์เร่งการรักษาตัวของบาดแผลจากเห็ดหูหนูขาวและดำ” ระยะเวลา 1 ปี งบประมาณแผ่นดินปี 2555 จำนวนเงิน 500,000 บาท กำลังดำเนินการเสร็จสิ้น
- หัวหน้าโครงการวิจัยเรื่อง “การค้นหเป้าหมายการออกฤทธิ์ในระดับโมเลกุลของสารซาโปนินไกลโคไซด์จากพรหมิ” ระยะเวลา 1 ปี งบประมาณแผ่นดินปี 2555 จำนวนเงิน 450,000 บาท หัวหน้าโครงการวิจัย (35%) กำลังดำเนินการโครงการ
- หัวหน้าโครงการวิจัยเรื่อง “ผลของการเร่งการรักษาตัวของบาดแผลของเจลไฟโบรอินผสมสารแอนโทไซแนสต่อโปรตีนคอนเน็กซิน 43 โดยใช้โมเดลผิวหนังสุกรเพาะเลี้ยง” ระยะเวลา 1 ปี งบประมาณแผ่นดิน ปี 2555 จำนวนเงิน 407,300 บาท กำลังดำเนินการโครงการ
- หัวหน้าโครงการวิจัยเรื่อง “การพัฒนา cell-based model สำหรับการศึกษา NFAT (Nuclear factor of activated T cells) nuclear-cytoplasm translocation และการประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบสารออกฤทธิ์ยับยั้งหรือกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันจากสารสกัดพืชสมุนไพรร” ระยะเวลา 1 ปี งบประมาณแผ่นดิน ปี 2556 จำนวนเงิน 571,900 บาท เริ่มดำเนินการโครงการ

ผลงานวิจัยตีพิมพ์

- **Saelim, N.** et al. Nontranscriptional modulation of intracellular calcium signaling by ligand stimulated thyroid hormone receptor. *J Cell Biol.* 2004 Dec 6; 167(5): 915-24.
- Suwanakitch P, Jeenapongsa R, **Saelim N**, Tohda M and Watanabe H. Altered mRNA expression in ischemic rat brain. *Thai Journal of Pharmacology* 2005; 27: 52.
- Suwanakitch P, Jeenapongsa R, Tohda M, **Saelim N** and Watanabe H. Expression of Alzheimer-related genes in rat brain (Abstract number A1-031P). *Federation of European Biochemical Societies Journal* 2005; 272: S1.
- Hayashi H, Tohda M, **Saelim N**, Murakami Y and Matsumoto K. Influences of the mRNA expression of amyloid precursor protein and the related factors in primary cultured cortex cells. *Journal of Pharmacological Sciences* 2005; 97: 261.
- **Saelim, N.** Isolation of amyloid precursor protein (APP) gene from NG cell line. *J. Health Res.* 2007 ; 21(3): 185-194.
- **Saelim N**, Holstein D, Chocron ES, Camacho P, Lechleiter JD. Inhibition of apoptotic potency by ligand stimulated thyroid hormone receptors located in mitochondria. *Apoptosis.* 2007; 12: 1781-1794.
- Suwanakitch P., Jeenapongsa R, Watanabe H, and **Saelim * N.** Comparison of Alzheimer disease-related gene expressions in differentiated and undifferentiated NG108-15 cells. *ScienceAsia* 2008; 34:35-42.
- Sudchada P, Oo-puthinan S, Kerpin O, and **Saelim * N.** *ABCB1* gene expression in peripheral blood mononuclear cells in healthy Thai males and females. *Genet. Mol. Res.* 2010; 9(2): 1177-1185.
- Sudchada P, **Saelim N**, Oo-puthinan S, and Kerpin O. Relationship between the 3435C>tT and 2677G>T/A polymorphisms and *ABCB1* expression in peripheral blood mononuclear cells extracted from Thai males volunteers. *Thai J. of Genet.* 2011; 4(2): 143-157.
- Chocron ES, Sayre NL, Holstein D, **Saelim N**, Ibdah JA, Dong LQ, Zhu X, Cheng SY, and Lechleiter DJ. The Trifunctional Protein Mediates Thyroid Hormone Receptor-Dependent Stimulation of Mitochondria Metabolism *Molecular Endocrinology* 2012 26: 1117-1128.
- Khamlue R, Naksupan N, Ounaroorn A, **Saelim * N.** Skin wound healing promoting effect of polysaccharides extracts from *Tremella fuciformis* and *Auricularia auricula* on the ex-vivo porcine skin wound healing model. International Proceedings of Chemical, Biological & Environmental Engineering *IPCBE* 2012 43: 93-98.
- Khamlue R, Ounaroorn A, **Saelim * N.** Purification and characterization of polysaccharides extracted from *Tremella fuciformis* and *Auricularia auricula*. MFUIC-2012. 2012 in press.
- Naksupan N, **Saelim * N**, Pornarin Taepavarapruk P, and Taepavarapruk N. Toxicity testing and wound healing efficacy of fibroin gel in animal model. MFUIC-2012. 2012 in press.

สิทธิบัตร

- อนุสิทธิบัตร เลขที่ 0903000191 เรื่อง กรรมวิธีการสกัดคราบงจรของสารรงควัตถุสีเหลือง โปรตีนเซอรีซิน และ โปรตีนไฟโบรอิน จากรังไหมเหลือทิ้ง 2554
- อนุสิทธิบัตร เลขที่ 0903000493 เรื่อง วิธีการเพาะเลี้ยงอวัยวะผิวหนังหมูแบบ Ex-vivo เพื่อใช้เป็นโมเดล (model) ในการศึกษากระบวนการผิวหนังทั้งในภาวะปกติและมีบาดแผล 2554

ผลงานวิจัย Poster, oral presentation

- Oral presentation “Characterization of silk protein extracts, Sericin and Fibroin, from Thai yellow silk cocoons for medical material application” ประชุมวิชาการเภสัชวิจัยครั้งที่ 5 มหาวิทยาลัยนเรศวร พิษณุโลกปี 2552
- Poster presentation และนำเสนอตัวอย่างผลิตภัณฑ์ ในการประชุมเภสัชกรรมแห่งชาติ ครั้งที่ 6 เรื่อง “Isolation and purification of silk proteins, sericin and fibroin” ณ โรงแรมโกลเด้น ทิวลิป กรุงเทพฯ 27-28 มกราคม 2553
- Poster presentation “Cell proliferation effect of Thai medicinal plant extracts on primary porcine dermal fibroblasts” ประชุมวิชาการเภสัชวิจัยครั้งที่ 6 มหาวิทยาลัยนเรศวร พิษณุโลกปี 2553
- Poster presentation “Skin wound healing promoting effect of some Thai medicinal plant extracts on *ex-vivo* porcine skin wound healing model” ประชุมวิชาการเภสัชวิจัยครั้งที่ 6 มหาวิทยาลัยนเรศวร พิษณุโลกปี 2553
- Poster presentation “Isolation and Cultivation of Primary Skin Cell, Keratinocytes, Melanocytes, and Fibroblasts from Porcine Skins” ณ โรงแรมระยองรีสอร์ท จังหวัดระยองโครงการพัฒนานักวิจัยไทยด้านวิทยาศาสตร์เคมีและเภสัช และ NRCT-CPS Conference V. Drug Discovery: Development of Drug Design-based Pharmaceuticals จัดโดยศูนย์ PERCH-CIC คณะวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยมหิดล กันยายน 2553
- Poster presentation “Isolation and Cultivation of Primary Skin Cell, Keratinocytes, Melanocytes, and Fibroblasts from Porcine Skins” ณ ศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวอ่อนและเซลล์ต้นกำเนิด จัดโดยมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา กรกฎาคม 2553
- Poster presentation “Development of cell-based model for NFAT nuclear-cytoplasm translocation for bioactive immuno-modulator screening” PERCH-CIC congress VII: Chemistry, Environment and Society ณ โรงแรมจอมเทียน พัทยา จังหวัดชลบุรี โดย Center of Excellence for Innovation in Chemistry (PERCH-CIC) 4-7 May 2011
- Poster presentation “Skin wound healing promoting effect of some Thai medicinal plant extracts on *ex-vivo* porcine skin wound healing model” PERCH-CIC congress VII: Chemistry, Environment and Society ณ โรงแรมจอมเทียน พัทยา จังหวัดชลบุรี โดย Center of Excellence for Innovation in Chemistry (PERCH-CIC) 4-7 May 2011
- Poster presentation “Preparation and characterization of silk protein, sericin & fibroin, isolated from Thai yellow silk cocoons” งานประชุมวิชาการและนิทรรศการ “ทรัพยากรไทย: ก้าวสู่โลกกว้างอย่างมั่นใจ” ณ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน จังหวัดนครราชสีมา ตุลาคม 2554
- Poster presentation และนำเสนอตัวอย่างผลิตภัณฑ์ ในการประชุมเภสัชกรรมแห่งชาติ ครั้งที่ 8 เรื่อง “From Silk to Wound” ณ มหาวิทยาลัยนเรศวร พิษณุโลก 30 มกราคม 2555.

การอบรมวิชาการ และจริยธรรม

- United Nations Industrial Development Organization “Global Workshop on GMP in the Pharmaceutical Sector” Montreal, Canada. 19 – 30 June 1995.
- มหาวิทยาลัย Toyama Medical and Pharmaceutical University, Toyama, ประเทศญี่ปุ่น September - November 2004
- มหาวิทยาลัย University of Hamburg, Hamburg, ประเทศเยอรมัน (September - December 2005)

- หลักสูตรจริยธรรมในมนุษย์ หลักสูตร “International Course on Research Ethics” จัดการอบรม โดย WHO-TDR Clinical Coordination and Training Center, Thammasat University, Thailand ระหว่างวันที่ 27-30 September, 2010
- หลักสูตรจริยธรรมในมนุษย์ หลักสูตร “หลักการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ และการทบทวนพิจารณาโครงการวิจัยในมนุษย์” จัดการอบรมโดย ชมรมจริยธรรมการวิจัยในคนในประเทศไทย (FERCIT) ร่วมกับ มหาวิทยาลัยนเรศวร Naresuan University, Thailand ระหว่างวันที่ 13 September, 2012
- หลักสูตรจริยธรรมในมนุษย์ หลักสูตร “International Course on Surveying and Evaluating Ethical Review Practices” the Faculty of Medicine, Chulalongkorn University จัดการอบรมโดย FERCAP-SIDCER-NECAST ระหว่างวันที่ 28-30 September, 2012

การประชุมวิชาการ

- การประชุมวิชาการ “the 4th World Congress on Regenerative Medicine 2009” ณ โรงแรม Bangkok convention center and Centara grand hotel กรุงเทพฯ ระหว่างวันที่ 12-14 March 2009
- การประชุมวิชาการ “the 4th SUT Stem Cell Workshop Proceedings: Stem Cell Innovation: a Milestone beyond Life Science Roadblocks” ณ โรงแรม Suranaree University of Technology จังหวัดนครราชสีมา ระหว่างวันที่ 24-30 July 2010
- การประชุมวิชาการ Bio-Asia Project: PLANTASAFE 2nd Seminar, From Pharmacognosy to Pharmacology: Interactive approach of natural product research หัวข้อ “Ex-vivo porcine skin wound healing model” 13 – 19 February 2010. Pitsanuloke, Thailand.
- การประชุมวิชาการ Bio-Asia Project: PLANTASAFE 3rd Seminar, Forum on international herbs research and development หัวข้อ “Ex-vivo porcine skin wound healing model and its application” 25 July – 8 August 2010. Urumqi, Xinjiang, China.
- การประชุมวิชาการ “the 2nd Current Drug Development International Conference 2012” ณ โรงแรม Phuket Graceland Resort and Spa Hotel จังหวัดภูเก็ต ระหว่างวันที่ 2-4 ม.ค. 2012

Invited Speaker

- ในการประชุมวิชาการ Bio-Asia Project: PLANTASAFE 2nd Seminar, From Pharmacognosy to Pharmacology: Interactive approach of natural product research หัวข้อ “Ex-vivo porcine skin wound healing model” 13 – 19 February 2010. Pitsanuloke, Thailand.
- ในการประชุมวิชาการ Bio-Asia Project: PLANTASAFE 3rd Seminar, Forum on international herbs research and development หัวข้อ “Ex-vivo porcine skin wound healing model and its application” 25 July – 8 August 2010. Urumqi, Xinjiang, China.
- ในการประชุม “International Conference on the Advances in Natural Products Science and Development of Natural Medicine” หัวข้อ “Wound Healing Efficacy and Wound Toxicity of Fibroin Silk Protein” ณ มหาวิทยาลัย Kangwon National University ประเทศเกาหลี ระหว่างวันที่ 18 – 20 พฤศจิกายน 2555 โดยคำเชิญของ Prof. Dr. Cheol Ho Park, Director of Institute of Bioscience & Biotechnology, Kangwon National University, Chuncheon, Korea



Nuttawut Saelim, Pharm.D., Ph.D.

Office Address:

Department of Pharmacy Practice
Faculty of Pharmaceutical Sciences,
Naresuan University, Pitsanuloke
Thailand 65000
Tel 04-6207980 Fax 055-261057
Email: nut456zz@yahoo.com

Home Address:

16/2 Tee-lek Street
Muang District
Suratthani
Thailand 84000

Current position

Lecturer and researcher, Department of Pharmacy Practice, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Naresuan University, Thailand

Education and degrees

Post doctoral	2005	University of Hamburg, Hamburg, Germany (Sep.-Dec.)
Post doctoral	2004	Toyama Medical and Pharmaceutical University, Toyama, Japan (Sep.-Nov.)
Ph.D.	2003	University of Texas Health Science Center at San Antonio (UTHSCSA), San Antonio, Texas, USA. in Cellular and Structural Biology under supervision of J. D. Lechleiter, Asso.Prof.
Pharm.D.	1998	University of Wisconsin, Madison, USA.
M.S.	1995	University of New South Wales, Sydney, Australia in Food Sciences and Technology
B.S.	1986	Prince of Songkla University, School of Pharmacy, Songkla, Thailand

Academic appointments and previous positions

1996 – present	Lecturer and researcher, Department of Pharmacy Practice, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Naresuan University, Thailand 65000
2007 – 2009	Assoc. Dean for research and public services, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Naresuan University

Current research

- The role of silk protein extracts, sericin and fibroin, on wound healing using *ex-vivo* porcine skin model and *in-vivo* animal model.

- Application of the ex-vivo porcine skin model for the study of wound healing effects of herbal extracts coated scaffolds.
- Application of the ex-vivo porcine skin model for melanoma study.
- Application of the ex-vivo porcine skin model for screening of wound healing promoting agents from herbal extracts.
- Development of cell-based model of NFAT nuclear-cytoplasm translocation for screening of immunosuppressant and immuno-enhancing agents.
- Acceleration of the wound healing rate by fibroin gel with targeting connexin43 antisense on ex-vivo porcine skin wound healing model.
- Isolation, identification, and characterization of active compounds as wound healing promoter from black and white jelly fungi.
- Searching for molecular targets and mechanism of actions of saponin glycosides from *Bacopa monnieri* on cardiovascular system.

Publications

- **Saelim, N.** et al. Nontranscriptional modulation of intracellular Ca²⁺ signaling by ligand stimulated thyroid hormone receptor. *J Cell Biol.* 2004 Dec 6; 167(5): 915-24.
- Suwanakitch P, Jeenapongsa R, **Saelim N**, Tohda M and Watanabe H. Altered mRNA expression in ischemic rat brain. *Thai Journal of Pharmacology* 2005; 27: 52.
- Suwanakitch P, Jeenapongsa R, Tohda M, **Saelim N** and Watanabe H. Expression of Alzheimer-related genes in rat brain (Abstract number A1-031P). *Federation of European Biochemical Societies Journal* 2005; 272: S1.
- Hayashi H, Tohda M, **Saelim N**, Murakami Y and Matsumoto K. Influences of the mRNA expression of amyloid precursor protein and the related factors in primary cultured cortex cells. *Journal of Pharmacological Sciences* 2005; 97: 261.
- **Saelim, N.** Isolation of amyloid precursor protein (APP) gene from NG cell line. *J. Health Res.* 2007 ; 21(3): 185-194.
- **Saelim N**, Holstein D, Chocron ES, Camacho P, Lechleiter JD. Inhibition of apoptotic potency by ligand stimulated thyroid hormone receptors located in mitochondria. *Apoptosis.* 2007; 12: 1781-1794.
- Suwanakitch P., Jeenapongsa R, Watanabe H, and **Saelim N.** Comparison of Alzheimer disease-related gene expressions in differentiated and undifferentiated NG108-15 cells. *ScienceAsia* 2008; 34:35-42.
- Sudchada P, Oo-puthinan S, Kerpin O, and **Saelim N.** ABCB1 gene expression in peripheral blood mononuclear cells in healthy Thai males and females. *Genet. Mol. Res.* 2010; 9(2): 1177-1185.
- Sudchada P, **Saelim N**, Oo-puthinan S, and Kerpin O. Relationship between the 3435C>T and 2677G>T/A polymorphisms and ABCB1 expression in peripheral blood mononuclear cells extracted from Thai males volunteers. *Thai J. of Genet.* 2011; 4(2): 143-157.
- Chocron ES, Sayre NL, Holstein D, **Saelim N**, Ibdah JA, Dong LQ, Zhu X, Cheng SY, and Lechleiter DJ. The Trifunctional Protein Mediates Thyroid Hormone Receptor-Dependent Stimulation of Mitochondria Metabolism *Molecular Endocrinology* 2012 26: 1117-1128.

- Khamlue R, Naksupan N, Ounaroorn A, **Saelim* N**. Skin wound healing promoting effect of polysaccharides extracts from *Tremella fuciformis* and *Auricularia auricula* on the *ex-vivo* porcine skin wound healing model. International Proceedings of Chemical, Biological & Environmental Engineering *IPCBEE* 2012 43: 93-98.
- Khamlue R, Ounaroorn A, **Saelim* N**. Purification and characterization of polysaccharides extracted from *Tremella fuciformis* and *Auricularia auricula*. *MFUIC-2012*. 2012 in press.
- Naksupan N, **Saelim* N**, Pornarin Taepavarapruk P, and Taepavarapruk N. Toxicity testing and wound healing efficacy of fibroin gel in animal model. *MFUIC-2012*. 2012 in press.

Patents

- Petty Patent No. 0903000191 (2011) Extraction and purification processes of yellow pigment, sericin and fibroin proteins from Thai yellow silk cocoons.
- Petty Patent No. 0903000493 (2011) Development of *Ex-vivo* porcine skin model and optimizing *ex-vivo* skin tissue culture conditions.

Trainings

- United Nations Industrial Development Organization “Global Workshop on GMP in the Pharmaceutical Sector” Montreal, Canada. 19 – 30 June 1995.
- Toyama Medical and Pharmaceutical University, Toyama, JAPAN. September - November 2004.
- University of Hamburg, Hamburg, GERMANY. September - December 2005.
- Human ethics training course “International Course on Research Ethics” by WHO-TDR Clinical Coordination and Training Center, Thammasat University, THAILAND on 27-30 September, 2010.
- Human Ethics course หลักสูตร “Principle of research ethics related to human subjects and human research protocol reviewing” by FERCIT and Naresuan University, Naresuan University, THAILAND. 13 September, 2012.
- Human Ethics course “International Course on Surveying and Evaluating Ethical Review Practices” the Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, THAILAND. Host by FERCAP-SIDCER-NECAST 28-30 September, 2012.

Invited Speaker

- Bio-Asia Project: PLANTASAFE 2nd Seminar, From Pharmacognosy to Pharmacology: Interactive approach of natural product research. “*Ex-vivo* porcine skin wound healing model” 13 – 19 February 2010. Pitsanuloke, Thailand.
- Bio-Asia Project: PLANTASAFE 3rd Seminar, Forum on international herbs research and development. “*Ex-vivo* porcine skin wound healing model and its application” 25 July – 8 August 2010. Urumqi, Xinjiang, China.
- International Conference on the Advances in Natural Products Science and Development of Natural Medicine. “Wound Healing Efficacy and Wound Toxicity of Fibroin Silk Protein” Kangwon National University, Korea 18 – 20 November 2012. Invited by Prof. Dr. Cheol Ho Park, Director of Institute of Bioscience & Biotechnology, Kangwon National University, Chunchon, Korea.