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 และประสิทธิภาพผลการเร่งการฟื้นตัวของบาดแผลของสารสกัดโปรตีนจากรังไหม fibroin ในรูปแบบยาเตรียมแบบเจลในสัตว์ทดลอง (Sprague-Dawley rat) และมีการวางแผนของโครงการในอนาคตที่คณะผู้วิจัยตั้งเป้าที่จะพัฒนาสูตรตำรับเพื่อพัฒนาเป็นยาช่วยเร่งการฟื้นตัวของบาดแผลในมนุษย์ต่อไป

ซึ่งทราบเป็นเวลายาวนานแล้วว่า โปรตีน fibroin มีคุณสมบัติเข้ากันได้ดีกับร่างกาย ไม่ก่อให้เกิดการแพ้ และสามารถย่อยสลายได้ในร่างกาย มีความปลอดภัยสูง ตลอดจนมีรายงานหลายชิ้นระบุผลของสารสกัดโปรตีน fibroin อาจเสริมสร้างหรือเร่งกระบวนการฟื้นตัวของบาดแผล โดยสามารถช่วยเร่งการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนของเซลล์ มีฤทธิ์ยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระ และป้องกันการตายของเซลล์จากการขาดซีรั่ม แต่ส่วนใหญ่ของรายงานจะเป็นการทดลองใน *in-vitro* model นอกจากนั้นพบว่าผลิตภัณฑ์ fibroin ที่นำมาทดสอบจากรังไหมต่างชนิดกัน แหล่งผลิตที่ต่างกัน จะมีคุณลักษณะที่มีแตกต่างกันมากทั้งด้านกายภาพและเคมี ตลอดจนประสิทธิภาพการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ทีมผู้วิจัยจึงได้พัฒนาคิดค้นวิธีการสกัดโปรตีนไหม fibroin จากรังไหมสีเหลืองของไทย และทำการพิสูจน์คุณลักษณะของผลิตภัณฑ์ ซึ่งทีมผู้วิจัยประสพความสำเร็จในการแยกสกัดโปรตีน fibroin จากรังไหมเหลืองพันธุ์ไทยได้สำเร็จ 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 หนูเรท ตัวผู้ น้ำหนักตัว 200-250 กรัม โดยสัตว์ทดลองแต่ละตัวจะถูกสุ่มให้หมายเลขเพื่อสะดวกในการกำหนดวันการทำบาดแผลและการเก็บบาดแผล ตลอดจนระบุการใช้สารทดสอบในตำแหน่งแต่ละตำแหน่งของบาดแผล สัตว์ทดลองจะถูกเลี้ยงในกรง 1 ตัวต่อกรง ภายในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส และมีแสงสว่าง 12 ชั่วโมงสลับความมืด 12 ชั่วโมง มีการให้อาหารและน้ำอย่างบริบูรณ์ (โครงการนี้ผ่านการเห็นชอบจากคณะกรรมการจรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลอง มหาวิทยาลัยนเรศวรเป็นที่เรียบร้อย) 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. ยาเตรียมสารสกัดรังไหม fibroin ในรูปแบบเจลที่มีความเข้มข้นของ fibroin 1% gel in PBS, 2. ยาเตรียมสารสกัดรังไหม 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 20μl ในบาดแผลตามตำแหน่งของสัตว์ทดลองแต่ละตัวตามการสุ่ม สัตว์ทดลองข้างต้น (D1, D3, D5, D7 ชุดละ 8 ตัว ยกเว้น D14 มีจำนวน 6 ตัว) หลังผ่าตัดบาดแผลของสัตว์ทดลองจะถูกปิดด้วย 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) 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 มีความแตกต่างอย่างเห็นได้ชัดเจนในบาดแผลบนหลังสัตว์ทดลอง 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, $p<0.05$) นอกจากนั้นในกลุ่มบาดแผลที่ได้รับสารทดสอบ fibroin gel 2.5% จะมีบาดแผลที่เกิดการ re-epithelialization อย่างสมบูณ์ (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 วันภายหลังจากการทำบาดแผลจะไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มบาดแผลที่ได้รับสารทดสอบทั้ง 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 และไม่มีความแตกต่างกันระหว่างกลุ่มการทดลอง

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