

COMPARATIVE CLINICAL EFFICACY OF WOUND DRESSING CONTAINING
SILK FIBROIN WITH BIOACTIVE COATING LAYER VERSUS MEDICATED
PARAFFIN GAUZE DRESSING IN THE TREATMENT OF SPLIT-
THICKNESS SKIN GRAFT DONOR SITES

Miss Sukhontha Hasatsri



บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

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

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

Department of Pharmacy Practice

Faculty of Pharmaceutical Sciences

Chulalongkorn University

Academic Year 2015

Copyright of Chulalongkorn University

ประสิทธิศักร์ทางคลินิกเปรียบเทียบของแผ่นปิดแผลผสมโปรตีนเส้นไหมเคลือบด้วยสารมีฤทธิ์ทาง
ชีวภาพกับแผ่นปิดแผลชนิดผ้ากอซตาข่ายเคลือบพาราฟินแบบมียาในการรักษาบาดแผลจากการ
ปลูกถ่ายผิวหนังที่มีหนังแท้เหลืออยู่บางส่วน



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรดุษฎีบัณฑิต

สาขาวิชาการบริหารทางเภสัชกรรม ภาควิชาเภสัชกรรมปฏิบัติ

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2558

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Thesis Title	COMPARATIVE CLINICAL EFFICACY OF WOUND DRESSING CONTAINING SILK FIBROIN WITH BIOACTIVE COATING LAYER VERSUS MEDICATED PARAFFIN GAUZE DRESSING IN THE TREATMENT OF SPLIT-THICKNESS SKIN GRAFT DONOR SITES
By	Miss Sukhontha Hasatsri
Field of Study	Pharmaceutical Care
Thesis Advisor	Professor Pornanong Aramwit, Ph.D.
Thesis Co-Advisor	Associate Professor Apichai Angspatt, M.D.

Accepted by the Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Doctoral Degree

..... Dean of the Faculty of Pharmaceutical Sciences
(Assistant Professor Rungpetch Sakulbumrungsil, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

..... Chairman
(Associate Professor Thitima Pengsuparp, Ph.D.)

..... Thesis Advisor
(Professor Pornanong Aramwit, Ph.D.)

..... Thesis Co-Advisor
(Associate Professor Apichai Angspatt, M.D.)

..... Examiner
(Thitima Wattanavijitkul, Ph.D.)

..... Examiner
(Assistant Professor Pornthep Pungrasmi, M.D.)

..... External Examiner
(Associate Professor Antonella Motta, Ph.D.)

สุคนธา ภาสาศน์ศรี : ประสิทธิภาพของคลินิกเปรียบเทียบของแผ่นปิดแผลผสมโปรตีนเส้นไหมเคลือบด้วยสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพกับแผ่นปิดแผลชนิดผ้ากอซทากายเคลือบพาราฟินแบบมียาในการรักษาบาดแผลจากการปลูกถ่ายผิวหนังที่มีหนังแท้เหลืออยู่บางส่วน (COMPARATIVE CLINICAL EFFICACY OF WOUND DRESSING CONTAINING SILK FIBROIN WITH BIOACTIVE COATING LAYER VERSUS MEDICATED PARAFFIN GAUZE DRESSING IN THE TREATMENT OF SPLIT-THICKNESS SKIN GRAFT DONOR SITES) อ.ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ศ. ภาญ. ดร. พรอนงค์ อร่ามวิทย์, อ.ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: รศ. นพ. อภิชัย อังสพัทธ์, 150 หน้า.

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินความปลอดภัยและประสิทธิภาพของแผ่นปิดแผลผสมโปรตีนเส้นไหมเคลือบด้วยสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพในอาสาสมัครสุขภาพดีโดยใช้วิธี skin patch test และในการรักษาบาดแผลจากการปลูกถ่ายผิวหนังที่มีหนังแท้เหลืออยู่บางส่วนเปรียบเทียบกับ Bactigras[®] ซึ่งเป็นแผ่นปิดแผลมาตรฐาน

อาสาสมัครสุขภาพดีมีทั้งหมด 110 คน แผ่นหลังของอาสาสมัครสุขภาพดีแต่ละคนถูกแบ่งออกเป็นด้านซ้ายและด้านขวาและถูกสุ่มให้ติดแผ่นปิดแผลผสมโปรตีนเส้นไหมเคลือบด้วยสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพหรือ Bactigras[®] แผ่นปิดแผลทั้งสองชนิดจะถูกติดเป็นเวลา 3 วัน หลังจากนั้นแผ่นปิดแผลทั้งสองจะถูกเปลี่ยนและติดซ้ำต่อเนื่องไปอีก 3 วัน หลังจากนั้นวันเป็นเวลา 7 – 10 วัน จึงติดแผ่นปิดแผลทั้งสองชนิดซ้ำที่ตำแหน่งเดิมต่อเนื่องไปอีก 3 วัน ผลการประเมินผิวหนังโดยใช้เครื่อง Mexameter MX18[®] ไม่พบผิวหนังที่เกิดการระคายเคือง ถึงแม้ว่าผลการประเมินจาก Repeated Insult Patch Test (RIPT) scale พบผิวหนังที่เกิดการระคายเคืองในระดับน้อยถึงปานกลางในด้านที่ติดแผ่นปิดแผลผสมโปรตีนเส้นไหมเคลือบด้วยสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพ (3.64%) แต่ผลการประเมินที่ได้เทียบเท่ากับผลที่ได้จากแผ่นปิดแผลในท้องตลาด

บาดแผลจากการปลูกถ่ายผิวหนังที่มีหนังแท้เหลืออยู่บางส่วนมีทั้งหมด 30 บาดแผล จากจำนวนผู้ป่วยทั้งหมด 23 คน บาดแผลจากการปลูกถ่ายผิวหนังที่มีหนังแท้เหลืออยู่บางส่วนแต่ละบาดแผลถูกแบ่งออกเป็นด้านบนและด้านล่างและถูกสุ่มให้รักษาด้วยแผ่นปิดแผลผสมโปรตีนเส้นไหมเคลือบด้วยสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพหรือ Bactigras[®] ระยะเวลาในการหายของบาดแผลของด้านที่รักษาด้วยแผ่นปิดแผลผสมโปรตีนเส้นไหมเคลือบด้วยสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพนั้น (11.0 ± 6.0 วัน) พบว่าหายเร็วกว่าด้านที่รักษาด้วย Bactigras[®] (14.0 ± 6.0 วัน) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 10^{-6}$) บาดแผลด้านที่รักษาด้วยแผ่นปิดแผลผสมโปรตีนเส้นไหมเคลือบด้วยสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพพบว่าเจ็บปวดน้อยกว่า ($p \leq 10^{-4}$) และความสามารถในการปกป้องผิวหนังจากการสูญเสีย น้ำผิวหนังเร็วกว่า ($p = 10^{-5}$) บาดแผลด้านที่รักษาด้วย Bactigras[®] อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในทุกวันที่มีการประเมิน บาดแผลทั้งสองด้านไม่พบการติดเชื้อ ค่า AST, ALT, ALP, albumin, BUN และ Scr ลดลงหลังการผ่าตัด แต่ค่ามัธยฐานของทุกค่ายังคงอยู่ในช่วงค่าปกติ ลักษณะของเซลล์ผิวหนังที่ติดกับแผ่นปิดแผลผสมโปรตีนเส้นไหมเคลือบด้วยสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพหลังแผ่นปิดแผลหลุดลอกออก พบว่าเมื่อนำไปสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์มีขอบเขตของเซลล์ที่ชัดเจน แสดงให้เห็นถึงรูปร่างของเซลล์ผิวหนังที่ ดีกว่า

การวิจัยนี้สรุปได้ว่าแผ่นปิดแผลผสมโปรตีนเส้นไหมเคลือบด้วยสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพสามารถใช้เป็นทางเลือกในการรักษาบาดแผลจากการปลูกถ่ายผิวหนังที่มีหนังแท้เหลืออยู่บางส่วน เนื่องจากมีข้อมูลความปลอดภัยในอาสาสมัครสุขภาพดีในระดับที่ยอมรับได้ อีกทั้งสามารถกระตุ้นการหายและลดความเจ็บปวดของบาดแผลจากการปลูกถ่ายผิวหนังที่มีหนังแท้เหลืออยู่บางส่วน โดยไม่ก่อให้เกิดอาการไม่พึงประสงค์

ภาควิชา	เภสัชกรรมปฏิบัติ	ลายมือชื่อนิสิต
สาขาวิชา	การบริหารทางเภสัชกรรม	ลายมือชื่อ อ.ที่ปริกษาหลัก
ปีการศึกษา	2558	ลายมือชื่อ อ.ที่ปริกษาร่วม

5476553033 : MAJOR PHARMACEUTICAL CARE

KEYWORDS: SILK / WOUND DRESSING / SPLIT-THICKNESS SKIN GRAFT DONOR SITE / WOUND HEALING

SUKHONTHA HASATSRI: COMPARATIVE CLINICAL EFFICACY OF WOUND DRESSING CONTAINING SILK FIBROIN WITH BIOACTIVE COATING LAYER VERSUS MEDICATED PARAFFIN GAUZE DRESSING IN THE TREATMENT OF SPLIT-THICKNESS SKIN GRAFT DONOR SITES. ADVISOR: PROF. PORNANONG ARAMWIT, Ph.D., CO-ADVISOR: ASSOC. PROF. APICHA ANGSPATT, M.D., 150 pp.

The objectives of this study were to evaluate the safety and efficacy of wound dressing containing silk fibroin with bioactive coating layer in healthy volunteers using a skin patch test and in the treatment of Split-Thickness Skin Graft (STSG) donor sites compared with commercially available medicated paraffin gauze dressing, Bactigras[®], a standard treatment.

Each back of 110 healthy volunteers was divided into the left and right sides and was randomized to receive the wound dressing containing silk fibroin with bioactive coating layer or Bactigras[®]. Both dressings were left for 3 days. After that, both dressings were changed and left for an additional 3 days. Seven to ten days later, both dressings were applied on the identical areas and left in place for 3 days. There was no evidence of skin irritation measured by Mexameter MX18[®]. Although, the results obtained from the Repeated Insult Patch Test (RIPT) scale revealed there was evidence of mild and moderate erythema in the wound dressing containing silk fibroin with bioactive coating layer group (3.64%), this evidence was comparable to the commercial wound dressing.

Each donor site of 30 split-thickness skin graft donor sites from 23 patients was divided into the upper and lower sides and was randomized to receive wound dressing containing silk fibroin with bioactive coating layer or Bactigras[®]. The results showed that the healing time of STSG donor sites treated with the wound dressing containing silk fibroin with bioactive coating layer (11.0 ± 6.0 days) was significantly faster than that treated with Bactigras[®] (14.0 ± 6.0 days) ($p=10^{-6}$). The sides treated with the wound dressing containing silk fibroin with bioactive coating layer showed significantly less pain ($p \leq 10^{-4}$) and more rapid recovery in the water barrier function ($p = 10^{-5}$) than those treated with Bactigras[®] on all evaluation days. There were no signs of STSG donor site infection in either wound dressing group. AST, ALT, ALP, albumin, BUN and Scr were decreased after operation; however, the median of all parameters was in the normal range. The morphology of epithelial cells attached on the wound dressing containing silk fibroin with bioactive coating layer after falling off spontaneously under the microscope showed a definite border of cells, indicating a better shape of epithelial cells.

In conclusion, wound dressing containing silk fibroin with bioactive coating layer can be used as optional treatment for STSG donor sites due to an acceptable safety profile in healthy volunteers and its promotion of wound healing and minimizing pain without adverse effects in the treatment of STSG donor sites.

Department: Pharmacy Practice
Field of Study: Pharmaceutical Care
Academic Year: 2015

Student's Signature
Advisor's Signature
Co-Advisor's Signature

ACKNOWLEDGEMENTS

Firstly, I would like to express my deepest gratitude to my thesis advisor, Professor Pornanong Aramwit, Pharm.D., Ph.D. of the Department of Pharmacy Practice, Faculty of Pharmaceutical Sciences, for the continuous support, valuable guidance, encouragement and patience throughout the course of this thesis. Besides my thesis advisor, I would like to express my deeply appreciation to my thesis co-advisor, Associate Professor Apichai Angspatt, M.D. of the Division of Plastic and Reconstructive Surgery, Department of Surgery, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, for the valuable guidance, encouragement and kindness along this thesis .

My sincere thanks also goes to the members of my thesis committee for investing time and providing valuable comments.

I would like to express my deeply gratitude to Ms. Thanyawan Aresanasuwan at Bangkok Biomaterial Center, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University for her technical assistance throughout my sample preparations. Special thanks to physicians, nurses and surgery staff for their assistance helped me in the operating room at King Chulalongkorn Memorial Hospital. I must also gratefully acknowledge all healthy volunteers and patients who participated in this study

I would also like to thank my family for their understanding, support and strength through my entire life and in particularly, I am thankful to my best friend, Pol. Maj. Munwat Jaroenchaisombut and all friends at my faculty for their support and encouragement.

Finally, I recognize that this research would not have been possible without the financial support of the Thailand Research Fund through the Royal Golden Jubilee Ph.D. Program (Grant No. PHD/0149/2553) and the support of the Agricultural Research Development Agency, and express my gratitude to those agencies.

CONTENTS

	Page
THAI ABSTRACT	iv
ENGLISH ABSTRACT	v
ACKNOWLEDGEMENTS.....	vi
CONTENTS.....	vii
LIST OF TABLES.....	x
LIST OF FIGURES	xii
LIST OF ABBREVIATIONS.....	xiv
CHAPTER I INTRODUCTION	1
1.1 Background and rationale	1
1.2 Objectives	4
1.3 Hypotheses	5
1.4 Scopes	5
CHAPTER II LITERATURE REVIEWS	6
2.1 Wound	6
2.2 Wound dressing	8
2.3 Silk.....	16
2.4 Skin grafting	25
2.5 Transepidermal water loss (TEWL).....	30
2.6 Erythema and melanin	32
CHAPTER III RESEARCH METHODOLOGY	34
3.1 Fabrication of the wound dressing containing silk fibroin with a bioactive coating layer	34

	Page
3.2 Phase I: Clinical safety of the wound dressing containing silk fibroin with a bioactive coating layer in healthy volunteers	35
3.3 Phase II: Clinical efficacy and safety of the wound dressing containing silk fibroin with bioactive coating layer in the treatment of split-thickness skin graft donor sites	39
3.4 Data analysis and statistical	46
3.5 Ethical consideration.....	46
CHAPTER IV RESULTS	47
4.1 Phase I: Clinical safety of the wound dressing containing silk fibroin with bioactive coating layer in healthy volunteers	47
4.2 Phase II: Clinical efficacy and safety of the wound dressing containing silk fibroin with bioactive coating layer in the treatment of split-thickness skin graft donor sites	54
CHAPTER V DISCUSSION	71
CHAPTER VI CONCLUSIONS.....	81
REFERENCES.....	85
APPENDICES.....	96
Appendix A	97
Appendix B	98
Appendix C	102
Appendix D	104
Appendix E.....	105
Appendix F	106
Appendix G	107

	Page
Appendix H	116
Appendix I	118
Appendix J	119
Appendix K	121
Appendix L	135
VITA	150



LIST OF TABLES

	Page
Table 1: Factors affecting wound healing.....	7
Table 2: Properties of the ideal wound dressing	9
Table 3: Wound dressings and properties.	11
Table 4: Attachment and proliferation tests of SF.....	16
Table 5: In vivo efficacy evaluation (time to complete healing) of SF in rats	18
Table 6: Methionine content of silk sericin from various Thai silk strains	19
Table 7: Attachment and proliferation tests of SS.....	20
Table 8: In vivo efficacy evaluation (time to complete healing) of SS in rats	22
Table 9: Clinical study of SS in patients.....	22
Table 10: Classification of STSGs according to the thickness of the dermis.....	26
Table 11: Donor site assessments	29
Table 12: Baseline characteristics of healthy volunteers for patch test.	48
Table 13: Erythema and melanin levels of the skin of healthy volunteers before and during the patch test	50
Table 14: Percentage of severity of cutaneous reactions of the skin of healthy volunteers during the patch test	53
Table 15: Baseline characteristics of patients who underwent a STSG procedure	55
Table 16: Baseline characteristics of STSG donor sites.....	56
Table 17: The median healing time of STSG donor sites in each dressing	57
Table 18: TEWL of normal skin and STSG donor sites in each dressing	62
Table 19: Renal and hepatic functions of patients	66

Table 20: Abnormal values of each laboratory data on pre- and post-operative days ... 67



LIST OF FIGURES

	Page
Figure 1: Medicated paraffin gauze dressing (Bactigras [®])	15
Figure 2: Wound dressing containing silk fibroin with bioactive coating layer	24
Figure 3: Classification of skin grafts	25
Figure 4: Zimmer [®] electric dermatome	27
Figure 5: STSG procedure	28
Figure 6: Tewameter [®] TM 300	30
Figure 7: Mexameter [®] MX18	32
Figure 8: Schedule of phase I study in healthy volunteers	38
Figure 9: Flowchart of phase II clinical study	45
Figure 10: Erythema and melanin levels of the skin of healthy volunteers at the beginning phase, induction phase I, induction phase II and challenge phase.....	51
Figure 11: Healed STSG donor site on the anterior thigh.....	58
Figure 12: Median pain score of donor site wound treated with Bactigras [®] and wound dressing containing silk fibroin with bioactive coating layer.	60
Figure 13: Median transepidermal water loss (TEWL) of healed STSG donor site treated with Bactigras [®] and wound dressing containing silk fibroin with bioactive coating layer.....	63
Figure 14: Median body temperature of patient.	64
Figure 15: Macroscopic images on both sides of the Bactigras [®] and wound dressing containing silk fibroin with bioactive coating layer after falling off spontaneously.	69

Figure 16: Morphology of epithelial cells attached on the Bactigras[®] and wound dressing containing silk fibroin with bioactive coating layer after falling off spontaneously under a polarized light microscope. 70



LIST OF ABBREVIATIONS

AIDS	=	Acquired immunodeficiency syndrome
ALP	=	alkaline phosphatase
ALT	=	Alanine aminotransferase
AST	=	Aspartate aminotransferase
BMI	=	Body mass index
BUN	=	Blood urea nitrogen
CMC	=	Carboxymethyl cellulose
ECF	=	Extracellular fluid
FTSG	=	Full-thickness skin graft
H	=	Hours
ICDRG	=	International contact dermatitis research group
MEBO	=	Moist Exposed Burn Ointment
PDGF	=	Platelet-derived growth factor
PEG-DE	=	Polyethylene glycol diglycidyl ether
POSAS	=	Patient and observer scar assessment scale
PVA	=	Polyvinyl alcohol

RIPT	=	Repeated insult patch test
Scr	=	Serum creatinine
SF	=	Silk fibroin
SS	=	Silk sericin
STSG	=	Split-thickness skin graft
TEWL	=	Transepidermal water loss
VAS	=	Visual analog scale



CHAPTER I

INTRODUCTION

1.1 Background and rationale

A wound can be classified according to the method of wound closure (primary, secondary, and tertiary wound closure). Suture is the method of primary wound closure. It is the appropriate method for clean wounds without serious wound exudate. In case of clean wounds with tissue loss or infected wounds, the wounds should be closed by secondary wound closure. With this method, the wound is left open and treated with wound dressing changes to reduce the risk of infections and prevent further trauma. Finally, infected wounds with extensive tissue loss should be closed by tertiary wound closure. In this case, the wound is debrided and left open for a few days. Then, the wound is closed by primary (suture) or secondary (covered with appropriate wound dressing) wound closure according to the evidence of infection and the presence of red granulation tissue (7, 8).

From the method of wound closure, choosing an appropriate wound dressing has an important role for wound care. Maintaining a moist wound environment to promote epithelialization, the ability to absorb wound exudate and minimizing pain are the most important properties of the ideal wound dressing. Wound dressings can be categorized into three types (passive, interactive, and active dressings) (9). Passive dressings or tulle gras (such as Jelonet[®] and Bactigras[®]) are inexpensive and easy to use, but they adhere to the wound surface and they cannot absorb wound exudate. Whereas, interactive dressings or semi-occlusive/occlusive dressings with absorption capacity (such as DuoDERM[®] and Allevyn[®]) do not insert any biological substances to promote wound healing. Moreover, active dressings or wound dressings with biological substances (such as human skin equivalent or growth factors) to promote wound healing are still very expensive because

they are only imported (10-15). Therefore, we have developed a new biomaterial based on Thai silk for wound dressing application. This new agricultural innovation will enhance economic growth (decreasing imports or increasing exports) and patients can have access to wound dressing with a wound healing promoting substance at a low cost.

Silk is composed of two types of proteins: silk fibroin (SF) and silk sericin (SS). SF and SS were used to provide a wound healing promoting property in our wound dressing because of their biological properties. Based on previous *in vitro* studies, SF and SS can support attachment, proliferation and migration of keratinocytes and fibroblasts. In addition, SS can enhance collagen production (16-20). These properties help to accelerate re-epithelialization or promote wound healing. Moreover, SF and SS can be used as biomedical materials because of their physico-chemical properties, including biodegradability and biocompatibility (18, 21-23). Minoura (1990) (21) developed 1% SF membrane. The result of enzymatic degradation using protease showed that the SF membranes degraded sharply in the first few days. For 7.5:5% SS/gelatin films, the films degraded completely within 2 weeks in phosphate buffered saline (pH 7.4). It was also found that the films with less content of SS degraded at a slower rate (23). Development of 2:1% SF/elastin scaffolds showed no toxicity to BJ5ta cell line, normal human skin fibroblasts (18). Also, development of 0.4:0.4% sericin/collagen membranes showed no toxicity to HaCat human keratinocyte cells and 3T3 fibroblast cells (24).

For *in vivo* studies of SF, Inpanya (2012) (17) developed 2% SF film. Results from the full thickness skin wound model in diabetic rats indicated that the wounds dressed with SF film were smaller than untreated wounds after 7 days. Moreover, the wounds dressed with SF film showed almost complete healing after 14 days. For *in vivo* studies of SS, Siritienthong (2012) (25) developed 3:2% SS/polyvinyl alcohol scaffold, the results also showed that the time needed for complete healing of a full thickness skin wound in rats was significantly faster for SS/polyvinyl alcohol scaffold than polyvinyl alcohol scaffold (14 and 21 days, respectively).

In patients who underwent abdominal wall fascial repair, SF biologic scaffold supported the repair of the abdominal wall by subcutaneous placement. SF biologic

scaffolds were completely removed at $10.7 \text{ days} \pm 2.9 \text{ days}$ with low complication rates (6.5%) (26). In patients who underwent the split-thickness skin graft (STSG) procedure, the time for complete healing of the donor sites treated with SS scaffold ($12 \pm 5.0 \text{ days}$) was significantly shorter than those treated with Bactigras[®] ($14 \pm 5.2 \text{ days}$). In addition, on the first 4 post-operative days, the patient's pain level was significantly lower in the donor sites treated with the SS scaffold (27).

Due to their advantages in wound healing, SF and SS were selected to develop the innovative bi-layered wound dressing which is composed of an SF-SS/gelatin spongy bioactive layer over the wax-coated SF woven fabrics contact layer (or called "wound dressing containing silk fibroin with bioactive coating layer"). Both SF and SS were mixed with a gelatin solution (natural polymer) in order to form a spongy structure to increase the ability of the wound dressing to absorb wound exudate. Although the wound dressing containing the silk fibroin with a bioactive coating layer could absorb less wound exudate than the Allevyn[®] dressing (highly absorbent wound dressing) in a wound bed model, they had different patterns of absorption ability. The Allevyn[®] dressing showed high absorption ability at the first 3 h and then it became steady, while the wound dressing containing the silk fibroin with bioactive coating layer could continuously absorb wound exudate during the first 24 h (28). In addition, SF woven fabrics were immersed in a carnauba wax solution to reduce the adherence to the wound surface. In the peel test with porcine skin, SF woven fabrics showed less adhesion than commercial wound dressing mesh (Sofra-tulle[®]) (29). For wound healing promoting properties, the wound dressing containing silk fibroin with bioactive coating layer can support cell attachment, proliferation, migration and collagen production in an *in vitro* study (28, 29). *In vivo* tests of full-thickness wounds of rat skin showed that wounds treated with the wound dressing containing the silk fibroin with bioactive coating layer had a greater extent of wound size reduction, epithelialization and collagen formation than those treated with 3M[™] Tegaderm[®] high performance foam adhesive dressing (29).

According to its advantages of the wound dressing containing the silk fibroin with a bioactive coating layer *in vitro* and *in vivo* study, the objective of the present study is to

investigate the clinical safety of this innovative bi-layered wound dressing in healthy volunteers by using a skin patch test.

The wound area following the STSG procedure can be used as a wound model for a comparative study because of its smooth surface and uniform thickness. In addition, it is a clean wound because the surgeon makes it in a sterilized environment (operating room). STSG is one skin graft technique that takes healthy skin (epidermis and part of dermis) and uses it to cover a wound. The new wound area after harvesting the healthy skin is called the “STSG donor site” (1, 30). At STSG donor site management at King Chulalongkorn Memorial Hospital, Bactigras[®] (medicated paraffin gauze dressing) has been used on donor sites. Apart from investigating healthy volunteers' safety profiles, the objective of the present study is to compare the clinical efficacy and safety of this innovative bi-layered wound dressing with standard dressing (Bactigras[®]) in the treatment of STSG donor sites, with regard to the healing time, patients' pain intensity, the skin's transepidermal water loss (TEWL) after healing, evidence of infection, systemic effects on hepatic and renal functions and the morphology of cells attached to the wound dressing at King Chulalongkorn Memorial Hospital.

1.2 Objectives

- 1.2.1 To investigate the clinical safety of the wound dressing containing the silk fibroin with bioactive coating layer in healthy volunteers by using a skin patch test.
- 1.2.2 To investigate the clinical efficacy and safety of the wound dressing containing the silk fibroin with bioactive coating layer compared with standard dressing (medicated paraffin gauze dressing; Bactigras[®]) in the treatment of split-thickness skin graft donor sites.

1.3 Hypotheses

- 1.3.1 Wound dressing containing silk fibroin with a bioactive coating layer shows minimal skin irritation or sensitization after patch testing in healthy volunteers.
- 1.3.2 STSG donor sites treated with wound dressing containing silk fibroin with a bioactive coating layer shows shorter healing time, less pain and more rapid TEWL recovery than those treated with standard dressing (medicated paraffin gauze dressing; Bactigras®). Moreover, there should be no difference in the rate of infection and adverse events between STSG donor sites treated with wound dressing containing silk fibroin with a bioactive coating layer and those treated with medicated paraffin gauze dressing.

1.4 Scopes

- 1.4.1 A skin patch test was conducted to investigate the clinical safety of wound dressing containing silk fibroin with a bioactive coating layer in terms of the severity of skin irritation or sensitization in healthy volunteers between November 2012 and February 2013 at the Department of Pharmacy Practice, Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand.
- 1.4.2 The prospective, randomized, controlled, match pair clinical trial was conducted to investigate the clinical efficacy and safety of wound dressing containing silk fibroin with a bioactive coating layer in terms of the healing time, patients' pain intensity, the skin's TEWL after healing, evidence of infection, and the systemic effects on hepatic and renal functions in the treatment of STSG donor sites between October 2013 and December 2014 at the Division of Plastic and Reconstructive Surgery, Department of Surgery, King Chulalongkorn Memorial Hospital, Bangkok, Thailand.

CHAPTER II

LITERATURE REVIEWS

2.1 Wound

A wound can be classified according to the method of wound closure as follows:

2.1.1 Primary wound closure

Suture is the method of primary wound closure (skin edges are brought together). This is the most common method to close a wound and appropriate for clean wounds without serious wound exudate. If the wound cannot be closed by suture because of tissue loss, excessive swelling or being infected, a secondary wound closure should be taken done (7, 8).

2.1.2 Secondary wound closure

The wound is left “open” and allowed to heal by itself with wound dressing changes. The wound is covered with dressing to reduce the risk of infection and prevent further trauma. There is no one wound dressing type suitable for all wounds. Therefore, choosing an appropriate wound dressing is an important role for wound healing in this method (7, 8).

2.1.3 Tertiary wound closure

In case of infected wounds with extensive tissue loss, the wounds should be debrided to remove dead, damaged or infected tissue and then left open for a few days. After that, the wound is closed by primary (suture) or secondary (covered with appropriate wound dressing) wound closure according to the evidence of infection and the presence of red granulation tissue. It is also called “delayed primary wound closure” (7, 8).

There are many factors that affect wound healing. They can be categorized into local and systemic factors as shown in Table 1. Factors that directly come from the characteristics of the wound itself are called “Local Factors”. Size, depth, location and duration of the wound are important factors to determine wound assessment. Wounds with less tissue loss can be closed by primary wound closure. Whereas, wounds with more

tissue loss or ones that are larger in size and depth should be closed by secondary wound closure. Wounds that are large in size ($> 2 \text{ cm}^2$) or depth (tendon, ligament or bone are exposed), or the location is in poorly vascularized tissue or have long duration (> 2 months) can lead to delayed wound healing (31, 32).

A temporary low level of oxygen or hypoxia after an injury enhances wound healing by induction cytokine and growth factor production from keratinocytes, fibroblasts and macrophages such as $\text{TNF-}\alpha$, $\text{TGF-}\beta$, PDGF, VEGF, and endothelin-1. On the other hand, chronic hypoxia interferes with re-epithelialization and collagen production. Bacterial infection also plays an important factor for wound healing, particularly *P. aeruginosa* and *Staphylococcus* infection. If there is a bacterial infection, prolonged inflammation (or prolonged elevation of pro-inflammatory cytokines such as IL-1 and $\text{TNF-}\alpha$) will occur (31).

Table 1: Factors affecting wound healing

Local factors	Systemic Factors
Size, depth, location and duration of wound	Age
Oxygenation	Diseases
Infection	Medications
	Alcoholism and smoking
	Nutrition

Systemic factors refer to the patient's characteristics, disease status or overall health condition which influences wound healing. In patients older than 65 years of age, chemokine production and macrophage phagocytic capacity (inflammatory response), re-epithelialization, angiogenesis and collagen production can be altered as a result of decreased rates of wound healing (31, 33). In addition, diabetes is an important comorbid condition that can affect wound healing involving a high metalloproteases level, hypoxia, impaired angiogenesis, decreased host immune resistance and fibroblasts and epithelial cell dysfunction (31). Many patients are treated with medication that can interfere with wound healing such as corticosteroids and chemotherapeutic drugs. Corticosteroids inhibit

macrophage levels and suppress fibroblast proliferation and collagen production. Chemotherapeutic drugs impair fibroblast proliferation, decline wound matrix formation and impair immune functions (31, 34). Alcohol consumption and smoking can also affect wound healing. Alcohol intake increases susceptibility to infection and impairs wound healing by inhibiting angiogenesis and collagen synthesis, interfering with pro-inflammatory cytokine release. Smoking decreases the numbers of monocytes and macrophages and impairs fibroblast migration and proliferation (31). Lastly, glucose, amino acids (arginine and glutamine), polyunsaturated fatty acid, and vitamins (retinol, L-ascorbic acid, tocopherol, magnesium, zinc, copper and iron) play an important role in wound healing. Therefore, the nutrition status should be monitored in patients with chronic wounds or those who cannot take food by mouth (31, 34).

2.2 Wound dressing

In the secondary wound closure method, if the wound is left open without wound dressing, a hard scab will form from the drying of wound exudate and the risk of infection and trauma will increase. Although mesh gauze is still the most commonly used wound dressing, the development of a new wound dressing will help to achieve the ideal wound dressing properties for optimal wound healing (Table 2) (3).

Table 2: Properties of the ideal wound dressing (3, 35)

Maintains a moist environment
Absorbs exudate
Allows for gaseous exchange
Minimizes pain
Protects from micro-organisms contamination
Protects from mechanical trauma
Is comfortable to remove or change
Non-allergenic
Easy-to-use
Cost-effective

The ideal wound dressing should absorb excess wound exudate and provide a moist wound environment because moist wounds heal faster than dry wounds. Therefore, the amount of wound exudate should be considered in order to select an appropriate wound dressing based on the absorption capacity of the wound dressing. Moreover, wound dressings that are difficult to use may not be appropriate for patients who require assistance (3).

Wound dressings can be categorized into three types (passive, interactive, and active dressings) and are subdivided into four groups (non-occlusive, semi-occlusive, occlusive, and biologic dressings) (Table 3) (9). Non-occlusive, semi-occlusive, and occlusive dressings are classified by evaporative water loss. Non-occlusive dressings are made of a fine mesh gauze (such as Bactigras[®], Sofra-tulle) and are permeable to water vapor, fluid and micro-organisms. Therefore, they are unable to absorb wound exudate and cannot protect the wound from micro-organisms contamination. Moreover, they are allowed to dry out and stick to the wound surface causing pain and trauma. However, it is still the most commonly used wound dressing because it is inexpensive and easy-to-use. Semi-occlusive dressings are permeable to water vapor, but impermeable to fluid and microorganisms. Occlusive dressings are impermeable to water vapor. Both dressing types

(semi-occlusive and occlusive dressings) can provide a moist wound environment to promote wound healing and control the amount of wound exudate. Biologic dressings can promote wound healing by providing biological substances such as human skin equivalent or growth factors (9, 36).



Table 3: Wound dressings and properties. (1-6)

Wound dressing categories	Wound dressing descriptions	Advantages	Disadvantages	Available products
<p><i>Passive</i> (<i>Non-occlusive</i>)</p> <p>Tulle gras</p>	<ul style="list-style-type: none"> -Mesh gauze impregnated with various substances (such as paraffin, lanolin, chlorhexidine etc.) -Exudates through the mesh and are absorbed in a secondary layer of absorbent dressing. 	<ul style="list-style-type: none"> -Combined use with other topical products. -Low cost 	<ul style="list-style-type: none"> -Non-absorbent properties -Painful removal 	<ul style="list-style-type: none"> Jelonet[®] Sofra-tulle[®] Bactigras[®]
<p><i>Interactive</i> (<i>Semi-occlusive/occlusive</i>)</p> <p>Film</p>	<ul style="list-style-type: none"> -Transparent sheets of polyurethane -Gas and water vapor permeable, but impermeable for fluid and bacteria. 	<ul style="list-style-type: none"> -Allowing clinicians to observe the wound (transparent sheet) -Self-adhesive 	<ul style="list-style-type: none"> -Non-absorbent properties 	<ul style="list-style-type: none"> Op-Site[®] Tegaderm[®]

Table 3: Wound dressings and properties (continue). (1-6)					
Wound dressing categories	Wound dressing descriptions	Advantages	Disadvantages	Available products	
Hydrocolloid	<ul style="list-style-type: none"> -Composed of carboxymethylcellulose, pectin, gelatin and adhesives. -Absorbs fluid exuding and forms a gel at the wound surface 	<ul style="list-style-type: none"> -Indicated for low-to-moderately exuding wounds -Self-adhesive 	<ul style="list-style-type: none"> -The dressing may produce foul odor. 	<ul style="list-style-type: none"> Comfeel® DuoDERM® 	
Hydrogel	<ul style="list-style-type: none"> -Composed of polymers and water (96%) 	<ul style="list-style-type: none"> -Rehydrates dry wounds -Non-adherent 	<ul style="list-style-type: none"> -Minor absorptive capabilities 	<ul style="list-style-type: none"> IntraSite® 	
Alginate	<ul style="list-style-type: none"> -Composed of calcium and sodium salts of alginic acid -Absorbs exudates and forms a sodium alginate gel 	<ul style="list-style-type: none"> -Indicated for highly exuding wounds -Hemostatic properties -Non-adherent 	<ul style="list-style-type: none"> -Should not be used in dry wounds 	<ul style="list-style-type: none"> Algisite® Kaltostat® Sorbsan® 	

Table 3: Wound dressings and properties (continue). (1-6)					
Wound dressing categories	Wound dressing descriptions	Advantages	Disadvantages	Available products	
Hydrofiber	-Sodium carboxymethylcellulose fibers -Absorbs exudates and forms a gel	-Indicated for highly exuding wounds -Non-adherent	-Should not be used in dry wounds -High cost	Aquacel®	
Foam	Polyurethane with or without a film outer layer	- Indicated for highly exuding wounds -Non-adherent	-Should not be used in dry wounds -High cost	Allevyn®	
<i>Active (Biologic)</i> Epidermal Replacement	Epidermal (keratinocytes) autograft on murine cells	-Promote wound healing	-A long culture time of keratinocytes, skin fragility -A short shelf life -High cost	Epicel®	

Table 3: Wound dressings and properties (continue). (1-6)					
Wound dressing categories	Wound dressing descriptions	Advantages	Disadvantages	Available products	
Dermal replacement	Composed of allogenic human fibroblasts and extracellular matrices	-Promote wound healing	-Storage requirement -High cost	Dermagraft®	
Skin replacement	Composed of epidermal layer (human keratinocytes) and dermal layer (bovine collagen populated with human fibroblasts)	-Promote wound healing	-Storage requirement -High cost	Apligraf® OrCel™	
Platelet-Derived Growth factor (PDGF)	Composed of human PDGF and becaplermin	-Promote wound healing	-High cost	Regranex®	

Passive dressings or tulle gras are inexpensive and easy to use, but adhere to the wound surface and cannot absorb wound exudate. Whereas, interactive dressings or semi-occlusive/occlusive dressings with absorption capacity do not insert any biological substances to promote wound healing. Moreover, active dressings or wound dressings with biological substances (such as human skin equivalent or growth factors) to promote wound healing are still very expensive because they are only imported (10-15). If the active dressings with non-adherent, absorbent properties and a low cost can be developed, they will be useful for patients.

In this comparative research, we have developed a new biomaterial based on Thai silk for wound dressing application. It can be classified as a biologic dressing type. Bactigras[®] (a mesh gauze impregnated with paraffin and 0.5% w/w chlorhexidine acetate) was chosen as the control wound dressing (Figure 1).



Figure 1: Medicated paraffin gauze dressing (Bactigras[®]) from Smith & Nephew

2.3 Silk

Silkworm or *Bombyx mori* (scientific name) is in the family Bombycidae. Silkworm produces a cocoon around itself for protection. The cocoon consists of a twin-core fiber called SF protein and an outer gummy covering substance called SS protein, or silk gum. Therefore, the silk is composed of two types of proteins, SF and SS. 70 - 80% of the total cocoon weight are SF and 20 – 30% are SS (37-41).

2.3.1 Silk fibroin (SF)

SF is insoluble in water and is mainly composed of 48% glycine, 32% alanine and 11% serine (42). Normally, the SF extraction method consists of three steps: degumming, dissolving and dialysis. Degumming is a process to eliminate SS by boiling it in 0.02 M Na_2CO_3 and then the degummed SF is dissolved in 9.3 M LiBr at 60°C, followed by dialysis for 3 days (43). SF is a widely used natural polymer for biomaterial applications, particularly for wound healing applications, because of its biological and physico-chemical properties.

For biological properties, there are various formats for SF such as film and scaffold. These forms have been proven to enhance cell attachment and proliferation, as shown in Table 4. These properties help to accelerate re-epithelialization (to promote wound healing).

Table 4: Attachment and proliferation tests of SF

Composition and form	Cell type
SF microfibers, SF nanofibers and SF film (16)	Normal human oral keratinocyte cells
SF film (17)	Human skin fibroblast cells
SF membrane (44)	Human tympanic membrane keratinocyte cells
SF scaffold (45)	Human foreskin fibroblast cells
SF/collagen and SF/gelatin scaffolds (46)	Rat chondrocyte cells

For physico-chemical properties, SF has high oxygen permeability, high water vapor permeability, good mechanical property, minimal inflammatory reaction, and biodegradability and biocompatibility (21, 47, 48). Minoura (1990) prepared 1% SF membranes to determine the physico-chemical properties. The results showed that SF membranes had water vapor permeability similar in comparison with the rate of water evaporation through normal skin. They also degraded sharply in the first few days (21). Santin (1999) prepared 0.5% SF membranes to determine the inflammatory reaction of the SF. SF membranes activated mononuclear cells at a lower level than the reference materials (48). In addition, the development of 2:1% SF/ elastin scaffolds showed no toxicity to the BJ5ta cell line (normal human skin fibroblasts) (18). These properties indicated that SF can be used as wound dressings.

In vivo study, the result of the safety evaluation (of rat subcutaneous tissue) found that the level of irritation of Thai SF scaffold (6.5% SF) was non-irritating to slightly irritating compared to the control group (Gelfoam[®]) and the inflammatory response did not significantly differ from the control group (49). For efficacy evaluation, the full thickness skin wounds in the rats treated with electrospun SF nanofibers healed faster than those treated with Tegaderm. The rat wounds treated with electrospun SF nanofibers were completely healed at 2 weeks post wound creation (50). The results of other studies also demonstrated that the rat wounds treated with SF healed faster than those treated with the control commercial wound dressing (Table 5).

Table 5: In vivo efficacy evaluation (time to complete healing) of SF in rats

Composition and form	Wound type	Time to complete healing
SF nanofibers (50)	Full-thickness skin wound on dorsum	14 days for 8% SF >14 days for Tegaderm
SF film (17)	Full-thickness skin wound on dorsum (diabetic rats)	14 days for 2% SF >14 days for untreated wound
SF/Polyvinyl alcohol film (51)	Full-thickness skin wound on dorsum	15 days for SF/PVA >15 days for untreated wound
SF sponge (52)	Full-thickness skin wound on dorsum	7 days for 1% SF 12 days for Nu Gauze™ (half the healing time)

To date, only one study has investigated the clinical efficacy and safety of SF biomaterials. In 2014, Clemens *et al.* conducted a multicenter retrospective review in patients who underwent abdominal wall fascial repair. SF biologic scaffold could support and repair the abdominal wall with subcutaneous placement. The results showed that SF biologic scaffolds were completely removed at 10.7 days \pm 2.9 days with low complication rates (6.5%) (26).

2.3.2 Silk sericin (SS)

SS is soluble in hot water and is mainly composed of 30% serine, 20% aspartic acid, 10-17% glycine, etc.) (19, 38, 53). In the textile industry, part of the SF fiber is used for weaving. Therefore, the SS must be eliminated from cocoon through a degumming process (22). However, it can increase the value by recycling the SS waste solution. Several studies demonstrated the SS properties, including the moisturizing property, anti-aging effect, the antioxidants, and being chemoprotective. Therefore, SS is suitable for cosmetic or dietary food applications (54-56). Moreover, the SS has wound healing promoting and physico-chemical properties, which lead to the development of many types of wound dressings. In the past several years, many research studies have provided

evidence of wound healing activities, biocompatibility and biodegradability of SS from both *in vitro*, *in vivo* and clinical studies.

In vitro study, methionine is an essential amino acid for collagen synthesis, which is essential for the acceleration of wound healing (57). It was found about 0.1 – 3.4% of SS, depending on the extraction method and strain of silk (19, 53, 58). There are four methods to extract the SS, including extracting with heat (deionized water), and urea, acid and alkaline. SS extracted from heat (deionized water) showed the highest methionine content (~3.4%) while SS extracted from other methods showed 0.1-0.2% methionine content. SS extracted from different Thai silk strains also have different methionine content (Table 6). In this study, SS were extracted from Thai silk strain (bivoltine, white shell) and were extracted by heat (deionized water).

Table 6: Methionine content of silk sericin from various Thai silk strains (mol%) (53, 58)

	<i>Bombyx mori</i>			
Amino acid	Bivoltine, white shell	Bivoltine, greenish shell	Bivoltine, yellow shell	Multivoltine
Methionine	3.39	0.57	0.18	0.11

Several studies have revealed attachment and proliferation properties of SS in various cell types (Table 7). All SS forms (solution, film, scaffold, etc.) can enhance attachment and proliferation of keratinocyte and fibroblast cells.

Table 7: Attachment and proliferation tests of SS

Composition and form	Extraction method for SS	Cell type
SS solution (59)	Alkaline	- Murine hybridoma 2E3-O cells -Human hepatoblastoma HepG2 cells -Human epithelial HeLa cells -Human embryonal kidney 293 cells
Petri dish coated with SS solution (20)	Urea	-Human skin fibroblast cells
SS/SF membrane (60)	Heat (deionized water)	-Human corneal limbal epithelial cells
SS/SF film (61)	Alkaline	-MG63 human osteoblast-like cells
SS/PEG-DE* film (62)	Heat (deionized water)	-Rat embryo epithelial cells
SS/gelatin film and scaffold (23)	Alkaline	-AH927 feline-fibroblast cells
SS/PVA** scaffold (63)	Heat (deionized water)	-L929 mouse fibroblast cells
SS/CMC*** porous matrices (64)	Alkaline	-Human keratinocyte cells (HaCaT cells)
SS/SF/gelatin sponge (29)	Heat (deionized water)	-L929 mouse fibroblast cells

*Polyethylene glycol diglycidyl ether, **Polyvinyl alcohol, *** Carboxymethyl cellulose

SS extracted from heat, alkaline and acid with concentration between 8-200 $\mu\text{g/mL}$ can stimulate collagen type I synthesis ($\sim 200\text{-}350 \mu\text{g/mL}$) from L929 fibroblast cells. However, SS extracted from urea can also stimulate collagen type I synthesis, but in lower collagen production ($\sim 100 \mu\text{g/mL}$) than other extraction methods (19). The collagen-stimulating effect of SS is concentration-dependent and at high concentrations

are toxic to cells ($> 200 \mu\text{g/mL}$) (19). However, collagen-stimulating effect of SS is also strain-dependent, because of differing methionine content. SS from the Thai silk strain (bivoltine, white shell) can stimulate collagen type I synthesis greater than other Thai silk strains (bivoltine, greenish shell and bivoltine, yellow shell), according to its high methionine content (58).

In the cytotoxicity test, the development of SS/collagen membranes (0.4% SS + 0.4% collagen) showed no toxicity to HaCat human keratinocyte cells and 3T3 fibroblast cells (24). In addition, the development of SF/SS films (2.25% SF and 0.25% SS) showed no toxicity to MG63 human osteoblast-like cells, because lactate dehydrogenase activities were equivalent to negative control (polystyrene wells) (61). The result in biodegradability showed that the 7.5:5% SS/ gelatin films degraded completely within 2 weeks in phosphate buffered saline (pH 7.4). It was also found that the films with lower content of SS degraded at a slower rate (23).

In vivo study, the result in safety evaluation (rat subcutaneous tissue) found that the intensity of the inflammatory cells, necrosis, fibrosis and neovascularization of SS/PVA films and SS/PVA scaffolds were comparable to those of paraffin gauze dressing (27, 65). For the efficacy evaluation, several studies have demonstrated that the rat wounds treated with SS heal faster than those treated with the control commercial wound dressing (Table 8).

Table 8: In vivo efficacy evaluation (time to complete healing) of SS in rats

Composition and form	Wound type	Time to complete healing
SS solution (66)	Corneal abrasion*	24 h for 10% SS 36 h for saline
SS solution (67)	Corneal abrasion**	48 h for 10% SS 72 h for saline
SS cream (68)	Full-thickness skin wound on dorsum	11 days for 8% SS 15 days for cream base
SS/PVA scaffolds (25)	Full-thickness skin wound on dorsum	14 days for 3% SS/2% PVA 21 days for 2%PVA
SS/SF/gelatin sponge (29)	Full-thickness skin wound on dorsum	14 days for 1% SS >14 days for Tegaderm

*Normal rats, **diabetic rats

Results from randomized controlled clinical study in patients showed that time for complete healing in wounds treated with SS was shorter than wounds treated with commercial wound dressing and no evidence of adverse reaction (27, 69) (Table 9).

Table 9: Clinical study of SS in patients

Composition and form	Wound type	Time to complete healing
SS/silver zinc sulfadiazine cream (69)	Burn wound	≈ 22 days for 8% SS/1% silver sulfadiazine /1% zinc oxide ≈ 29 days for 1% silver sulfadiazine/1% zinc oxide
SS/PVA/glycerin scaffold (27)	STSG donor site	12 days for 3% SS/2% PVA/1% glycerin 14 days for Bactigras®

The advantages of SF and SS in wound healing have led to the development of the wound dressing containing silk fibroin with a bioactive coating layer composed of bioactive (3% SF/gelatin and 1% SS) and a wax-coated SF woven fabrics contact layer (Figure 2). Previous studies showed that the wound dressing containing silk fibroin with a bioactive coating layer could absorb wound exudate because of its spongy and high density porous structure of bioactive layer (28). For the contact layer, SF woven fabrics were immersed in a carnauba wax solution to reduce the adherence to the wound's surface. A peel test with porcine skin demonstrated that wax-coated SF woven fabrics were less adhesive than standard commercial wound dressing mesh (Sofra-tulle[®]) (29). Moreover, the wound dressing containing silk fibroin with a bioactive coating layer showed the wound healing promoting property in terms of supporting cell attachment, proliferation, migration and collagen production. In the rat full-thickness wound model, wounds treated with the wound dressing containing silk fibroin with a bioactive coating layer had a larger extent of epithelialization, wound size reduction, and collagen formation than wounds treated with commercial wound dressing (3M[™] Tegaderm[®]) (28, 29). In this study, human clinical trials were performed in both healthy volunteers and patients. Healthy skin and STSG donor site wounds were selected for clinical safety and efficacy evaluations, respectively.

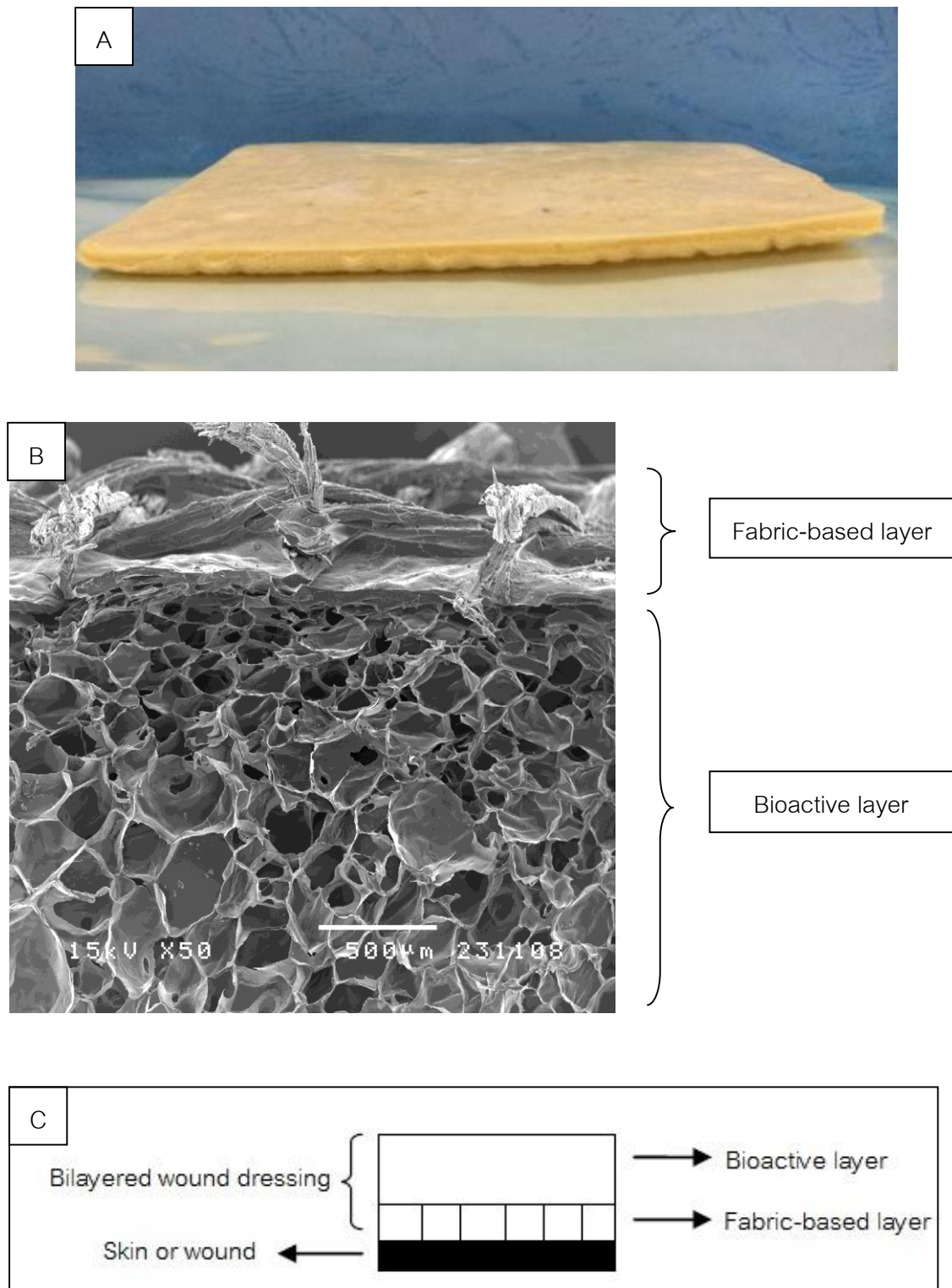


Figure 2: Wound dressing containing silk fibroin with bioactive coating layer
(A: macroscopic image, B: microscopic image, C: diagram of wound dressing)

2.4 Skin grafting

Normally, if wounds cannot be closed by suturing (primary wound closure) or treated with wound dressing changes (secondary wound closure) because they have a large surface area (>3 - 4 cm) or cannot heal by themselves such as burn and chronic wounds, skin grafting should be used to close the wounds (7, 8). Skin grafting or skin transplantation is a surgical procedure that involves harvesting healthy skin (donor site) and transplanting it to the wound area (recipient site). The transplanted skin or skin graft consists of the epidermis and variable thickness of the dermis. Therefore, skin grafts can be classified according to the amount or thickness of the dermis (full-thickness and split-thickness) (Figure 3). Full thickness skin grafts (FTSGs) consist of the epidermis and entire amount of the dermis. While, STSGs consist of the epidermis and part of the dermis and are subdivided into three types (*thin, medium and thick*) (Table 10). The thicker the skin graft, the greater graft quality but slower donor site re-epithelialization. Therefore, areas with high mechanical friction (such as joints and palm) are commonly covered with thicker dermal skin layers. However, thick STSGs consist of full hair follicles so unpleasant hair growth should be considered (1, 30, 70, 71).

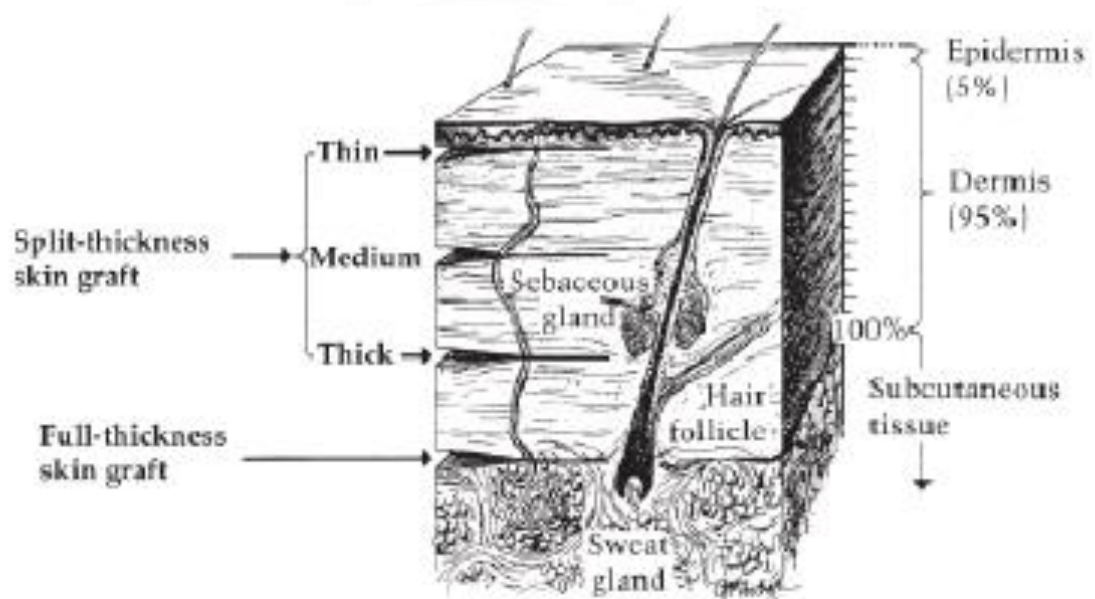


Figure 3: Classification of skin grafts (30)

Skin grafts are also classified according to the sources, *autograft* (where the donor and recipient are the same subject), *allograft* (where the donor and recipient are different subjects but same species), *isograft* (where the donor and recipient are different subjects but same species with same genetic code such as twins) and *xerograft* (where the donor and recipient are different species) (70, 71).

Table 10: Classification of STSGs according to the thickness of the dermis (70, 71)

Graft type	Thickness (mm)
<i>Thin</i>	0.15 – 0.30
<i>Medium</i>	0.30 – 0.45
<i>Thick</i>	0.45 – 0.60

The abdominal wall, anterior and lateral thigh are the most common donor areas for STSG. The posterior thigh can also be used as a donor site but it is more painful and difficult to care for. Debridement of the wound area (recipient site) is the first step of STSG. This step is to remove any dead, damaged, or infected tissue. Second, the size of the skin graft needed should be measured and traced for the area needed over the STSG donor site. Third, the surgeon adjusts the width and thickness of the electrically-powered dermatome (Figure 4). Forth, the surgeon holds the dermatome in 45° with the skin surface, then presses and moves it slowly from distal to proximal to harvest the healthy skin at the STSG donor site. Fifth, epinephrine soaked gauze is applied to the STSG donor site to stop bleeding. Sixth, the surgeon places the skin graft over the wound (recipient site) to cover and promote wound healing. Finally, wound dressing is placed on the STSG donor site and covered with gauze pads to absorb wound exudate and is wrapped with elastic bandages to create localized pressure and to protect it from mechanical trauma (Figure 5) (1, 2, 8, 30). The STSG donor site can be used as a wound model for comparative study because of its smooth surface and uniform thickness (Figure 5). In addition, it is a clean wound because the surgeon makes it in a sterilized environment (operating room).



Figure 4: Zimmer[®] electric dermatome

Traditionally, STSG donor sites have been treated with paraffin gauze dressing (Jelonet[®]) or medicated paraffin gauze dressing (Bactigras[®] and Sofra-tulle[®]). This type of wound dressing is inexpensive with easy-to-use but adheres to the wound's surface which leads to trauma and cannot absorb wound exudate (10-13). Bactigras[®] (containing chlorhexidine acetate 0.5%) has been used on the donor site at King Chulalongkorn Memorial Hospital.

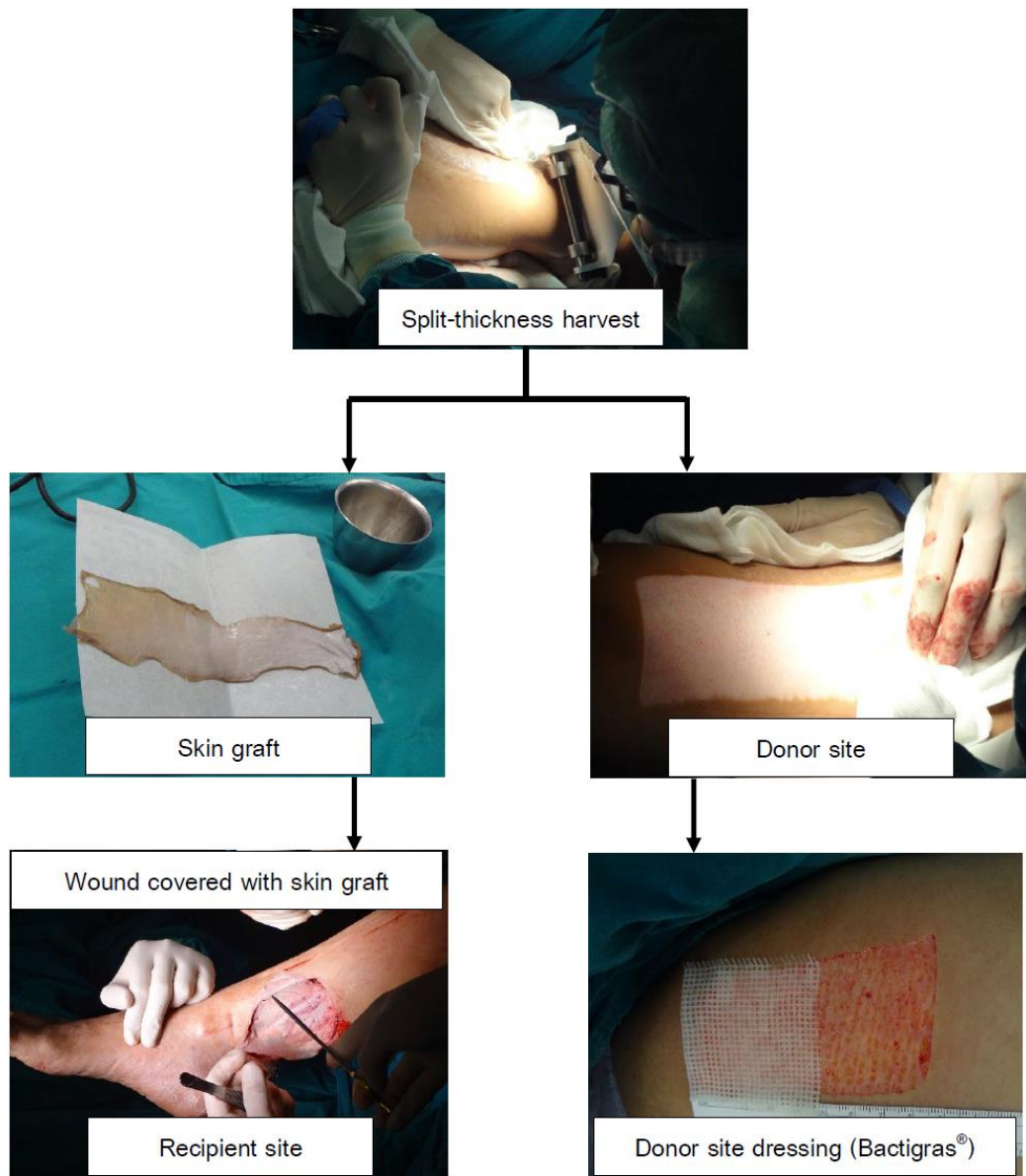


Figure 5: STSG procedure

The STSG donor site has the same characteristic as a partial thickness burn or second-degree burn in terms of dermis lost and it heals by re-epithelialization. The STSG donor site usually heals within 7 – 21 days and the healing rate depends on the depth and size. Most patients have more discomfort at the donor site than the graft site. In addition, bacterial contamination may occur during the postoperative period which increases the risk of infection. Infection at the STSG donor site can transform a partial-thickness skin loss to a full-thickness skin loss. Therefore, it is important to follow-up on the healing time, the patient's discomfort and any infection. Moreover, the STSG donor site after healing usually incurs scarring, discoloration and itching (table 11). Healed STSG donor site should be protected from UV exposure and dehydration. Therefore, sunscreen and mild moisturizer can be applied to the healed STSG donor site. (1, 8, 30, 36).

Table 11: Donor site assessments (1, 12, 13)

	Assessment methods
Healing time	Visual assessment (the dressing spontaneously peeled off from the donor site without exudate and pain)
Patient's pain level	Visual analogue scale
Infection	Signs of infection (redness, swelling, inflammation, heat, purulent exudate or malodor)
Hypertrophic scar or keloid	Vancouver scar scale
Itching	Visual analogue scale

Several studies demonstrated that when the healing time was observed, the skin barrier function did not recover completely. Therefore, not only should the healing time, patient's discomfort and possible infections be considered but also should the skin barrier function, as measured by transepidermal water loss (TEWL).

2.5 Transepidermal water loss (TEWL)

TEWL is the measure of the water vapor flux density diffusing from the skin to the external environment and it is commonly used in dermatological research as an important parameter for skin barrier function. TEWL values are affected by the skin area ranging from 2.3 g/m²/h (breast) to 44.0 g/m²/h (axilla). The TEWL is 5.1 g/m²/h for the thigh area. Increased TEWL is regarded as skin barrier dysfunction or damaged skin. In contrast, decreased TEWL is regarded as recovered skin barrier function (72).

In this study, Tewameter[®] TM 300 is a measuring device for assessment of the TEWL based on diffusion law (Figure 6). In this instrument, the water vapor flux density was measured by two pairs of sensors (temperature and moisture) inside a hollow cylinder and the TEWL value can be calculated from the moisture value at two different sites (73).



Figure 6: Tewameter[®] TM 300

TEWL measurement technique was used to evaluate treatment effect in several studies (74, 75). Dini (2008) studied the effect of Cavilon[®] film on the restoration of the skin barrier function in the treatment of pressure ulcer and venous leg ulcer. The results showed that TEWL values of wound treated with Cavilon[®] film decreased over time (202.5 g/m²/h on week 0 and 113.4 g/m²/h on week 4 for pressure ulcer and 75.3 g/m²/h on week

0 and 49.7 g/m²/h on week 4 for venous leg ulcer) (74). Na (2011) studied the effect of platelet-rich plasma on the restoration of the skin barrier function in the treatment of laser wound. The results indicated that the wounds treated with platelet-rich plasma have a more rapid TEWL recovery than the control wounds (75). In addition, Silverman (1989) and Atiyeh (2003) studied the effect of wound dressing on the healing and restoration of the skin barrier function. The results from these studies showed that when healing times were observed, the TEWL values remained elevated because of incomplete functional skin barrier recovery (76, 77). Moreover, there were difference in the duration of the functional skin barrier recovery between the STSG donor sites treated with MEBO and Tegaderm dressing (67.4 and 150 days) (77). Therefore, TEWL measurement could be used as a quantitative and non-invasive assessment of the functional skin barrier recovery and used to investigate the clinical efficacy of the wound dressing containing silk fibroin with a bioactive coating layer in this study.

2.6 Erythema and melanin

Erythema is redness of the skin caused by skin inflammation. Melanin is skin darkening that can occur after the onset of skin redness by skin inflammation. In this study, Mexameter[®] MX18 is a measuring device for assessment of the erythema and melanin levels (Figure 7). It is commonly used in dermatological research. In this instrument, a receiver measures absorbed and reflected light at wavelengths for hemoglobin (568 and 660 nm) and melanin (660 and 870 nm). The measuring surface area is 5 mm in diameter and higher levels of erythema and melanin mean higher amounts of hemoglobin and melanin pigments (78, 79).



Figure 7: Mexameter[®] MX18

A previous study using a delayed type hypersensitivity in a murine model found that the auricular swelling rate was significantly positively correlated with the erythema level (measured by Mexameter[®] MX18) ($r = 0.841$, $p < 0.001$) (80). Takada *et al.* (81) studied the objective measurement of erythema caused by metal reagent in the skin patch test and found that the sensitivity and specificity of the interpretation method with the Mexameter[®] MX18 for International Contact Dermatitis Research Group (ICDRG) standard series (differentiated between doubtful or irritant reactions and weak or strong positive reactions) were 73.3% and 91.2%, respectively. Therefore, the measurement of erythema can be used to quantify the skin irritation. In addition, melanin levels were also obtained from this non-invasive instrument. Hyperpigmentation (overproduction of melanin) is a common response which occurs after cutaneous inflammation, particularly in contact dermatitis (82). Van der Wal *et al.* (83) reported that the melanin level (measured by Mexameter[®] MX18) strongly correlated with the hyperpigmentation score on the Patient and Observer Scar Assessment Scale (POSAS) ($r = 0.75$, 95% confidence interval, 0.51-0.88). Therefore, measurement of melanin can be used to quantify skin darkness.

CHAPTER III

RESEARCH METHODOLOGY

3.1 Fabrication of the wound dressing containing silk fibroin with a bioactive coating layer

1. SF woven fabrics were immersed in the 0.1% carnauba wax solution and then dried overnight to obtain wax-coated SF woven fabric based layer.

2. Preparation of the SS and SF solutions before mixing, including autoclaving the cocoons at 121°C for 1 hour to obtain the SS solution and degumming (by boiling it in 0.02 M Na₂CO₃), dissolving (in 9.3 M LiBr at 60°C for 4 hours) and dialysis for 3 days to obtain SF solution. In addition, gelatin was swollen in deionized water for 15 minutes and then warmed at 40°C for 1 hour until it is completely dissolved.

3. SS solution was mixed with gelatin and SF solutions at 4% w/v total protein weight. 1% for SS solution and 3% for SF and gelatin solutions. With the 3% of SF and gelatin, the mixing ratio is 20:80

4. After mixing for 1 hour, the mixture was crosslinked with 0.02% glutaraldehyde for 10 minutes and then poured it into teflon mold, and then attached to wax-coated SF woven fabric based layer.

5. Kept it in 4°C for 24 hours and then stopped the reaction by 0.1M glycine solution for 1 hour and then eliminated the residual glutaraldehyde by gentle stirring in deionized water for 6 hours with water changes 3 times. After that, the gel was frozen before lyophilization.

6. Lastly, scaffold was immersed in 20% v/v glycerine solution and allowed to dry for 10 hours before sterilization by gamma irradiation.

3.2 Phase I: Clinical safety of the wound dressing containing silk fibroin with a bioactive coating layer in healthy volunteers

The study protocol was approved by the ethics committee of the Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand (Protocol review number 12-33-013 on 18 July 2012, Appendix A).

Study design

The study design was a prospective, randomized, controlled, match pair clinical trial.

Study samples

Healthy Thai citizens volunteered at the Department of Pharmacy Practice, Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University between November 2012 and February 2013. A total of one hundred and twelve subjects were recruited for the study. The following were the criteria for the inclusion and exclusion of volunteers to the phase I study.

Inclusion criteria

1. Volunteers aged 18 to 65 years.
2. Normal physical and neurological examinations.
3. Volunteers who have provided written informed consent.

Exclusion criteria

1. Administration of any of the following drugs within the last 2 weeks:
 - Immunosuppressants
 - Oral and topical antihistamines
 - Oral and topical steroids

2. Diagnosis with any of the following diseases:
 - Skin diseases such as psoriasis, infectious skin diseases
 - Immunodeficiency diseases
3. History of allergic or hypersensitivity reactions to SS or SF or paraffin or chlorhexidine acetate.

Sample size

McNamee (2008) recommended that the human patch test should be conducted on 100 healthy volunteers. With the sample size of 100, the probability of detecting skin adverse effects is 0.99 or 99 percent in the target population (84).

Assuming a 10% loss to follow up (drop-out rate = 10%);

$$N = 100 / (1-0.1) = 111.11 \approx 112 \text{ subjects}$$

Randomization

Each back area of eligible healthy volunteers was divided into the left and right sides. Back areas were randomized to receive pattern A (left side applied with the wound dressing containing silk fibroin with bioactive coating layer and right side applied with the medicated paraffin gauze dressing) or B (left side applied with the medicated paraffin gauze dressing and right side applied with the wound dressing containing silk fibroin with bioactive coating layer) by simple randomization.

The back areas applied with the wound dressing containing silk fibroin with bioactive coating layer were the experimental group and the back areas applied with the medicated paraffin gauze dressing were the control group.

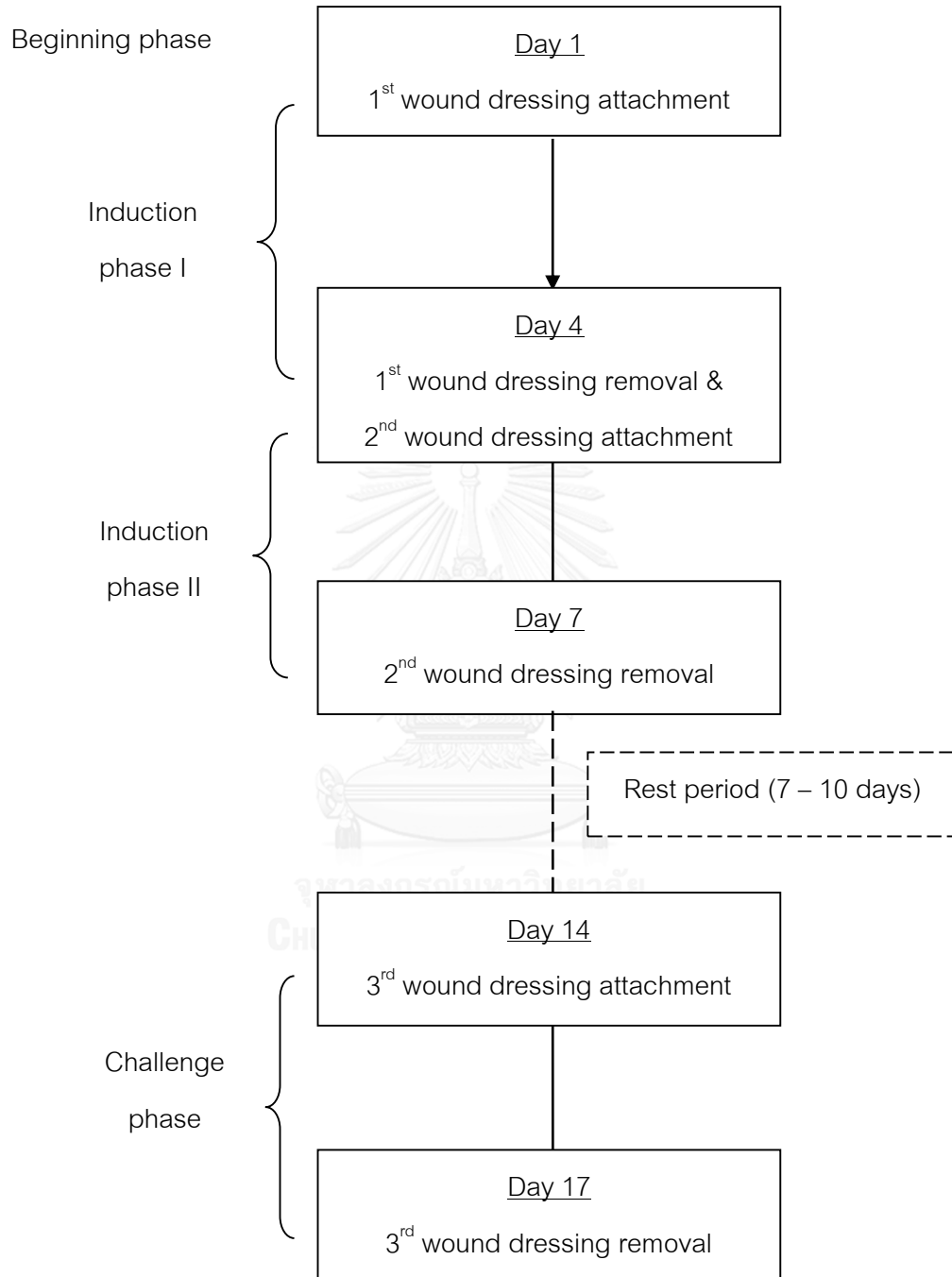
Intervention

The back areas were applied with the wound dressing containing silk fibroin with a bioactive coating layer and the medicated paraffin gauze dressing (Bactigras[®] from Smith & Nephew).

Data collection methods

1. Healthy volunteers were assessed for eligibility according to the criteria
2. Volunteers were informed that this information was being used in a research study and were told the objectives, methods, benefits and risks (Appendix B). The volunteers were asked to participate in the study.
3. After giving their informed consent (Appendix C), baseline characteristics were recorded such as gender, age and weight (Appendix D).
4. On the first visit, the back areas were divided into two sides and then baseline of erythema and melanin levels of the back skin were observed. Then, each side was randomized to receive the wound dressing containing silk fibroin with bioactive coating layer or the medicated paraffin gauze dressing, in the size of a 2×2 cm² area and then covered with a self-adhesive non-woven fabric (Neofix[®]). Both dressings were left for 3 days. After that, both dressings were changed and left for an additional 3 days. This period was called the induction phase I and II. Seven to ten days (rest period) after the last induction application, both dressings were applied on the identical areas and left in place for 3 days. This period was called the challenge phase (Figure 8).
5. At each phase, the levels of erythema (skin redness) and melanin (skin darkness) were measured by a Mexameter[®] MX18 (Courage + Khazaka electronic GmbH, Germany). Photos of the back skin were taken within 30 min after the dressings were removed and evaluated for any visual skin irritation or sensitization to collect frequency data using the Repeated Insult Patch Test (RIPT) scale (Appendix E) by 2 clinical dermatologists (85). At each phase, the measurement of erythema and melanin levels was repeated consecutively for twenty times by Mexameter[®] MX18 probe.

Figure 8: Schedule of phase I study in healthy volunteers



3.3 Phase II: Clinical efficacy and safety of the wound dressing containing silk fibroin with bioactive coating layer in the treatment of split-thickness skin graft donor sites

The study protocol was approved by the institutional review board of the Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand (Approval number 184/56 on 30 July 2013, Appendix F, Clinical Trial Registration Number NCT02091076 title Efficacy and safety of silk fibroin with bioactive coating layer dressing).

Study design

The study design was a prospective, randomized, controlled, match pair clinical trial

Study samples

Donor sites were of STSG in adult patients undergoing wound reconstructive surgery at the Division of Plastic and Reconstructive Surgery, Department of Surgery, King Chulalongkorn Memorial Hospital between October 2013 and January 2015. A total of thirty donor sites were recruited for the study. The following were the criteria for the inclusion and exclusion of patients to the phase II study.

Inclusion criteria

1. Patients aged 18 to 65 years.
2. Patients requiring STSG due to burn, scar contracture, or others.
3. The donor sites of STSG were located on the thigh.
4. Patients provided written informed consent.

Exclusion criteria

1. Donor sites were anywhere other than the thigh area.
2. History of allergic or hypersensitivity reactions to SS or SF or paraffin or chlorhexidine acetate.
3. There was a risk of transferring an infection from a nearby infected area to donor site such as acute burn patients.
4. Immunocompromised patients such as those with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) and renal failure.
5. Patients with diabetes mellitus.
6. Patients with low serum albumin level (less than 3.0 g/dL) (86).
7. Patients with psychiatric disorders or physical disabilities that hinders collaboration.
8. Patients who were not comply with the study protocol.

Sample size

Formula for the calculation of sample size for studies using two related samples experiments is (87)

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

N = sample size

Z_{α} = Z value for alpha error

Z_{β} = Z value for beta error

S^2 = variance expected

D^2 = mean difference to be detected

Siritientong (2013) (27) reported that the day of re-epithelization for wounds treated with silk sericin-releasing bioactive wound dressing was significantly less than the day of re-epithelization for wounds treated with Bactigras[®] (12.0 ± 5.0 & 14.0 ± 5.2 days for silk sericin-releasing bioactive wound dressing and Bactigras[®] groups, respectively, $p < 0.001$).

$$\alpha = 0.05, \quad Z_{\alpha} = 1.96$$

$$\beta = 0.1, \quad Z_{\beta} = 1.28$$

The correlation between the wounds treated with silk sericin-releasing bioactive wound dressing and the wounds treated with Bactigras[®] in healing time ($r = 0.878$)

$$\begin{aligned} S^2 &= S_1^2 + S_2^2 - (2 \times r \times S_1 \times S_2) \\ &= 5.0^2 + 5.2^2 - (2 \times 0.878 \times 5.0 \times 5.2) = 52.04 - 45.656 = 6.384 \end{aligned}$$

D = the difference between the wounds treated with the wound dressing containing silk fibroin with bioactive coating layer and the wounds treated with the medicated paraffin gauze dressing in healing time (days) is specified as 2.

$$\begin{aligned} \text{Evaluation of sample size; } N &= \frac{(Z_{\alpha} + Z_{\beta})^2 S^2}{D^2} \\ &= \frac{(1.96 + 1.28)^2 \times 6.384}{2^2} = 16.75 \approx 17 \text{ wounds} \end{aligned}$$

Assuming a 40% loss to follow up (drop-out rate = 40 %);

$$N = \frac{17}{1 - 0.4} = 28.33 \approx 30 \text{ wounds}$$

Randomization

Each donor site wound was divided into the cephalad half and the caudal half of equal size. Donor sites were randomized to receive pattern A (cephalad part treated with the wound dressing containing silk fibroin with bioactive coating layer and caudal part treated with the medicated paraffin gauze dressing) or B (cephalad part treated with the medicated paraffin gauze dressing and caudal part treated with the wound dressing containing silk fibroin with bioactive coating layer) by simple randomization.

The wounds treated with the wound dressing containing silk fibroin with bioactive coating layer were the experimental group and the wounds treated with the medicated paraffin gauze dressing were the control group.

Intervention

The donor site wounds were dressed with the wound dressing containing silk fibroin with bioactive coating layer and the medicated paraffin gauze dressing (Bactigras[®] from Smith & Nephew).

Data collection methods

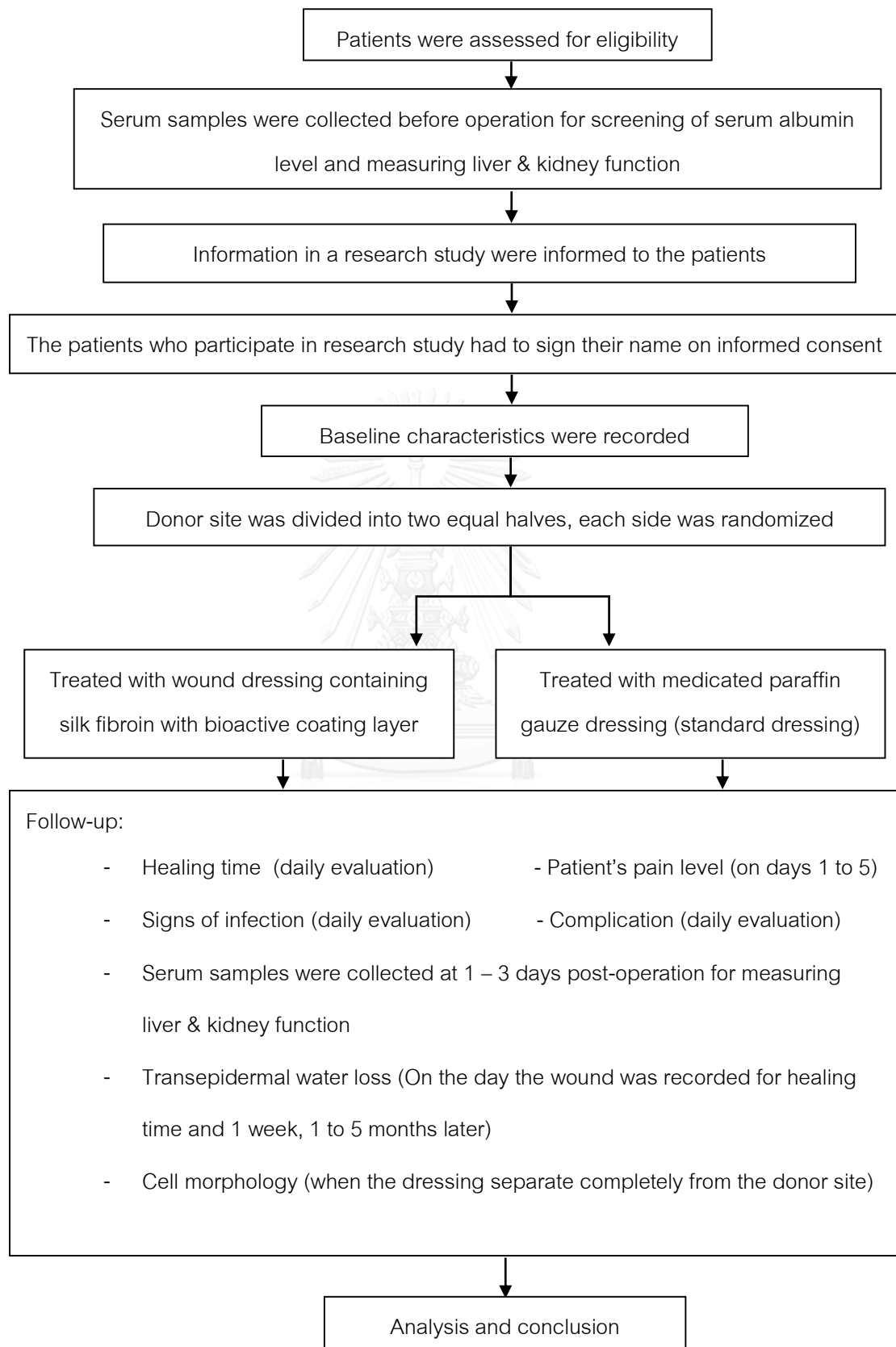
1. Patients were assessed for eligibility according to the criteria.
2. Serum samples were collected from patients before operation for screening of serum albumin level and measuring liver function (aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP) and renal function (blood urea nitrogen (BUN), serum creatinine (Scr)).
3. Information about the research study was given to the patients including the objectives, methods, benefits and risks (Appendix G), and patients were asked to participate in the study.
4. After giving their informed consent (Appendix H), the baseline characteristics were recorded such as gender, age, medical history and current medication being taken (Appendix I).
5. The STSG donor site was taken from the thigh by using Zimmer[®] dermatome, and then epinephrine soaked gauze was applied to the donor site. Photos of the STSG donor site were taken to measure the donor area using ImageJ software developed by the National Institutes of Health.
6. The donor site was divided into two equal halves, each side was randomized to receive the wound dressing containing silk fibroin with bioactive coating layer or the medicated paraffin gauze dressing, and then covered with gauze pads and elastic bandages.

7. The donor site wounds were observed daily (Appendix J). The dressings were not changed, except when they were fully soaked with exudates and easily fell off or there was any sign of infection. The healing time was recorded when the dressing separated completely from the donor site, without any exudates and without pain when the donor site was exposed to air (12, 13).
8. The patient's pain level was evaluated with the visual analogue scale from 0 (no pain) to 10 (unbearable pain) points (88) and was recorded on postoperative days 1 to 5. The STSG donor site wounds were covered with gauze pads and rolls during pain assessment.
9. The donor site wounds were observed daily for signs of infection such as redness, swelling, inflammation, heat, purulent exudate or malodor (89, 90).
10. On the day the wound was determined as being completely healed and 1 week, 1 to 5 months later, the skin barrier function (TEWL) of each side was measured using a Tewameter TM 300 (Courage+ Khazaka electronic GmbH, Germany). Control measurements were made at adjacent (uninjured) skin. At each appointment, the measurement of TEWL was repeated consecutively for forty times by a Tewameter[®] TM300 probe in each group (the healed STSG donor site wounds were divided into four equal parts, with each part measured repeatedly 10 times and four positions of adjacent normal skin also measured repeatedly 10 times.) The TEWL index was calculated by dividing the TEWL of post-donor site healing day A by the TEWL of adjacent normal skin day A. TEWL measurement is a non-invasive technique to monitor changes of the skin barrier function that provides an objective data for assessment of wound healing.
11. Considered as any complication in any patient.
12. Additional serum samples were collected from patients at 1 – 3 days post-operation for measuring liver function (aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP), albumin) and renal function (blood urea nitrogen (BUN), and creatinine (Scr)).

13. The morphology of epithelial cells attached on the wound dressing after peeling off was analyzed by polarized light microscope (Olympus BX53, Japan).



Figure 9: Flowchart of phase II clinical study



3.4 Data analysis and statistical

Data analysis was carried out using SPSS version 22.0 (SPSS Co., Ltd., Bangkok Thailand). Statistical significance level was selected as $p < 0.05$.

In Phase I and II, all qualitative data represent the frequency and percentage. All quantitative data represent the mean \pm standard deviation and median \pm interquartile range.

In Phase I, comparison of the mean erythema and melanin levels from Mexameter[®] between the dressing groups used repeated measures analysis of variance.

In Phase II, the differences in healing time, patient's pain level, TEWL and laboratory data between the dressing groups used Wilcoxon signed-ranks test. The differences in body temperature used Friedman analysis of variance.

3.5 Ethical consideration

This research focused on the treatment of STSG donor sites according to the standard treatment of the Division of Plastic and Reconstructive Surgery, Department of Surgery, King Chulalongkorn Memorial Hospital. The researcher had to inform participants about the objective of the research, expected duration, methods, benefits, and potential risks and adverse effects. Participants had a right to deny participation and to withdraw at any time. The researcher will have to secure participants' data to keep it confidential and to present in conclusion.

CHAPTER IV

RESULTS

4.1 Phase I: Clinical safety of the wound dressing containing silk fibroin with bioactive coating layer in healthy volunteers

A total of 112 subjects were recruited for the study. Of these, 110 were available for follow-up evaluation (1.8% loss to follow-up). Reasons for loss to follow-up included one irritation from adhesive tape and one withdrawal of consent because of time limitations.

The baseline characteristics of healthy volunteers for the patch test are summarized in Table 12. There were more females (71.8%) than males (28.2%), age range 20-61 years with an average age of 39.9 years. The average weight and height were 60.1 kg and 160.5 cm, respectively. There were 8 (7.3%), 71 (64.5%), 24 (21.8%) and 7 (6.4%) subjects in the < 18.5 (underweight), 18.5-24.9 (normal weight), 25.0-29.9 (overweight) and ≥ 30.0 (obese) body mass index (BMI) groups, respectively. Most healthy volunteers had no underlying disease (88.2%). Appendix K presents the skin of healthy volunteers at the back area during the skin patch test.

Table 12: Baseline characteristics of healthy volunteers for patch test.

	Number (%) or Mean \pm SD (Range)
Sex	
Male	31 (28.2)
Female	79 (71.8)
Age (years)	39.9 \pm 12.8 (20-61)
Weight (kg)	60.1 \pm 12.4 (41-96)
Height (cm)	160.5 \pm 8.1 (140-182)
Body mass index (kg/m ²)	23.3 \pm 4.2 (16.5-37.1)
< 18.5	8 (7.3)
18.5-24.9	71 (64.5)
25.0-29.9	24 (21.8)
\geq 30.0	7 (6.4)
Underlying disease	
None	97 (88.2)
Both hypertension and hyperlipidemia	6 (5.5)
Hypertension	5 (4.5)
Hyperlipidemia	2 (1.8)
Occupation	
Government officer	56 (50.9)
Employee	39 (35.5)
Housekeeper	12 (10.9)
Student	3 (2.7)

The results were divided into two parts. The first part comprised the erythema and melanin levels measured by Mexameter[®] MX18 at four phases (beginning phase, induction phase I, induction phase II and challenge phase) (see Table 13 and Figure 10).

The results from both wound dressings indicated that the erythema and melanin levels at the beginning phase (238.63 ± 83.52 units for erythema and 230.68 ± 99.74 units for melanin) were significantly higher than other phases (225.26 ± 79.78 units for erythema and 220.46 ± 97.55 units for melanin). In addition, there were no significant differences in erythema and melanin levels among the following three phases (induction phase I, II and challenge phases).



Table 13: Erythema and melanin levels of the skin of healthy volunteers before and during the patch test [mean \pm SD (Range)]

Erythema level				
Phase Type	Before patch test	During patch test		
	Beginning phase	Induction phase I	Induction phase II	Challenge phase
Bactigras [®]	233.57 \pm 81.96 (56.00-485.80)	218.93 \pm 78.44 ^a (48.65-455.00) $p = 0.538^x$	217.31 \pm 78.49 ^a (50.20-465.45) $p = 0.333^y$	219.45 \pm 75.60 ^a (68.40-461.85) $p = 0.827^z$
Bilayered wound dressing	243.70 \pm 85.09 (61.20-504.70)	233.17 \pm 83.47 ^b (48.25-482.00) $p = 0.410^x$	230.86 \pm 82.75 ^c (43.40-479.75) $p = 0.637^y$	231.82 \pm 79.91 ^d (69.30-493.20) $p = 0.598^z$
Total	238.63 \pm 83.52 (56.00-504.70)		225.26 \pm 79.78 (43.40-493.20)	
Melanin level				
Phase Type	Before patch test	During patch test		
	Beginning phase	Induction phase I	Induction phase II	Challenge phase
Bactigras [®]	226.47 \pm 97.65 (67.00-685.80)	216.22 \pm 95.03 ^a (66.90-674.90) $p = 0.416^x$	216.30 \pm 95.13 ^a (66.25-675.15) $p = 0.665^y$	216.28 \pm 95.09 ^a (66.95-675.60) $p = 0.588^z$
Bilayered wound dressing	234.89 \pm 101.84 (82.95-711.65)	224.64 \pm 100.17 ^a (73.40-694.30) $p = 0.809^x$	224.69 \pm 99.93 ^a (73.55-694.45) $p = 0.613^y$	224.64 \pm 99.97 ^a (73.55-694.20) $p = 0.988^z$
Total	230.68 \pm 99.74 (67.00-711.65)		220.46 \pm 97.55 (66.25-73.55)	

^aSignificant difference ($p = 1 \times 10^{-7}$ vs beginning phase), calculated by repeated measures ANOVA

^bSignificant difference ($p = 1 \times 10^{-4}$ vs beginning phase), calculated by repeated measures ANOVA

^cSignificant difference ($p = 1 \times 10^{-5}$ vs beginning phase), calculated by repeated measures ANOVA

^dSignificant difference ($p = 1 \times 10^{-6}$ vs beginning phase), calculated by repeated measures ANOVA

^xNo significant difference (induction phase I vs phase II), calculated by repeated measures ANOVA

^yNo significant difference (induction phase II vs challenge phase), calculated by repeated measures ANOVA

^zNo significant difference (induction phase I vs challenge phase), calculated by repeated measures ANOVA

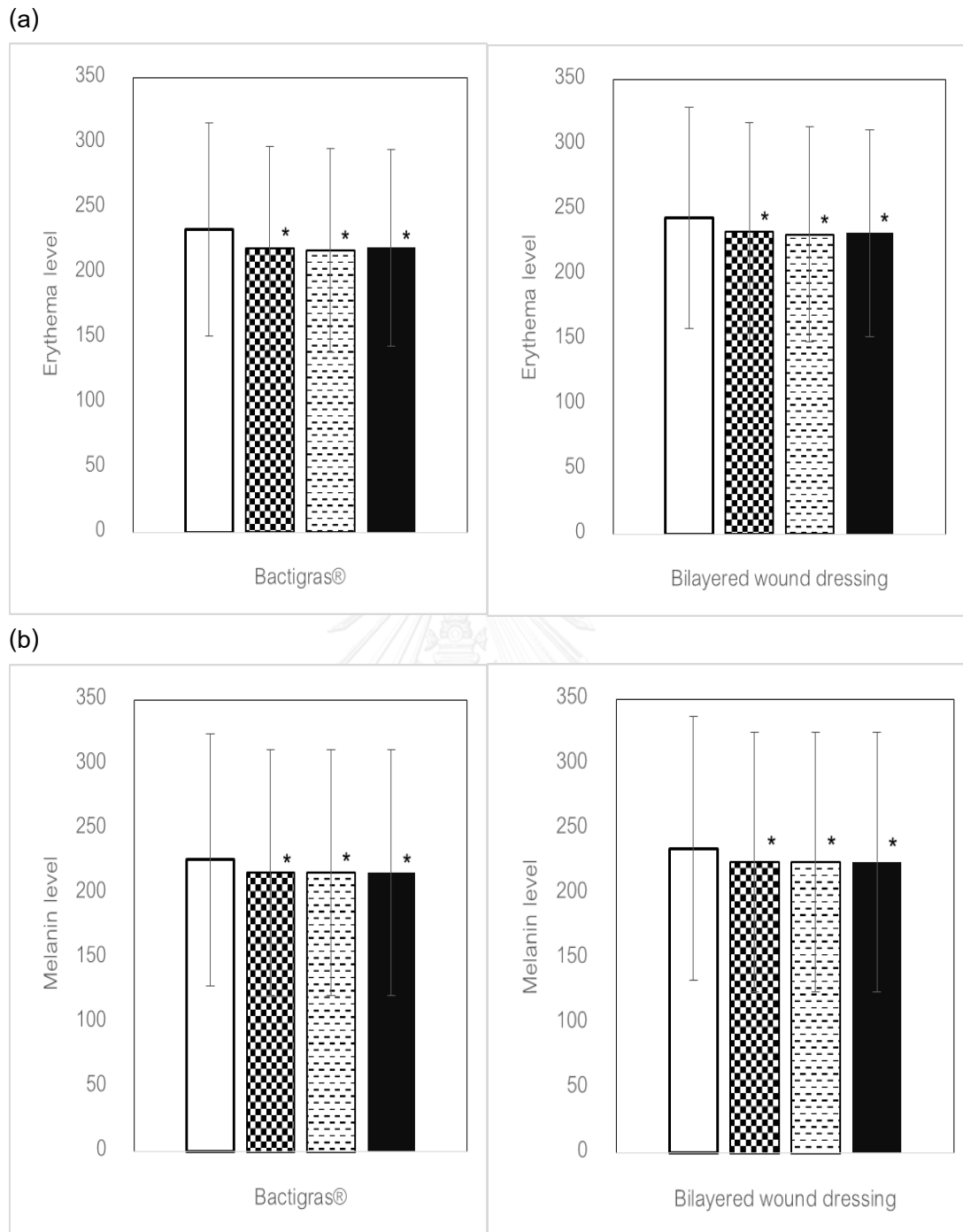


Figure 10: (a) Erythema and (b) melanin levels of the skin of healthy volunteers at the beginning phase (□), induction phase I (▣), induction phase II (▤) and challenge phase (■). *Significant difference ($p \leq 1 \times 10^{-4}$) vs beginning phase), calculated by repeated measures ANOVA.

The second part comprised the percentage of severity of cutaneous reactions evaluated by two clinical dermatologists using images taken with a digital camera. (Table 14). A RIPT scale was used to score skin irritation or sensitization at each phase. The RIPT scale is a grading (severity) scale that consists of 6 grades (0, 0.5, 1, 2, 3, 4) (85).

There was a significant difference in the severity of cutaneous reactions between wound dressing groups ($p = 0.004$). However, there was no evidence of marked or severe responses in both wound dressing groups. In addition, there was evidence of mild and moderate erythema in the wound dressing containing silk fibroin with bioactive coating layer (1.82 and 1.82%, respectively). In addition, there was evidence of barely perceptible responses for both wound dressings (1.36% for Bactigras[®] and 0.45% for wound dressing containing silk fibroin with bioactive coating layer).

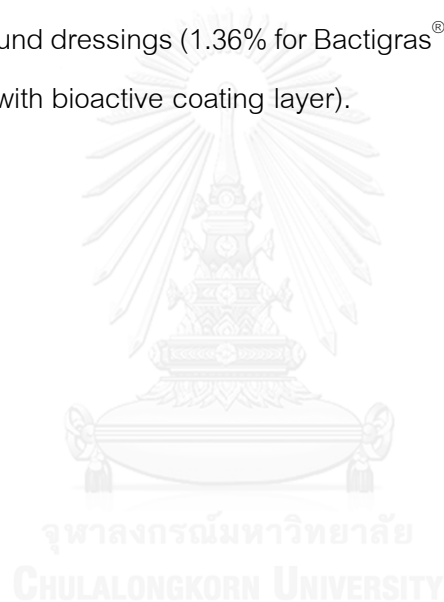


Table 14: Percentage of severity of cutaneous reactions of the skin of healthy volunteers during the patch test [number^a (%)]

Grade ^b	Induction phase I		Induction phase II		Challenge phase		Total	
	Bactigras [®]	Bilayered wound dressing	Bactigras [®]	Bilayered wound dressing	Bactigras [®]	Bilayered wound dressing	Bactigras [®]	Bilayered wound dressing
0	219 (99.55)	220 (100.00)	218 (99.09)	216 (98.18)	220 (100.00)	215 (97.73)	217 (98.64)	211 (95.91)
0.5	1 (0.45)	0 (0.00)	2 (0.91)	0 (0.00)	0 (0.00)	1 (0.45)	3 (1.36)	1 (0.45)
1	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	4 (1.82)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	4 (1.82)
2	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	4 (1.82)	0 (0.00)	4 (1.82)
3	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)
4	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)
p-value ^c	NC ^d		< 0.001		NC ^d		0.004	

^a Maximum frequency of each phase was equal to 220

^b 0 = No evidence of any effect

0.5 = (Barely perceptible) minimal faint (light pink) uniform or spotty erythema

1 = (Mild) pink uniform erythema covering most of contact site

2 = (Moderate) pink/red erythema visibly uniform in entire contact area

3 = (Marked) bright red erythema with accompanying edema, petechiae or papules

4 = (Severe) deep red erythema with vesiculation or weeping with or without edema

^c Chi-square test for any significant difference of the frequency between wound dressing groups

^d NC = No statistics computed due to constant value

4.2 Phase II: Clinical efficacy and safety of the wound dressing containing silk fibroin with bioactive coating layer in the treatment of split-thickness skin graft donor sites

A total of 30 donor sites from 23 patients who underwent a STSG procedure were recruited in this study. The baseline characteristics of patients who underwent a STSG procedure and STSG donor sites are summarized in Tables 15 and 16, respectively. There were more females (56.5%) than males (43.5%), age range 18-64 years with an average age of 39 years. The average weight and height were 59.2 kg and 162.1 cm, respectively. There were 4 (17.4%), 12 (52.2%), 5 (21.7%) and 2 (8.7%) patients in the < 18.5 (underweight), 18.5-24.9 (normal weight), 25.0-29.9 (overweight) and ≥ 30.0 (obese) BMI groups, respectively. Six (23.3%) patients had a history of drug allergy (two to penicillin, one to vancomycin, one to ciprofloxacin, one to clavulanic acid and one to hydrochlorothiazide). The most common reasons for STSG in this study were tumor excision (34.8%), followed by burn (30.4%), chronic wound (8.7%), scar contracture (8.7%), traumatic wound (8.7%), granulation wound and foreign body granuloma (each 4.3%). The size and thickness of STSG donor sites were $107.7 \pm 43.2 \text{ cm}^2$ and 0.0095 ± 0.0014 inches, respectively. The most frequent donor area for STSG in this study was the lateral thigh (66.7%), followed by anterior thigh (30.0%) and posterior thigh (3.3%), respectively. Following harvesting of STSG, the donor site was divided into two equal halves (cephalic half and caudal half) and then randomly allocated to pattern A (cephalad part treated with the wound dressing containing silk fibroin with bioactive coating layer and caudal part treated with Bactigras[®]) or B (cephalad part treated with Bactigras[®] and caudal part treated with the wound dressing containing silk fibroin with bioactive coating layer) by simple randomization. There were 14 (46.7%) STSG donor sites with pattern A and 16 (53.3%) STSG donor sites with pattern B.

Table 15: Baseline characteristics of patients who underwent a STSG procedure

	Number (%) or Mean \pm SD (Range)
Sex	
Male	10 (43.5)
Female	13 (56.5)
Age (years)	39.0 \pm 15.2 (18-64)
\leq 50	17 (73.9)
$>$ 50	6 (26.1)
Weight (kg)	59.2 \pm 13.6 (42-91)
Height (cm)	162.1 \pm 0.1 (149-179)
Body mass index (kg/m ²)	22.5 \pm 4.9 (15.6-32.8)
$<$ 18.5	4 (17.4)
18.5 – 24.9	12 (52.2)
25.0 – 29.9	5 (21.7)
\geq 30.0	2 (8.7)
Smoking	
Yes	7 (30.4)
No	16 (69.6)
Regular alcohol consumption	
Yes	6 (26.1)
No	17 (73.9)
Drug allergy	
Known allergy	6 (26.1)
No allergy	17 (73.9)
Comorbidity	
None	17 (73.9)
Cardiovascular disease	3 (13.0)
Dyslipidemia	2 (8.7)
Hypertension	1 (4.3)

	Number (%) or Mean \pm SD (Range)
Diagnosis	
Tumor excision	8 (34.8)
Burn	7 (30.4)
Chronic wound	2 (8.7)
Scar contracture	2 (8.7)
Traumatic wound	2 (8.7)
Others	2 (8.7)

Table 16: Baseline characteristics of STSG donor sites

	Number (%) or Mean \pm SD (Range)
Area of donor site	
Right thigh	17 (56.7)
-Lateral thigh	10 (33.3)
-Anterior thigh	6 (20.0)
-Posterior thigh	1 (3.3)
Left thigh	13 (43.3)
-Lateral thigh	10 (33.3)
-Anterior thigh	3 (10.0)
Size of donor site (cm ²)	107.7 \pm 43.2 (23.7-211.4)
Thickness of donor site (μ m)	242.1 \pm 34.5 (203.2-304.8)

The results were divided into six parts: healing time, patient's pain level, skin barrier function (TEWL), infection, systemic adverse reactions and morphology of epithelial cells attached on the wound dressing after falling off spontaneously.

4.2.1 Healing time

The healing time was recorded when the dressing separated completely or fell off from the donor site, without any exudates and without pain when the donor site was exposed to air (12, 13). The healing time of STSG donor site wounds treated with the wound dressing containing silk fibroin with bioactive coating layer (11.0 ± 6.0 days) was significantly faster than those treated with Bactigras[®] (14.0 ± 6.0 days) (Table 17).

Figures 11a and 11b show the STSG donor site on the anterior thigh, following treatment with Bactigras[®] (right side) and the wound dressing containing silk fibroin with bioactive coating layer (left side). Figure 11c shows the healed STSG donor site and that the side treated with the wound dressing containing silk fibroin with bioactive coating layer can regenerate epithelial cells faster than the side treated with Bactigras[®]. Appendix L (part 1) shows the STSG donor site on the operative day and after having healed.

Table 17: The median healing time of STSG donor sites in each dressing

	The healing time of STSG donor sites (days)
	Median \pm IQR (Range)
All STSG donor sites	
Bactigras [®] (n = 30)	14.0 \pm 6.0 (9-19)
Bilayered wound dressing (n = 30)	11.0 \pm 6.0 (7-18)*

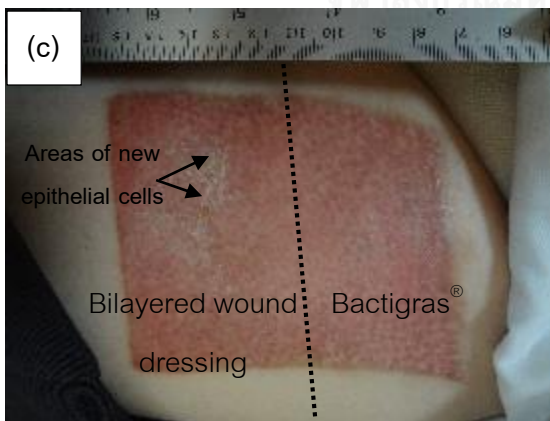
*Significant difference ($p = 1 \times 10^{-6}$ vs Bactigras[®]), calculated by Wilcoxon Signed Rank Test



(a) STSG donor site after the skin was taken



(b) STSG donor site treated with Bactigras® and bilayered wound dressing



(c) Healed STSG donor site (post-donor site healing day 3 for the side treated with bilayered wound dressing and post-donor site healing day 0 for the side treated with Bactigras®).

Figure 11: Healed STSG donor site on the anterior thigh

4.2.2 Patient's pain level

Patients were asked to rate their pain level on a visual analog scale, ranging from 0 (no pain) to 10 (unbearable pain).

On the first five post-operative day, the median pain score of STSG donor site exhibited an exponential decrease in both wound dressing groups. The pain score tended to decrease sharply during the first post-operative day in the STSG donor site wounds treated with Bactigras[®] (at the first post-operative day, the median pain score was 8.00 ± 3.25 , which then decreased to 5.00 ± 3.00 at the second post-operative day), while the pain score tended to decrease sharply during the first and second post-operative days in the STSG donor site wounds treated with the wound dressing containing silk fibroin with bioactive coating layer (at the first post-operative day, the median pain score was 7.00 ± 4.25 , which then decreased to 4.00 ± 2.00 at the second post-operative day, and then decreased to 2.00 ± 1.25 at the third post-operative day). In addition, the pain scores of the STSG donor site were significantly lower in the STSG donor site wounds treated with the wound dressing containing silk fibroin with bioactive coating layer on all evaluation days (Figure 12).

However, on the first post-operative day, ten patients were unable to differentiate pain between the side treated with Bactigras[®] and the side treated with the wound dressing containing silk fibroin with bioactive coating layer as they experienced great pain. As a result, the pain scores of STSG donor site wounds treated with Bactigras[®] were equal to those treated with the wound dressing containing silk fibroin with bioactive coating layer.

After surgery, the most commonly prescribed analgesic drug was acetaminophen (1 g every 4-6 hours, as needed). Concurrent use of other prescription analgesic drugs could occur, depending on the pain intensity of donor or recipient sites. However, the pain assessment was performed at the same time before or two hours after taking an analgesic drug.

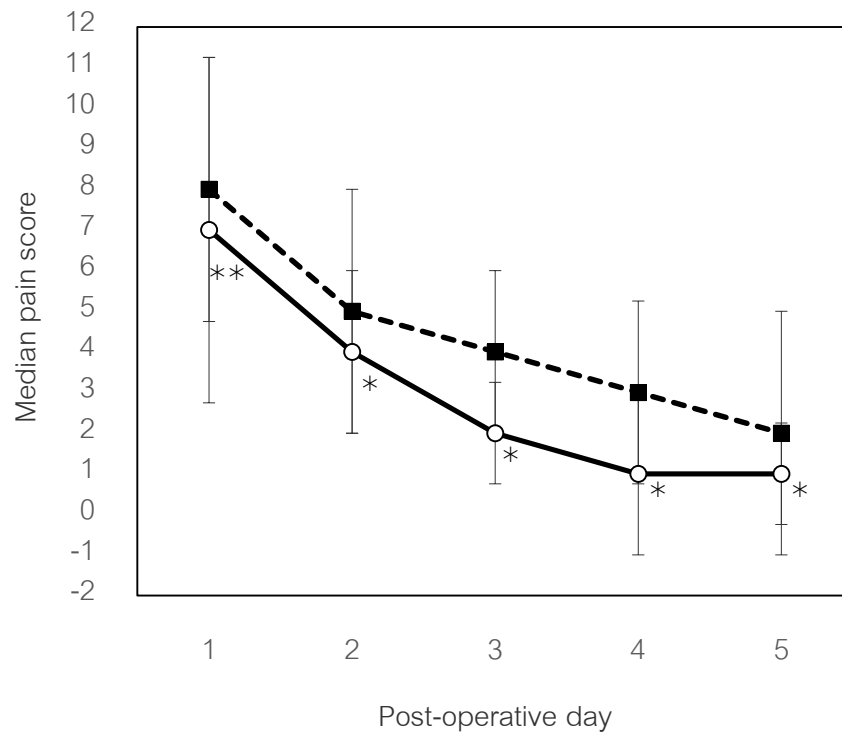


Figure 12: Median pain score of donor site wound treated with Bactigras[®] and wound dressing containing silk fibroin with bioactive coating layer. (---■---) Bactigras[®], (—○—) wound dressing containing silk fibroin with bioactive coating layer. Bar lines represent interquartile range. *Significant difference ($p = 1 \times 10^{-5}$ vs Bactigras[®]); **Significant difference ($p = 1 \times 10^{-4}$ vs Bactigras[®]), calculated by Wilcoxon Signed Rank Test.

4.2.3 Skin barrier function (TEWL)

During follow-up for 5 months, only one patient (3.33%) was lost to follow-up in the last appointment (day 150) due to time limitations. The median TEWL of adjacent normal skin and STSG donor sites in each dressing are shown in Table 18. On post-donor site healing day 150, we found that the TEWL values did not show any significant difference between the STSG donor site wounds treated with the wound dressing containing silk fibroin with bioactive coating layer ($8.82 \pm 2.69 \text{ g/m}^2/\text{h}$) and adjacent normal skin ($8.01 \pm 2.07 \text{ g/m}^2/\text{h}$) ($p = 0.149$), indicating complete skin barrier recovery. In contrast, we found that the TEWL values showed significant difference between the STSG donor site wounds treated with Bactigras[®] ($9.72 \pm 4.92 \text{ g/m}^2/\text{h}$) and adjacent normal skin ($8.01 \pm 2.07 \text{ g/m}^2/\text{h}$) ($p = 1 \times 10^{-8}$), indicating incomplete skin barrier recovery.

The TEWL indexes tended to decrease sharply during the first post-donor site healing month in both wound dressing groups as shown in Figure 13. The median TEWL on post-donor site healing days 0, 7, 30, 60, 90, 120 and 150 were 2.80 ± 0.88 , 2.45 ± 0.99 , 1.99 ± 0.84 , 1.83 ± 0.68 , 1.66 ± 1.05 , 1.60 ± 0.68 and 1.22 ± 0.43 times higher than adjacent normal skin for the Bactigras[®] group, in respective order. The median TEWL on post-donor site healing days 0, 7, 30, 60, 90, 120 and 150 were 2.31 ± 0.90 , 2.06 ± 0.94 , 1.75 ± 0.85 , 1.63 ± 0.57 , 1.45 ± 0.65 , 1.36 ± 0.41 and 1.09 ± 0.23 times higher than adjacent normal skin for the wound dressing containing silk fibroin with bioactive coating layer group, in respective order.

The TEWL indexes of the healed STSG donor site wound were significantly lower in the STSG donor site wounds treated with the wound dressing containing silk fibroin with bioactive coating layer on all evaluation days, indicating a more rapid TEWL recovery of the STSG donor site wounds treated with the wound dressing containing silk fibroin with bioactive coating layer (Figure 13). Appendix L shows the STSG donor site wounds during follow-up for 5 months.

Table 18: TEWL of normal skin and STSG donor sites in each dressing

Post-donor site healing day	TEWL (g/m ² /h)		
	Median ± IQR (Range)		
	Normal skin	Bactigras [®]	Bilayered wound dressing
0	8.09 ± 2.67 (5.28-11.61)	23.76 ± 7.40 ^a (13.69-41.90)	19.63 ± 5.78 ^a (7.67-30.79)
7	8.36 ± 2.32 (4.25-13.86)	21.42 ± 8.74 ^a (9.43-38.66)	18.61 ± 9.75 ^a (9.00-34.94)
30	8.15 ± 4.18 (6.08-14.74)	18.29 ± 7.97 ^b (6.83-27.12)	16.39 ± 6.04 ^b (6.92-25.55)
60	7.82 ± 2.67 (5.70-20.91)	16.34 ± 6.62 ^a (7.69-39.64)	14.26 ± 6.94 ^a (7.38-39.13)
90	7.72 ± 2.49 (5.53-16.11)	13.66 ± 6.43 ^c (6.40-28.66)	12.20 ± 5.86 ^c (5.79-27.04)
120	8.10 ± 2.08 (4.75-11.89)	11.47 ± 7.26 ^d (7.11-22.92)	10.36 ± 3.83 ^f (6.40-21.48)
150	8.01 ± 2.07 (5.66-11.43)	9.72 ± 4.92 ^e (5.74-22.00)	8.82 ± 2.69 ^g (5.28-19.50)

^aSignificant difference ($p = 1 \times 10^{-13}$ vs normal skin), calculated by Friedman ANOVA).

^bSignificant difference ($p = 1 \times 10^{-12}$ vs normal skin), calculated by Friedman ANOVA).

^cSignificant difference ($p = 1 \times 10^{-10}$ vs normal skin), calculated by Friedman ANOVA).

^dSignificant difference ($p = 1 \times 10^{-9}$ vs normal skin), calculated by Friedman ANOVA).

^eSignificant difference ($p = 1 \times 10^{-8}$ vs normal skin), calculated by Friedman ANOVA).

^fSignificant difference ($p = 0.02$ vs normal skin), calculated by Friedman ANOVA).

^gNo Significant difference ($p = 0.149$ vs normal skin), calculated by Friedman ANOVA).

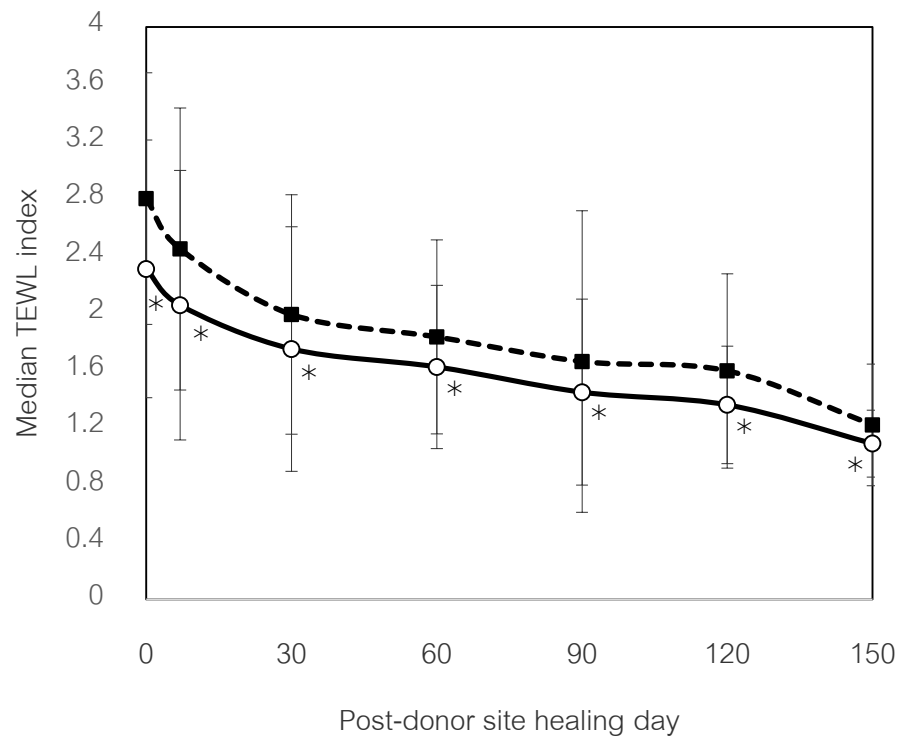


Figure 13: Median transepidermal water loss (TEWL) of healed STSG donor site treated with Bactigras[®] and wound dressing containing silk fibroin with bioactive coating layer (---■---) Bactigras[®], (—○—) wound dressing containing silk fibroin with bioactive coating layer. Bar lines represent interquartile range. TEWL index = TEWL of post-donor site healing day A/ TEWL of adjacent normal skin day A. *Significant difference ($p = 1 \times 10^{-5}$ vs Bactigras[®]), calculated by Wilcoxon Signed Rank Test.

4.2.4 Infection

There were no signs of STSG donor site infection in both wound dressing groups, and therefore it was unnecessary to swab the wounds. The results of body temperature showed mild fever (body temperature $< 38^{\circ}\text{C}$) on operative day. After that, the body temperatures after operation were stable and lower than 37°C (no fever). Moreover, there were no significant differences in body temperature between pre-operative day and post-operative day 2 ($p = 0.083$), 4 ($p = 0.056$) and 5 ($p = 0.135$) (Figure 14).

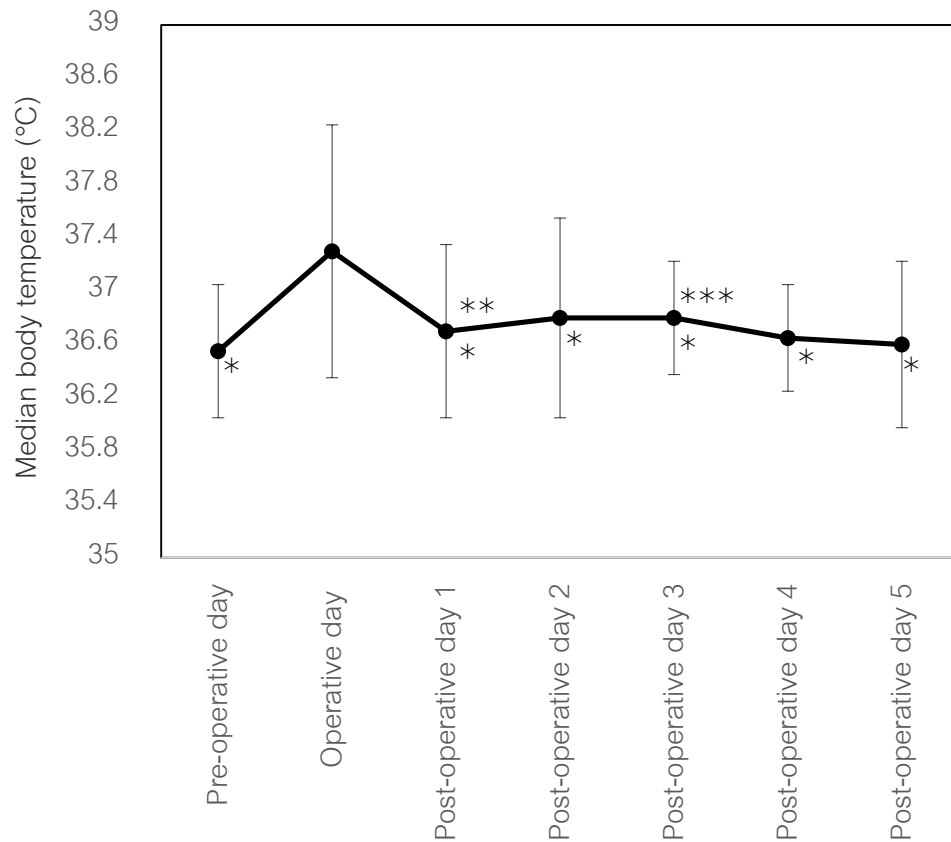


Figure 14: Median body temperature of patient. * Significant difference ($p = 1 \times 10^{-11}$ vs Operative day); **Significant difference ($p = 0.036$ vs Preoperative day); ***Significant difference ($p = 0.004$ vs Preoperative day), calculated by Friedman ANOVA

4.2.5 Systemic adverse reactions

Serum samples were collected from patients at two time points (before the operation and 1-3 days after the operation) for monitoring renal and hepatic functions. Blood urea nitrogen (BUN) and serum creatinine (Scr) were used to evaluate renal function, whereas aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP) and albumin were used to evaluate hepatic function.

For renal function, median BUN and Scr decreased after the operation. Moreover, significant differences in BUN were found between pre- and post-operation (13.00 ± 4.25 and 10.00 ± 2.50 mg/dL respectively, $p = 4 \times 10^{-4}$). In contrast, no significant differences in Scr were found between pre- and post-operation (0.80 ± 0.17 and 0.70 ± 0.20 mg/dL

respectively, $p = 0.388$). However, the median BUN and Scr of pre- and post-operative days were in the normal range (Table 19).

For hepatic function, median AST, ALT, ALP and albumin decreased after the operation. Moreover, significant differences in AST, ALT, ALP and albumin were found between pre- and post-operation (19.00 ± 10.25 and 16.00 ± 9.25 U/L respectively, $p = 0.022$ for AST, 24.00 ± 10.25 and 10.50 ± 9.25 U/L respectively, $p = 3 \times 10^{-5}$ for ALT, 80.00 ± 51.00 and 71.00 ± 53.25 U/L respectively, $p = 5 \times 10^{-4}$ for ALP, 3.60 ± 1.30 and 3.20 ± 0.93 g/dL respectively, $p = 2 \times 10^{-5}$ for albumin). However, the median AST, ALT, ALP and albumin of the pre- and post-operative days were in the normal range (Table 19).

In addition, there were no significant differences in the number of patients with abnormal values of BUN, Scr, AST, ALT, ALP between pre- and post-operation. In contrast, there were significant differences in the number of patients with abnormal values of albumin between pre- and post-operation ($p = 0.004$). The number of patients with abnormal values of BUN, Scr, AST, ALT, ALP and albumin (less than the lower limit and more than the upper limit) between pre- and post-operation are shown in Table 20.

Table 19: Renal and hepatic functions of patients

Parameter [†]	Pre-operative day		Post-operative day (1-3 days)		p-value ^a	p-value ^b
	Median ± IQR (Range)	Number of abnormal values (%)	Median ± IQR (Range)	Number of abnormal values (%)		
Renal functions						
BUN (mg/dL) (Normal value: 7-20)	13.00 ± 4.25 (4-26)	3 (10.0)	10.00 ± 2.50 (4-24)	4 (13.3)	4 × 10 ⁻⁴	1.000
Scr (mg/dL) (Normal value: 0.50-1.00)	0.80 ± 0.17 (0.50-1.00)	0 (0)	0.70 ± 0.20 (0.50-1.00)	0 (0)	0.388	-
Hepatic functions						
AST (U/L) (Normal value: 5-35)	19.00 ± 10.25 (12-87)	5 (16.7)	16.00 ± 9.25 (11-60)	2 (6.7)	0.022	0.375
ALT (U/L) (Normal value: 0-40)	24.00 ± 10.25 (4-66)	3 (10.0)	10.50 ± 9.25 (5-46)	1 (3.3)	3 × 10 ⁻⁵	0.500
ALP (U/L) (Normal value: 40-120)	80.00 ± 51.00 (46-163)	7 (23.3)	71.00 ± 53.25 (35-161)	9 (30.0)	5 × 10 ⁻⁴	0.500
Albumin (g/dL) (Normal value: 3.0-5.0)	3.60 ± 1.30 (3.0-4.8)	0 (0)	3.20 ± 0.93 (2.2-4.2)	9 (30.0)	2 × 10 ⁻⁵	0.004

^a Calculated by Wilcoxon signed rank test to compare the differences of each laboratory data on pre- and post-operative days

^b Calculated by McNemar Test to compare the differences of the number of abnormal values in each laboratory data on pre- and post-operative days

[†] BUN = Blood urea nitrogen, Scr = Serum creatinine, AST = Aspartate aminotransferase, ALT = Alanine aminotransferase, ALP = Alkaline phosphatase

Table 20: Abnormal values of each laboratory data on pre- and post-operative days

Parameter [†]	Pre-operative day				Post-operative day				p-value ^a
	Number of abnormal values		Abnormal values		Number of abnormal values		Abnormal values		
	<lower limit	>upper limit	Minimum value	Maximum value	<lower limit	>upper limit	Minimum value	Maximum value	
BUN (mg/dL) (Normal value: 7-20)	2	1	4	26	3	1	4	24	1.000
AST (U/L) (Normal value: 5-35)	0	5	-	87	0	2	-	60	0.375
ALT (U/L) (Normal value: 0-40)	0	3	-	66	0	1	-	46	0.500
ALP (U/L) (Normal value: 40-120)	0	7	-	163	2	7	35	161	0.500
Albumin (g/dL) (Normal value: 3.0-5.0)	0	0	-	-	9	0	2.2	-	0.004

[†] BUN = Blood urea nitrogen, AST = Aspartate aminotransferase, ALT = Alanine aminotransferase, ALP = Alkaline phosphatase

^a Calculated by McNemar test to compare the difference of the number of abnormal values in each laboratory data on pre- and post-operative days

4.2.6 Morphology of new epithelial cells

Figure 15 shows the wound dressing characteristics after spontaneously falling off as taken by a digital camera.

After falling off spontaneously, Bactigras[®] had the same little brownish-black or black color on both sides (Figure 15; a1 and a2). In addition, used Bactigras[®] usually stuck to the absorbent gauzes.

The wound dressing containing silk fibroin with bioactive coating layer after falling off spontaneously became quite stiff and had brownish-black or black color on the wound contact layer of dressing (Figure 15; b1), while the top layer of dressing had a little brownish color (Figure 15; b2). In addition, some used wound dressing containing silk fibroin with bioactive coating layer was curved along the anterior thigh area.

Figure 16 shows the morphology of epithelial cells attached on the wound dressing after falling off spontaneously under polarized light microscope. Epithelial cells were carefully removed from the wound dressings and then seen through a polarized light microscope at 20x magnification.

Epithelial cells from the wound dressing containing silk fibroin with bioactive coating layer had definite shapes and the average cell size was $808.71 \pm 158.37 \mu\text{m}^2$ ($575.81\text{-}1268.75 \mu\text{m}^2$) In contrast, the epithelial cells from Bactigras[®] had an unclear border of cells.

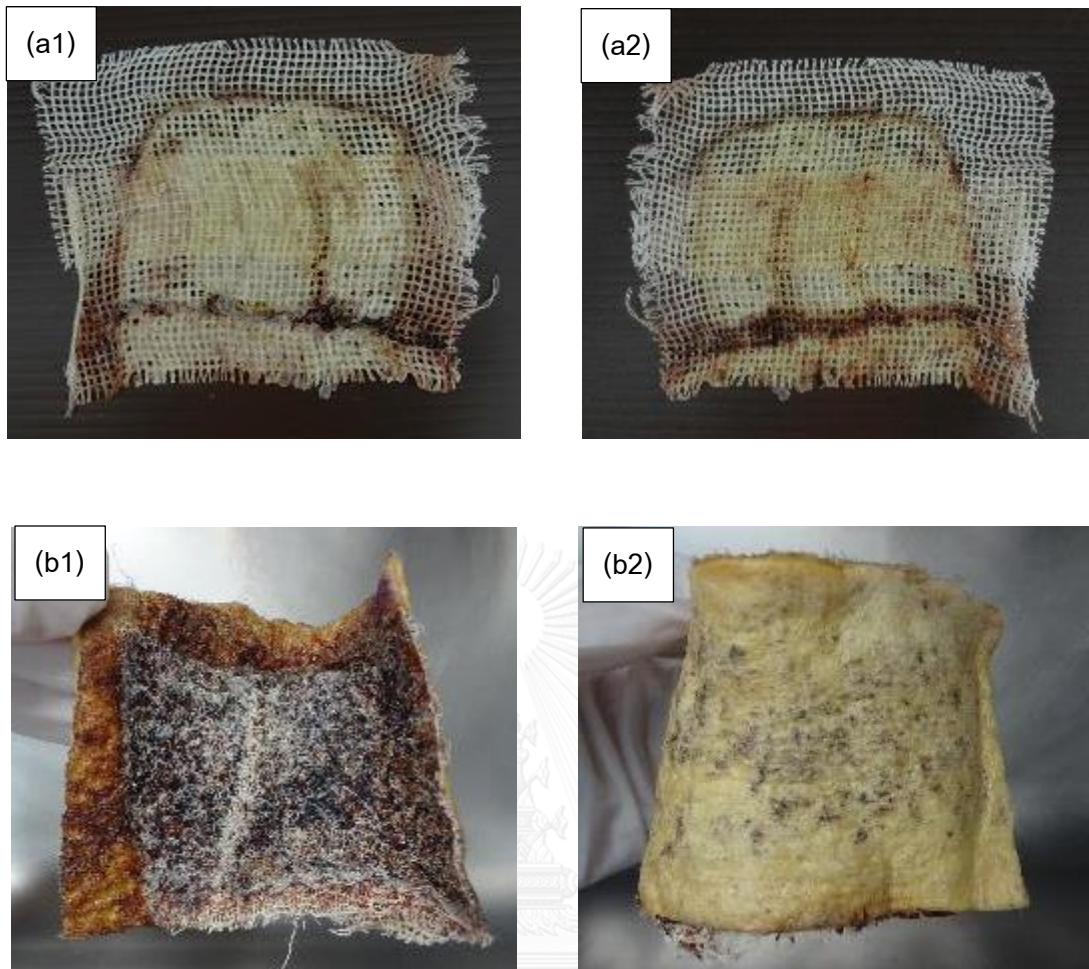


Figure 15: Macroscopic images on both sides of the Bactigras[®] (a1 and a2) and wound dressing containing silk fibroin with bioactive coating layer (b1 and b2) after falling off spontaneously.

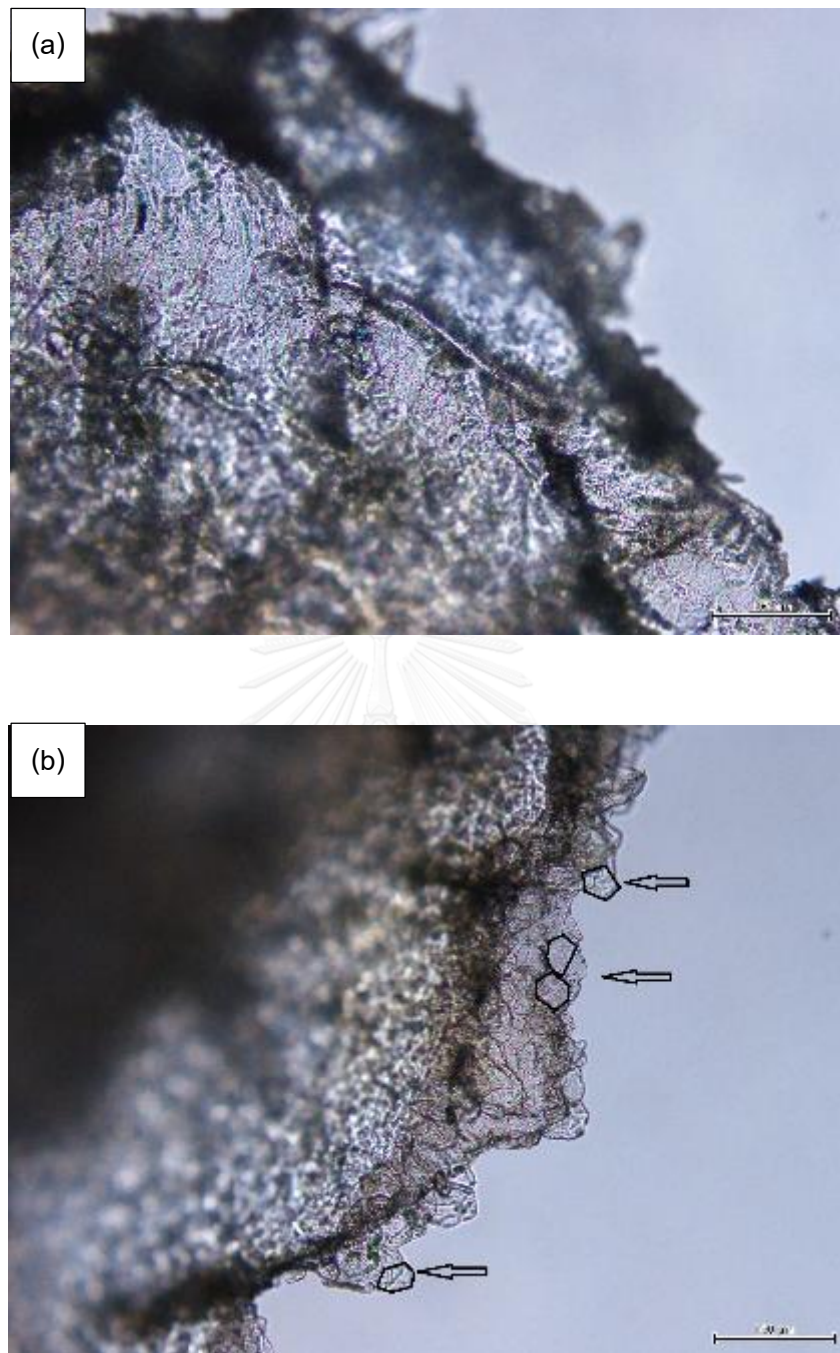


Figure 16: Morphology of epithelial cells attached on the Bactigras[®] (a) and wound dressing containing silk fibroin with bioactive coating layer (b) after falling off spontaneously under a polarized light microscope at 20x magnification.

(\leftarrow indicated normal cell shape)

CHAPTER V

DISCUSSION

In this study, we conducted clinical trials on the wound dressing containing silk fibroin with bioactive coating layer in comparison with the clinically used wound dressing, Bactigras[®]. These clinical trials consisted of phase I clinical safety of the wound dressing in healthy volunteers using a skin patch test and phase II clinical efficacy and safety of the wound dressing in the treatment of split-thickness skin graft donor sites.

For phase I, the skin patch test is an investigative method to identify skin irritation or sensitization potential through the reapplication of products (divided into four sequential phases (beginning phase, induction phase I, induction phase II and challenge phases) (85). In this study, we conducted two types of interpretation of skin patch test results: an objective measurement of skin color, carried out by a non-invasive Mexameter[®] MX18, and a subjective score on the RIPT scale, carried out by two clinical dermatologists.

Our results obtained from the first type of interpretation of skin patch test results in healthy volunteers revealed that the erythema (skin redness) and melanin (skin darkness) levels at the beginning phase were 238.63 ± 83.52 and 230.68 ± 99.74 , respectively. This results were comparable to those by Siritientong in 2013 (91) which reported the erythema and melanin levels in Thai healthy volunteers at the age of 20-57 years as 251.01 ± 80.50 and 219.00 ± 91.95 , respectively. When compared to other phases, we found that the erythema and melanin levels at each phase during the patch test (induction phase I, induction phase II and challenge phases) were statistically significantly lower from the beginning phase ($p \leq 1 \times 10^{-4}$) in both wound dressing groups (the wound dressing containing silk fibroin with bioactive coating layer and Bactigras[®] groups). However, the erythema and melanin levels at induction phase I, induction phase II and challenge phases did not increase from the beginning phase. Therefore, it can be said that there was no evidence of skin irritation or skin darkness. In addition, the reduction of erythema and

melanin levels by the wound dressing containing silk fibroin with bioactive coating layer (3.93-5.02% for erythema and 4.49-4.55% for melanin) did not significantly differ from those with Bactigras[®] (4.73-6.32% for erythema and 4.67-4.70% for melanin), $p = 0.269$ for erythema and $p = 0.795$ for melanin. Moreover, the reduction of erythema and melanin levels by both wound dressings in this study was still lower than the results reported by Kim *et al.* in 2009 (92) which reported the erythema and melanin levels after applying Vaseline[®] in healthy volunteers between the ages of 22-36 years as being reduced by 9.00-19.10% and 19.80-23.80%, respectively. Therefore, the changes in erythema and melanin levels in this study were not clinically significant.

For the second type of interpretation of skin patch test results (the subjective score on the RIPT scale by two clinical dermatologist), in addition to the changes in skin color, other changes in skin characteristics such as papule or vesicle should be considered. The RIPT scale consists of six grades used to assess the severity of erythema and the presence of edema, petechiae, papule, vesiculation or weeping (also called “the severity of cutaneous reactions”) (85). In this study, the cutaneous responses in both wound dressing groups did not increase over time and failed to reappear in the challenge phase, and therefore they did not involve the immune response (93). Our results obtained from the RIPT scale showed that there was no evidence of marked or severe responses for both wound dressings, and therefore there was no presence of bright or deep red erythema with edema, petechiae, papule, vesiculation or weeping in any phase of the skin patch test. However, there was evidence of mild and moderate erythema in the wound dressing containing silk fibroin with bioactive coating layer group (3.64%), while there was no such evidence in Bactigras[®] group. The response was just barely perceptible (minimal, faint, uniform or spotty erythema) in the Bactigras[®] group (1.36%). Although there was evidence of mild and moderate erythema in our innovative wound dressing, the percentage of those responses was comparable to the results by Dykes in 2007 (94). That study reported the percentages of mild and moderate erythema in Biatain adhesive dressing and Comfeel plus transparent dressing were 3.9% and 3.6%, respectively. Therefore the wound dressing containing silk fibroin with bioactive coating layer could be used as wound dressing in the clinical setting

because the Biatain adhesive dressing and Comfeel plus transparent dressing are currently in use clinically.

Apart from the skin patch test in 110 healthy volunteers, we conducted a clinical study in 23 patients with 30 STSG donor site wounds to clarify the efficacy and safety of the wound dressing containing silk fibroin with bioactive coating layer. The STSG donor site was used as a wound model due to its smooth surface and uniform thickness. In addition, it is a clean wound as the surgeon makes it in a sterilized environment. The wound dressing containing silk fibroin with bioactive coating layer and Bactigras[®] were applied within the same patient using a side-by-side matched pairs design by dividing the STSG donor site wound into two equal halves. This experimental design helps to reduce variance due to patient and wound characteristics that affect wound healing such as underlying diseases or wound depth. Bactigras[®] (medicated paraffin gauze dressing) was used as a control treatment because it is a standard wound dressing for STSG donor site treatment in hospital. This type of wound dressing is inexpensive and easy to apply; however, it does stick to the wound surface without the ability to absorb wound exudate (11-13). Therefore, we developed a wound dressing containing silk fibroin with bioactive coating layer designed to increase the ability to absorb wound exudate because of its spongy structure and reduced adherence at the wound surface owing to its non-adhesive wound contact layer. Moreover, the wound dressing containing silk fibroin with bioactive coating layer can promote wound healing by supporting cell attachment, proliferation, migration and collagen production (28, 29). In the present study, the STSG donor site wound was evaluated for healing time, pain level, skin barrier function (TEWL) and infection. Systemic adverse reactions were also evaluated in each patient. Finally, the morphology of epithelial cells attached on the wound dressing after falling off were observed.

The healing time was defined as the time between the operative day and the day that the wound dressing separated completely or fell off from the donor site, without any exudates and without pain when the donor site was exposed to air (12, 13). The healing time of the STSG donor site wound treated with Bactigras[®] in the present study was comparable to the results of many previous studies (14-15 days) (11, 12, 27). The healing

time of STSG donor site wounds treated with the wound dressing containing silk fibroin with bioactive coating layer (11.0 ± 6.0 days) was significantly faster than those treated with Bactigras[®] (14.0 ± 6.0 days), possibly because this innovative bilayered wound dressing provides a moist wound environment and has bioactive substances which can promote wound healing.

Bactigras[®] (medicated paraffin gauze dressing) is a non-occlusive dressing type which is permeable to fluid and therefore gradually dries out because of evaporation (95). While, the wound dressing containing silk fibroin with bioactive coating layer has fairly similar properties to the occlusive dressing type which can keep the wound bed moist. Our previous study showed that the wound dressing containing silk fibroin with bioactive coating layer could control the dehydration as good as Allevyn[®] (foam dressing) in an *in vitro* wound model, possibly because it has a porous structure and therefore has the ability to keep the wound bed moist (28). A moist wound bed is an optimal environment for epithelial cell proliferation and migration and this principle has been supported by the results from many previous studies reporting STSG donor site wounds treated with occlusive dressings (such as hydrocolloid or alginate dressings) healed faster than those treated with fine mesh gauze (12, 27, 95, 96). Another reason is that the wound dressing containing silk fibroin with bioactive coating layer was made from silk fibroin (SF), silk sericin (SS) and gelatin, which can enhance wound healing by cell attachment, proliferation, and collagen production. SF biomaterials (such as SF film and SF scaffold) have been proven to enhance cell attachment and proliferation in many previous studies (16, 17, 44-46). Inpanya *et al.* (17) and Padol *et al.* (51) found that full-thickness skin wounds in rats treated with SF biomaterials healed faster than untreated wounds. Jeong *et al.* (50) also showed that full-thickness skin wounds in rats treated with electrospun SF nanofibers were completely healed at 2 weeks post wound creation which healed faster than those treated with Tegaderm. Clemens *et al.* (26) conducted a clinical study into patients who underwent abdominal wall fascial repair, and the results showed that SF biologic scaffolds could support and repair the abdominal wall with subcutaneous placement at low complication rates.

The ability of SS biomaterials to enhance the attachment and proliferation of keratinocyte and fibroblast cells has been widely reported (23, 29, 63, 64). The collagen-stimulating effect of SS was also reported by Aramwit *et al.* (19, 58) which can stimulate collagen type I synthesis, due to its high methionine content. Nagai *et al.* (66) reported that SS solution enhanced the adhesion and proliferation of the human cornea epithelial cell line (HCE-T), and that corneal wounds in rats instilled with SS solution healed faster than those instilled with saline. Aramwit *et al.* (68) and Siritienthong *et al.* (25) studied the effects of SS on wound size reduction and collagen formation using full-thickness skin wound model in rats, showing that the wound size reduction of SS biomaterial-treated wounds was higher than in control material-treated wounds and that SS can enhance collagen formation. Aramwit *et al.* (69) and Siritienthong *et al.* (27) also studied the effect of SS in the treatment of second degree burn wounds and STSG donor site wounds, respectively, and the results showed that the time for complete healing in wounds treated with SS was shorter than that for the control treatment and there was no evidence of adverse reaction.

In addition to the ability of SF and SS, gelatin is a natural polymer obtained from denatured collagen which is known to support cell attachment and proliferation (97). Panzavolta *et al.* (98) showed that electrospun gelatin nanofibers were able to support vascular wall mesenchymal stem cells attachment and proliferation. Jin *et al.* (99) found that the attachment and proliferation of human dermal fibroblasts were proportional to the gelatin content in nanofibers and the electrospun gelatin nanofibers accelerated wound closure in full-thickness skin wounds in rats. Bindu *et al.* (100) also showed that full-thickness skin wounds in rats treated with chitosan-gelatin film healed faster than those treated with chitosan film. Due to the properties of retaining moisture and delivering bioactive substances (SF, SS and gelatin) to promote wound healing, the STSG donor site wounds treated with the wound dressing containing silk fibroin with bioactive coating layer showed better healing time.

Apart from healing time, follow-up was conducted regarding local pain at the STSG donor site using a visual analog scale (VAS) to obtain a pain score. The sides treated with the wound dressing containing silk fibroin with bioactive coating layer showed less pain

than those with Bactigras[®] on all evaluation days, possibly due to the former's properties of retaining moisture together with low adhesion. Due to the residual dermis in the STSG donor site, the exposed nerve endings increased the pain. The wound dressing with its property of retaining moisture is able to protect the nerve endings from both drying and exposure (101). This principle was confirmed by the results from many previous studies which reported less pain in the STSG donor sites treated with occlusive dressing (moist-environment dressing) compared with paraffin gauze dressing (traditional dry dressing) (11, 13, 27). Additionally, paraffin gauze dressing gradually becomes dried out and then firmly attaches to the wound surface which causes increased pain (11, 95). The wax-coated silk fibroin woven fabric layer of the innovative bilayered wound dressing was designed to reduce adherence at the wound bed. A peel test on the full-thickness skin wound of porcine skin in our previous study demonstrated that the wound dressing containing silk fibroin with bioactive coating layer was much less adhesive than Bactigras[®] (102). Therefore, the reasons for the wound dressing containing silk fibroin with bioactive coating layer minimizing pain were not only that it provided a moist environment but that it also has low adhesion properties.

Interestingly, the present study also evaluated the restoration of skin barrier function in terms of decreased transepidermal water loss (TEWL) over time. The STSG procedure causes damage to the stratum corneum at the donor site, and therefore it causes changes in skin barrier function, particularly water barrier function (103). Measurement of TEWL is used to evaluate water barrier function. In a meta-analysis study of the normal TEWL values obtained from three TEWL probe manufactures (Courage & Khazaka, Delfin Technologies and Biox Ltd.) (72), a TEWL of 6.1 g/m²/h was reported for the thigh in the studies including 18-64 years subjects and a TEWL of 3.0 g/m²/h was reported for the thigh in the studies including 65+ years subjects, while a TEWL of ~ 8 g/m²/h was reported in the present study. In addition, our results showed that on post-donor site healing day 0, the normal TEWL of 6.69 ± 2.60 and 8.56 ± 3.28 g/m²/h were reported for patients > 50 (n =7) and ≤ 50 (n = 23) years, respectively. Therefore, the TEWL values of normal skin in the present study were a little bit high, possibly due to the number of young adults. Wilhelm *et al.* (104) and

Luebberding *et al.* (105) also reported decreased TEWL values in the elderly group (60-80 years).

Our results demonstrate that the normalization of the TEWL of the STSG donor site wounds treated with the wound dressing containing silk fibroin with bioactive coating layer occurred at 150 days after healing or around 160 days after wounding. This result was comparable to the results of Atiyeh *et al.* in 2003 (106) which reported the normalization of TEWL of the STSG donor site wounds treated with Tegaderm (semi-occlusive dressing) obtained at 150.0 ± 46.5 days after the initial wounding. In contrast, the TEWL values of the STSG donor site wounds treated with Bactigras[®] remained elevated at 150 days after healing. Furthermore, our results showed that the TEWL indexes of healed STSG donor site wounds were significantly lower for the STSG donor site wounds treated with the wound dressing containing silk fibroin with bioactive coating layer on all evaluation days, indicating a more rapid skin functional barrier recovery of the STSG donor site wounds treated with the wound dressing containing silk fibroin with bioactive coating layer. These results confirm that the STSG donor site wounds treated with our innovative bilayered wound dressing healed faster than those treated with Bactigras[®], possibly due to the reasons mentioned before (the property of maintaining moisture and delivering bioactive substances (SF, SS and gelatin) to promote wound healing). Therefore, decreased TEWL can be used as an objective indicator of wound healing.

The damaged stratum corneum at donor site causes changes in not only water barrier function but also bacterial barrier function (103). Therefore, follow-up was also conducted on the infection at the STSG donor site wound based on clinical signs of infection (swelling, inflammation, heat, purulent exudate or malodor). Our results showed that there were no signs of STSG donor site infection in both wound dressings and the body temperatures after operation were stable and lower than 37°C , indicating no fever. Although the body temperatures indicated mild fever on operative day, this febrile reaction was often due to an inflammatory response to surgery (107). Even though Bactigras[®] allows wound exudate to drain into a secondary absorbent layer which protects the wound from maceration, it is permeable to micro-organisms which cannot protect the wound from

contamination by micro-organisms. However, Bactigras[®] is a paraffin gauze dressing medicated with chlorhexidine which is shown to reduce the incidence of *Staphylococcus aureus* in patients with partial-thickness burns, as compared with non-medicated paraffin gauze dressing in the study by Lawrence (108). Apart from Bactigras[®], the wound dressing containing silk fibroin with bioactive coating layer provides not only a moist wound environment but also a bacterial barrier, possibly because it has fairly similar properties to the occlusive dressing type which is impermeable to micro-organisms. In the clinical review by Hutchinson and McGuckin (109), their results confirmed that the infection rates under occlusive dressings were lower than under non-occlusive dressings. This was also because of the lower pH environment (pH ~ 6.2) created under the wound dressing containing silk fibroin with bioactive coating layer as found by Hasatsri *et al.* in 2015 (28). Varghese *et al.* (110) reported that bacterial growth of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* was retarded at pH 5.5, as compared with pH 7.4, and therefore bacterial growth was inhibited by the lower pH. In addition, changes of the wound dressing containing silk fibroin with bioactive coating layer were required for only two (6.67%) STSG donor site wounds on day 3, due to the fully soaked dressing with exudates. Therefore, the wound dressing containing silk fibroin with bioactive coating layer is appropriate for treating a STSG donor site wound (which usually has a high exudate production) without causing the maceration of tissues. The factors, including the bacterial barrier, of lower pH under the wound dressing and the lack of maceration of tissues result in no signs of infection in STSG donor site wounds treated with the wound dressing containing silk fibroin with bioactive coating layer in the present study.

Our innovative bilayered wound dressing has a bioactive layer that delivers bioactive substances to promote wound healing. Therefore, in the case of large open wounds (such as STSG donor site wounds), the application of our innovative bilayered wound dressing may produce systemic adverse reactions such as renal and hepatic impairment. In addition, some types of wound dressings can cause systemic toxic effects such as silver dressings, and therefore the systemic adverse reactions should also be monitored (111). In the present study, we collected the serum samples from patients at two

time points (before the operation and 1-3 days after the operation) for monitoring renal and hepatic functions. Our results demonstrated that all the median of the renal and hepatic functions on the pre- and post-operative days were in the normal range. However, there were significant differences in the number of patients with abnormal values of albumin between the pre- and post-operations because 30% of the patients had hypoalbuminemia after operation. Normally, patients receive large volumes of intravenous crystalloids on operative and post-operative day, resulting in increased extracellular fluid (ECF) volume (112, 113). Therefore, the hypoalbuminemia after the operation in this study might be influenced by the dilutional effect caused by crystalloid infusion. According to the nutrition affecting wound healing, serum samples were collected within 3 days after the operation and the body pool of serum albumin is large. As a result, the albumin level did not respond readily to the nutritional status of patients (114). It can be said that the hypoalbuminemia in this study may not be a reliable indicator of nutrient deficiencies which have negative effects on wound healing. To confirm that hypoalbuminemia did not affect healing time, patients with the slowest healing donor sites did not have the lowest albumin levels in both wound dressing groups. Moreover, we did not find any significant difference in healing time between patients with hypoalbuminemia and patients without hypoalbuminemia in both wound dressing groups ($p = 0.422$ for Bactigras[®] and $p = 0.929$ for the wound dressing containing silk fibroin with bioactive coating layer)

Lastly, we observed the wound dressing characteristics and morphology of epithelial cells attached on the wound dressing after falling off spontaneously. Used the wound dressing containing silk fibroin with bioactive coating layer had a brownish-black or black color on the wound contact layer of dressing, while the top layer of dressing had a little brownish color, as this indicated the exudate production did not exceed the fluid holding capacity of the dressing. Regarding the morphology of the epithelial cells attached on the wound dressing, the epithelial cells from the wound dressing containing silk fibroin with bioactive coating layer had definite shapes with the average cell size of $808.71 \mu\text{m}^2$ ($575.81\text{-}1268.75 \mu\text{m}^2$). In contrast, epithelial cells from Bactigras[®] had an unclear border of cells. The normal cell shape was usually a definite border with pentagonal or hexagonal

shapes and the normal cell size varies due to age and skin area (115, 116). Guz *et al.* (116) reported that the size of normal cells ranged from 650-850 μm^2 at the back of the hand and 600-1000 μm^2 at the forearm in the young group, whereas the size of normal cells ranged from 800-1050 μm^2 at the back of the hand and 1000-1300 μm^2 at the forearm in elderly group. Holzle *et al.* (115) found that the normal cells increased in size from 930 μm^2 at the scapular area to 1000 μm^2 at the hip area. In addition, cells from allergic contact dermatitis, irritated skin and skin applied with topical steroid exhibited an irregular shape and were 10 - 15% smaller than normal (115, 117). In this study, the shape and size of epithelial cells attached on the wound dressing containing silk fibroin with bioactive coating layer were comparable to normal cells. Our results were also comparable to the study by Siritientong in 2013 (91) which reported the definite shape of the epithelial cell with the average cell size ranging from 500-1000 μm^2 for epithelial cells attached on silk sericin dressing after falling off spontaneously from the healed STSG donor site and epithelial cells attached on Bactigras[®] exhibited an unclear border. This finding in our study indicated that the new skin at STSG donor sites treated with the wound dressing containing silk fibroin with bioactive coating layer was of much better quality than that treated with Bactigras[®]. This may be explained by the lower adherence of the wound dressing containing silk fibroin with bioactive coating layer, which reduced the disruption of re-epithelialized surfaces. In addition, this finding confirmed that the STSG donor site wounds treated with our innovative bilayered wound dressing healed faster than those treated with Bactigras[®], because the epithelial cells attached on the bilayered wound dressing were of better quality than those attached on Bactigras[®].

CHAPTER VI

CONCLUSIONS

Phase I and phase II clinical trials were conducted to collect data regarding the clinical safety of the wound dressing containing silk fibroin with bioactive coating layer in healthy volunteers and the clinical efficacy and safety of this wound dressing in the treatment of STSG donor sites.

Regarding the phase I clinical safety of the wound dressing containing silk fibroin with bioactive coating layer in healthy volunteers using a skin patch test, this phase was performed at the Department of Pharmacy Practice, Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University between November 2012 and February 2013. A total of 112 subjects were recruited for the study. Of these, 110 subjects were available for a follow up evaluation (1.8% loss to follow up). According to the skin patch test procedure, on the first visit, the back areas of each subject were divided into two sides, with each side randomized to receive the wound dressing containing silk fibroin with bioactive coating layer or Bactigras[®]. Both dressings were left for 3 days. After that, both dressings were changed and left for an additional 3 days (induction phase I and II). Seven to ten days after the last induction application, both dressings were applied on the identical areas and left in place for 3 days (challenge phase). At each phase, the measurement of erythema and melanin levels was repeated consecutively for twenty times by Mexameter MX18[®] probe and photos of the back skin were taken within 30 min after the dressings were removed and evaluated for any visual skin irritation or sensitization using the Repeated Insult Patch Test (RIPT) scale by two clinical dermatologists. Our results showed that the erythema and melanin levels at each phase during the patch test (induction phase I, induction phase II and challenge phases) were statistically significantly different from the beginning phase ($p \leq 1 \times 10^{-4}$) in both wound dressing groups (the wound dressing containing silk fibroin with bioactive coating layer and Bactigras[®] groups). However, the erythema and melanin levels at

induction phase I, induction phase II and challenge phases did not increase from the beginning phase. Therefore, it can be concluded that there was no evidence of skin irritation or skin darkness. In addition, the results obtained from the RIPT scale showed that there was no presence of bright or deep red erythema with edema, petechiae, papule, vesiculation or weeping in any phase of the skin patch test. However, there was evidence of mild and moderate erythema in the wound dressing containing silk fibroin with bioactive coating layer group (3.64%), while there was no such evidence in the Bactigras[®] group. This evidence was comparable to the commercial wound dressing (Biatain adhesive dressing and Comfeel plus transparent dressing). Therefore, it can be summarized that the wound dressing containing silk fibroin with bioactive coating layer can be used in patients due to an acceptable safety profile in healthy volunteers.

As regards phase II clinical efficacy and safety of the wound dressing containing silk fibroin with bioactive coating layer in the treatment of STSG donor sites using a side-by-side matched pairs design, this was performed at the Division of Plastic and Reconstructive Surgery, Department of Surgery, King Chulalongkorn Memorial Hospital between October 2013 and January 2015. A total of 30 donor sites from 23 patients who underwent a STSG procedure were recruited for the study. The STSG donor site was divided into two equal halves, with each side randomized to receive the wound dressing containing silk fibroin with bioactive coating layer or Bactigras[®], and then covered with gauze pads and elastic bandages. The first part of our results showed that the healing time of the STSG donor site wounds treated with the wound dressing containing silk fibroin with bioactive coating layer (11.0 ± 6.0 days) was significantly faster than those treated with Bactigras[®] (14.0 ± 6.0 days) ($p = 1 \times 10^{-6}$). The second part of results reported that the sides treated with the wound dressing containing silk fibroin with bioactive coating layer caused significantly less pain than those treated with Bactigras[®] on all first five postoperative days. Next, the TEWL of the healed STSG donor site wound was evaluated to determine skin barrier recovery. The TEWL indexes of the healed STSG donor site wound were significantly lower in the STSG donor site wounds treated with the wound dressing containing silk fibroin with bioactive coating layer on post-donor site healing days 0, 7, 30, 60, 90, 120 and 150,

indicating a more rapid TEWL recovery (skin barrier function recovery) of the STSG donor site wounds treated with the wound dressing containing silk fibroin with bioactive coating layer. Moreover, the time for complete skin barrier recovery was 150 days after healing for the STSG donor sites treated with the wound dressing containing silk fibroin with bioactive coating layer. Evidence of infection was also observed. There were no signs of STSG donor site infection in either wound dressing group. To investigate any potential systemic adverse reactions, hepatic and renal functions were evaluated. AST, ALT, ALP, albumin, BUN and Scr decreased after the operation; however, the medians of all parameters were in the normal range. Although there were some patients with hypoalbuminemia, this could have been caused by the dilutional effect caused by crystalloid infusion. Finally, the morphology of the epithelial cells attached on the wound dressing containing silk fibroin with bioactive coating layer after falling off spontaneously under a polarized light microscope was shown to be of definite shape while the epithelial cells from Bactigras[®] had an unclear border of cells. Therefore, the wound dressing containing silk fibroin with bioactive coating layer not only can promote wound healing but also minimize pain with no induction of infection and systemic adverse reactions.

Limitations of the study

Concerning phase I clinical safety of the wound dressing containing silk fibroin with bioactive coating layer in healthy volunteers using a skin patch test, a self-adhesive non-woven fabric (Neofix[®]) used to cover the wound dressing may cause skin irritation; therefore, it may produce false positive results.

As regards phase II clinical efficacy and safety of the wound dressing containing silk fibroin with bioactive coating layer in the treatment of STSG donor sites, some patients experienced severe pain on the first postoperative day. As a result, the pain levels of the donor site wounds were difficult to differentiate between the side treated with the wound dressing containing silk fibroin with bioactive coating layer and the side treated with Bactigras[®].

In addition, the different characteristics between the wound dressing containing silk fibroin with bioactive coating layer and Bactigras[®] results in difficult to generate a double blind trials.

Suggestions for further study

Further studies comparing the efficacy and safety of the wound dressing containing silk fibroin with bioactive coating layer in the treatment of other wound types are recommended to extrapolate the results for wounds with longer healing times. The wounds with longer healing times increase the duration of wound dressing exposure to the wound bed, and therefore data regarding adverse events could be detected.

In addition, the treatment costs and resource utilization (such as the number of outpatient visits per subject) should also be considered for making treatment decisions when compared to traditional wound dressings.

REFERENCES

1. Gurtner GC. Plastic Surgery. London: Elsevier; 2013. 319-38.
2. JBI. Split thickness skin graft donor sites: post harvest management. Best Practice. 2002;6(2):1-6.
3. Broussard KC, Powers JG. Wound Dressings: Selecting the Most Appropriate Type. Am J Clin Dermatol. 2013;14:449-59.
4. Weir D. Top tips for wound dressing selection. Wounds International. 2012;3(4):18-22.
5. Baranoski S. Wound & skin care: Choosing a wound dressing, part 1. Nursing. 2008;38(1):60-1.
6. Baranoski S. Wound & skin care: Choosing a wound dressing, part 2. Nursing. 2008;38(2):14-5.
7. Dunn DL. Wound closure manual. Somerville, NJ: Ethicon; 2005. 2-7.
8. Semer NB. Practical plastic surgery for nonsurgeons. Philadelphia: Hanley & Belfus; 2001. 85-110.
9. Glociczki P. Handbook of venous disorders. Broken Sound Parkway: Taylor & Francis Group; 2008.
10. Schwarze H, Kuntscher M, Uhlig C, Hierlemann H, Prantl L, Noack N, et al. Suprathel, a new skin substitute, in the management of donor sites of split-thickness skin grafts: results of a clinical study. Burns. 2007;33:850-4.
11. Muangman P, Nitimonton S, Aramwit P. Comparative clinical study of bactigras and telfa AMD for skin graft donor-site dressing. Int J Mol Sci. 2011;12:5031-8.
12. Angspatt A, Taweerattanasil B, Janvikul W, Chokrungruanont P. Carboxymethylchitosan, alginate and tulle gauze wound dressings: a comparative study in the treatment of partial-thickness wounds. Asian Biomed. 2011;5(3):413-6.
13. Barnea Y, Amir A, Leshem D, Zaretski A, Weiss J, Shafir R, et al. Clinical comparative study of aquacel and paraffin gauze dressing for split-skin donor site treatment. Ann Plast Surg. 2004;53(2):132-6.

14. Uzun M, Anand SC, Shah T. In vitro characterisation and evaluation of different types of wound dressing materials. *J Biomed Eng Technol.* 2013;1(1):1-7.
15. Still J, Glat P, Silverstein P, Griswold J, Mozingo D. The use of a collagen sponge/living cell composite material to treat donor sites in burn patients. *Burns.* 2003;29:837-41.
16. Min B-M, Jeong L, Nam YS, Kim J-M, Kim JY, Park WH. Formation of silk fibroin matrices with different texture and its cellular response to normal human keratinocytes. *Int J Biol Macromol.* 2004;34:223-30.
17. Inpanya P, Faikrue A, Ounaroon A, Sittichokechaiwut A, Viyoch J. Effects of the blended fibroin/aloe gel film on wound healing in streptozotocin-induced diabetic rats. *Biomed Mater.* 2012;7:1-13.
18. Vasconcelos A, Gomes AC, Cavaco-Paulo A. Novel silk fibroin/elastin wound dressings. *Acta Biomater.* 2012;8:3049-60.
19. Aramwit P, Kanokpanont S, Nakpheng T, Srichana T. The effect of sericin from various extraction methods on cell viability and collagen production. *Int J Mol Sci.* 2010;11:2200-11.
20. Tsubouchi K, Igarashi Y, Takasu Y, Yamada H. Sericin enhances attachment of cultured human skin fibroblasts. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2005;69(2):403-5.
21. Minoura N, Tsukada M, Nagura M. Physico-chemical properties of silk fibroin membrane as a biomaterial. *Biomaterials.* 1990;11:430-4.
22. Aramwit P, Siritientong T, Srichana T. Potential applications of silk sericin, a natural protein from textile industry by-products. *Waste Manage Res.* 2012;30(3):217-24.
23. Mandal BB, Priya AS, Kundu SC. Novel silk sericin/gelatin 3-D scaffolds and 2-D films: Fabrication and characterization for potential tissue engineering applications. *Acta Biomater.* 2009;5:3007-20.
24. Akturk O, Tezcaner A, Bilgili H, Deveci MS, Gecit MR, Keskin D. Evaluation of sericin/collagen membranes as prospective wound dressing biomaterial. *J Biosci Bioeng.* 2011;112(3):279-88.

25. Siritienthong T, Ratanavaraporn J, Aramwit P. Development of ethyl alcohol-precipitated silk sericin/polyvinyl alcohol scaffolds for accelerated healing of full-thickness wounds. *Int J Pharm.* 2012;439:175-86.
26. Clemens MW, Downey S, Agullo F, Lehfeldt MR, Kind GM, Palladino H, et al. Clinical application of a silk fibroin protein biologic scaffold for abdominal wall fascial reinforcement. *Plast Reconstr Surg Glob Open.* 2014;2(e246):1-10.
27. Siritientong T, Angspatt A, Ratanavaraporn J, Aramwit P. Clinical potential of a silk sericin-releasing bioactive wound dressing for the treatment of split-thickness skin graft donor sites. *Pharm Res.* 2014;31:104-16.
28. Hasatsri S, Yamdech R, Chanvorachote P, Aramwit P. Physical and biological assessments of the innovative bilayered wound dressing made of silk and gelatin for clinical applications. *J Biomater Appl.* 2015;29(9):1304-13.
29. Kanokpanont S, Damrongsakkula S, Ratanavaraporn J, Aramwit P. An innovative bi-layered wound dressing made of silk and gelatin for accelerated wound healing. *Int J Pharm.* 2012;436:141-53.
30. Thorne CH. *Grabb and Smith's plastic surgery.* 7 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2014. 2-28.
31. Guo S, DiPietro LA. Factors affecting wound healing. *J Dent Res.* 2010;89(3):219-29.
32. Rajendran S. *Advanced textiles for wound care:* Elsevier; 2009.
33. Holt DR, Kirk SJ, Regan MC, Hurson M, Lindblad WJ, Barbul A. Effect of age on wound healing in healthy human beings. *Surgery.* 1992;112(2):293-7.
34. Sussman C, Bates-Jensen B. *Wound care: a collaborative practice manual.* 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007. 53-8.
35. Watson NFS, Hodgkin W. Wound dressings. *Surgery* 2005;23(2):52-5.
36. Feldman DL, Rogers A, Karpinski RHS. A prospective trial comparing biobrane duoderm and xeroform for skin graft donor sites. *Surgery Gynecology & Obstetrics.* 1991;173(1):1-5.

37. Altman GH, Diaz F, Jakuba C, Calabro T, Horan RL, Chen J, et al. Silk-based biomaterials. *Biomaterials*. 2003;24:401-16.
38. Mondal M, Trivedy K, Kumar SN. The silk proteins, sericin and fibroin in silkworm, *Bombyx mori* Linn., - a review. *Caspian J Env Sci*. 2007;5(2):63-76.
39. Patel R, Modasiya MK. Sericin: Pharmaceutical Applications *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences* 2011;2(3):913-7.
40. Padamwar MN, Pawar AP. Silk sericin and its applications: A review. *J Sci Ind Res*. 2004;63:323-9.
41. Vaithanomsat P, Punyasawon C. Production of water-soluble silk powder from *Bombyx mori* Linn. (Nang-Noi Srisakate 1). *Kasetsart J (Nat Sci)*. 2006;40:152-8.
42. Shimura K, Kikuchi A, Ohtomo K, Katagata Y, Hyodo A. A. Studies on silk fibroin of *Bombyx mori*. I. fractionation of fibroin prepared from the posterior silk gland. *Journal of Biochemistry*. 1976;80(4):693-702.
43. Rockwood DN, Preda RC, YuceI T, Wang X, Lovett ML, Kaplan DL. Materials fabrication from *Bombyx mori* silk fibroin. *Nature protocols*. 2011;6(10):1612-31.
44. Levin B, Redmond SL, Rajkhowa R, Eikelboom RH, Atlas MD, Marano RJ. Utilising silk fibroin membranes as scaffolds for the growth of tympanic membrane keratinocytes, and application to myringoplasty surgery. *The Journal of Laryngology & Otology*. 2013;127:S13-S20.
45. Mandal BB, Kundu SC. Cell proliferation and migration in silk fibroin 3D scaffolds. *Biomaterials*. 2009;30:2956-65.
46. Chomchalao P, Pongcharoen S, Sutheerawattananonda M, Tiyaboonchai W. Fibroin and fibroin blended three-dimensional scaffolds for rat chondrocyte culture. *BioMedical Engineering Online*. 2013;12(28):1-12.
47. Sakabe H, Ito H, Miyamoto T, Noishiki Y, Ha WS. In vivo blood compatibility of regenerated silk fibroin. *Sen-I Gakkaishi*. 1989;45(11):487-90.
48. Santin M, Motta A, Freddi G, Cannas M. In vitro evaluation of the inflammatory potential of the silk fibroin. *J Biomed Mater Res*. 1999;46(3):382-9.

49. Tungtasana H, Shuangshoti S, Shuangshoti S, Kanokpanont S, Kaplan DL, Bunaprasert T, et al. Tissue response and biodegradation of composite scaffolds prepared from Thai silk fibroin, gelatin and hydroxyapatite. *J Mater Sci: Mater Med.* 2010;21:3151-62.
50. Jeong L, Kim MH, Jung J-Y, Min BM, Park WH. Effect of silk fibroin nanofibers containing silver sulfadiazine on wound healing. *Int J Nanomedicine.* 2014;9:5277-87.
51. Padol AR, Jayakumar K, Shridhar NB, Swamy HDN, Mohan K, S M. Efficacy of the silk protein based biofilms as a novel wound healing agent. *International Journal of Toxicology and Applied Pharmacology.* 2012;2(3):31-6.
52. Roh D-H, Kang S-Y, Kim J-Y, Kwon Y-B, Kweon HY, Lee K-G, et al. Wound healing effect of silk fibroin/alginate-blended sponge in full thickness skin defect of rat. *J Mater Sci: Mater Med.* 2006;17:547-52.
53. Sothornvit R, Chollakup R, Suwanruji P. Extracted sericin from silk waste for film formation. *Songklanakarin J Sci Technol.* 2010;32(1):17-22.
54. Kitisin T, Maneekan P, Luplertlop N. In-vitro Characterization of Silk Sericin as an Anti-aging Agent. *J Agr Sci.* 2013;5(3):54-62.
55. Padamwar MN, Pawar AP, Daithankar AV, Mahadik KR. Silk sericin as a moisturizer: an in vivo study. *J Cosmet Dermatol.* 2005;4:250-7.
56. Zhaorigetu S, Sasaki M, Watanabe H, Kato N. Supplemental silk protein, sericin, suppresses colon tumorigenesis in 1,2- dimethylhydrazine-treated mice by reducing oxidative stress and cell proliferation. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2001;65(10):2181-6.
57. Hunt TK. Disorders of wound healing. *World J Surg.* 1980;4:271-7.
58. Aramwit P, Kanokpanont S, De-Eknamkul W, Kamei K, Srichana T. The effect of sericin with variable amino-acid content from different silk strains on the production of collagen and nitric oxide. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2009;20(9):1295-306.
59. Terada S, Nishimura T, Sasaki M, Yamada H, Miki M. Sericin, a protein derived from silkworms, accelerates the proliferation of several mammalian cell lines including a hybridoma. *Cytotechnology.* 2002;40:3-12.

60. Chirila TV, Suzuki S, Bray LJ, Barnett NL, Harkin DG. Evaluation of silk sericin as a biomaterial: in vitro growth of human corneal limbal epithelial cells on Bombyx mori sericin membranes. *Progress in Biomaterials*. 2013;2(14):1-10.
61. Motta A, Barbato B, Foss C, Torricelli P, Migliaresi C. Stabilization of Bombyx mori silk fibroin/sericin films by crosslinking with PEG-DE 600 and genipin. *J Bioact Compat Pol*. 2011;26(2):130-43.
62. Xie R-j, Li M-z, Lu S-z, Sheng W-h, Xie Y-f. Preparation of Sericin Film and Its Cytocompatibility. *Key Eng Mat*. 2005;342-343:241-4.
63. Aramwit P, Siritienthong T, Srichana T, Ratanavaraporn J. Accelerated healing of full-thickness wounds by genipin-crosslinked silk sericin/PVA scaffolds. *Cells Tissues Organs* 2013;197:224-38.
64. Nayak S, Kundu SC. Sericin-carboxymethyl cellulose porous matrices as cellular wound dressing material. *J Biomed Mater Res*. 2014;102A:1928-40.
65. Siritienong T, Ratanavaraporn J, Srichana T, aramwit P. Preliminary characterization of genipin-cross-linked silk sericin/poly(vinyl alcohol) films as two-dimensional wound dressings for the healing of superficial wounds. *Biomed Res Int*. 2013;2013:1-13.
66. Nagai N, Murao T, Ito Y, Okamoto N, Sasaki M. Enhancing effects of sericin on corneal wound healing in rat debrided corneal epithelium. *Biol Pharm Bull*. 2009;32(5):933-6.
67. Nagai N, Murao T, Ito Y, Okamoto N, Sasaki M. Enhancing effects of sericin on corneal wound healing in Otsuka Long- Evans Tokushima Fatty rats as a model of human type 2 diabetes. *Biol Pharm Bull*. 2009;32(9):1594-9.
68. Aramwit P, Sangcakul A. The effects of sericin cream on wound healing in rats. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2007;71(10):2473-7.
69. Aramwit P, Palapinyo S, Srichana T, Chottanapund S, Muangman P. Silk sericin ameliorates wound healing and its clinical efficacy in burn wounds. *Arch Dermatol Res*. 2013;305:585-94.

70. Thornton JF, Gosman AA. Skin grafts and skin substitutes and principles of flaps. *SRPS*. 2004;10(1):2-77.
71. Andreassi A, Bilenchi R, Biagioli M, D'Aniello C. Classification and pathophysiology of skin grafts. *Clinics in Dermatology*. 2005;23:332-7.
72. Kottner J, Lichterfeld A, Blume-Peytavi U. Transepidermal water loss in young and aged healthy humans: a systematic review and meta-analysis. *Arch Dermatol Res*. 2013;305:315-23.
73. Miteva M, Richter S, Elsner P, Fluhr JW. Approaches for optimizing the calibration standard of Tewameter TM 300. *Exp Dermatol*. 2006;15:904-12.
74. Dini V, Salibra F, Brilli C, Romanelli M. Instrumental evaluation of the protective effects of a barrier film on surrounding skin in chronic wounds. *Wounds* 2008;20(9):254-7.
75. Na J-I, Choi J-W, Choi H-R, Jeong J-B, Park K-C, Youn S-W, et al. Rapid healing and reduced erythema after ablative fractional carbon dioxide laser resurfacing combined with the application of autologous platelet-rich plasma. *Dermatol Surg*. 2011;37:463-8.
76. Silverman RA, Lender J, Elmets CA. Effects of occlusion and semioclusive dressings on the return of barrier function to transepidermal water loss in standardized human wounds. *J Am Acad Dermatol*. 1989;20(5):755-60.
77. Atiyeh BS, Al-Amm CA, El-Musa KA, Sawwaf A, Dham R. The effect of moist and moist exposed dressings on healing and barrier function restoration of partial thickness wounds. *Eur J Plast Surg*. 2003;26:5-11.
78. Park ES, Na JI, Kim SO, Huh CH, Youn SW, Park KC. Application of a pigment measuring device - Mexameter - for the differential diagnosis of vitiligo and nevus depigmentosus. *Skin Res Technol*. 2006;12(4):298-302.
79. Clarys P, Alewaeters K, Lambrecht R, Barel AO. Skin color measurements: comparison between three instruments: the Chromameter, the DermaSpectrometer and the Mexameter. *Skin Res Technol*. 2000;6(4):230-8.

80. Takada A, Okamura T, Morimoto M, Takahashi S-i, Yamane G-y. Objective assessment of patch test in metal allergy with a murine model of delayed type hypersensitivity. *J Jpn Stomatol Soc.* 2007;56(2):226-33.
81. Takada A, Fujimoto M, Ukichi K-i, Morimoto M, Tonogi M, Yamane G-y, et al. Objective Assessment of erythema caused by metal patch testing using an erythema index meter. *Oral Sci Int.* 2010;7(2):56-65.
82. Davis EC, Callender VD. Postinflammatory hyperpigmentation a review of the epidemiology, clinical features, and treatment options in skin of color. *J Clin Aesthet Dermatol.* 2010;3(7):20-31.
83. Wal Mvd, Bloemen M, Verhaegen P, Tuinebreijer W, Vet Hd, Zuijlen Pv, et al. Objective color measurements: clinimetric performance of three devices on normal skin and scar tissue. *J Burn Care Res.* 2013;34(3):e187-94.
84. McNamee PM, Api AM, Basketter DA, Gerberick GF, Gilpin DA, Hall BM, et al. A review of critical factors in the conduct and interpretation of the human repeat insult patch test. *Regulatory Toxicology and Pharmacology.* 2008;52:24-34.
85. Smith W. Repeated insult patch test. *Dermac laboratory Dermatological and Hair Care Research*, 2004.
86. Paocharoen V, Mingphreudhi S, Lertsithichai P, Euanorasetr C. Preoperative serum albumin level and postoperative septic complications. *Thai J Surg.* 2003;24:29-32.
87. Jekel JF, Katz DL, Elmore JG, Wild D. *Epidemiology, Biostatistics and Preventive Medicine.* 3 ed. Philadelphia: Elsevier; 2007.
88. Huskisson EC. Measurement of pain. *The Lancet.* 1974:1127-31.
89. Innes ME, Umraw N, Fish JS, Gomez M, Cartotto RC. The use of silver coated dressings on donor site wounds: a prospective, controlled matched pair study. *Burns.* 2001;27:621-7.
90. Voineskos SH, Ayeni OA, McKnight L, Thoma A. Systematic Review of Skin Graft Donor-Site Dressings. *Plast Reconstr Surg.* 2009;124(1):298-306.

91. Siritientong T. Clinical efficacy of wound dressing containing silk sericin for split-thickness skin graft donor site treatment. Bangkok: Chulalongkorn University; 2013.
92. Kim H-O, Kim B-G, Shin J-W, Huh S-Y, Youn S-W, Hun C-H, et al. Change of skin color after application of topical anesthetic cream. *J Dermatol Treat*. 2009;20(6):376-7.
93. Kligman AM, Epstein W. Updating the maximization test for identifying contact allergens. *Contact Dermatitis*. 1975;1(4):231-9.
94. Dykes PJ. The effect of adhesive dressing edges on cutaneous irritancy and skin barrier function. *J Wound Care*. 2007;16(3):97-100.
95. Weber RS, Hankins P, Limitone E, Callender D, Frankenthaler RM, Wolf P, et al. Split-thickness skin graft donor site management: a randomized prospective trial comparing a hydrophilic polyurethane absorbent foam dressing with a petrolatum gauze dressing. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 1995;121:1145-9.
96. Madden MR, Nolan E, Finkelstein JL, Yurt RW, Smeland J, Goodwin CW, et al. Comparison of an occlusive and a semi-occlusive dressing and the effect of the wound exudate upon keratinocyte proliferation. *J Trauma*. 1989;29(7):924-31.
97. Tabata Y, Ikada Y. Protein release from gelatin matrices. *Adv Drug Deliv Rev*. 1998;31(3):287-301.
98. Panzavolta S, Gioffre M, Focarete ML, Gualandi C, Foroni L, Bigi A. Electrospun gelatin nanofibers: optimization of genipin cross-linking to preserve fiber morphology after exposure to water. *Acta Biomater*. 2011;7(4):1702-9.
99. Jin G, Li Y, Prabhakaran MP, Tian W, Ramakrishna S. In vitro and in vivo evaluation of the wound healing capability of electrospun gelatin/PLLCL nanofibers. *J Bioact Compat Pol*. 2014;29(6):628-45.
100. Bindu H, M V, K K, T.P. S, R.V. SK. Preparation and evaluation of chitosan-gelatin composite films for wound healing activity. *Trends Biomater Artif Organs*. 2010;24(3):123-30.
101. Field CK, Kerstein MD. Overview of wound healing in a moist environment. *Am J Surg*. 1994;167(1A (Suppl)):2S-6S.

102. Hasatsri S, Angspatt A, aramwit P. Randomized clinical trial of the innovative bilayered wound dressing made of silk and gelatin: safety and efficacy tests using a split-thickness skin graft model. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2015;1-8.
103. Flanagan M. *Wound healing and skin integrity: principles and practice*. West Sussex: John Wiley & Sons; 2013.
104. Wilhelm K-P, Cua AB, Maibach HI. Skin Aging. *Arch Dermatol*. 1991;127:1806-9.
105. Luebberding S, Krueger N, Kerscher M. Age-related changes in skin barrier function - Quantitative evaluation of 150 female subjects. *Int J Cosmet Sci*. 2013;35:183-90.
106. Atiyeh BS, El-Musa KA, Dham R. Scar quality and physiologic barrier function restoration after moist and moist-exposed dressings of partial-thickness wounds. *Dermatol Surg*. 2003;29(1):14-20.
107. Myers JA, Millikan KW, Saclarides TJ. *Common Surgical Diseases*. 2 ed. New York: Springer; 2008.
108. C LJ. The treatment of small burns with a chlorhexidine-medicated tulle gras. *Burns*. 1977;3(4):239-44.
109. Hutchinson JJ, McGuckin M. Occlusive dressings: A microbiologic and clinical review. *Am J Infect Control*. 1990;18(4):257-68.
110. Varghese MC, Balin AK, Carter DM, Caldwell D. Local environment of chronic wounds under synthetic dressings. *Arch Dermatol*. 1986;122(1):52-7.
111. Ayello EA, Carville K, Fletcher J, Keast D, Leaper D, Lindholm C, et al. *Appropriate use of silver dressings in wounds*. London: Kathy Day; 2012. 2.
112. Parrish CR. Serum proteins as markers of nutrition: What are we treating? *Pract Gastroenterol*. 2006;43:46-64.
113. Lobo DN, Stanga Z, Simpson JAD, Anderson JA, Rowlands BJ, Allison SP. Dilution and redistribution effects of rapid 2-litre infusions of 0.9% (w/v) saline and 5% (w/v) dextrose on haematological parameters and serum biochemistry in normal subjects: a double-blind crossover study. *Clin Sci*. 2001;101:173-9.

114. Sugino H, Hashimoto I, Tanaka Y, Ishida S, Abe Y, Nakanishi H. Relation between the serum albumin level and nutrition supply in patients with pressure ulcers : retrospective study in an acute care setting. *J Med Invest*. 2014;61:15-21.
115. Holzle E, Plewig G. Effects of dermatitis, stripping, and steroids on the morphology of corneocytes. a new bioassay. *J Invest Dermatol*. 1977;68(6):350-6.
116. Guz NV, Gaikwad RM, Dokukin ME, Sokolov I. A novel in vitro stripping method to study geometry of corneocytes with fluorescent microscopy: example of aging skin. *Skin Res Technol*. 2009;15:379-83.
117. Lee S, Park Y-K, Kang JS. The experimental study on corneocytes of chronically irritated skin (II). *Yonsei Med J*. 1982;23(1):80-3.





APPENDICES

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

Appendix A



Protocol Review No. 12-33-013

Study Protocol Approval

The Ethics Committee of The Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand has approved the following study to be carried out according to the protocol dated and/ or amended as follows:

Study Title: Safety of the silk fibroin woven fabric with bioactive coating layer in healthy volunteers

Study Code: -

Centre: CHULALONGKORN UNIVERSITY

Principal Investigator : Pornanong Aramwit, Pharm.D., Ph.D.

A list of the Ethics Committee members and positions present at the Ethics Committee meeting on the date of approval of this study has been attached.

This Study Protocol Approval Form will be forwarded to the Principal Investigator.

Chairman of Ethics Committee:
Parkpoom Tengamnuay
 (Parkpoom Tengamnuay, Ph.D.)

Secretary of Ethics Committee:
Suyanee Pongthananikorn
 (Suyanee Pongthananikorn, Ph.D.)

Date of Approval: July 18, 2012

Date of Approval Expiration: July 18, 2013

Appendix B

คำชี้แจง

เอกสารข้อมูลคำอธิบาย/ คำชี้แจงสำหรับอาสาสมัครที่เข้าร่วมการวิจัย

(Patient or Participant Information Sheet)

ชื่อโครงการศึกษาวิจัยเรื่อง (ภาษาไทย)	ความปลอดภัยของแผ่นโปรตีนเส้นไหมเคลือบด้วยสารมี ฤทธิ์ทางชีวภาพในอาสาสมัครสุขภาพดี
(ภาษาอังกฤษ)	SAFETY OF THE SILK FIBROIN WOVEN FABRIC WITH BIOACTIVE COATING LAYER IN HEALTHY VOLUNTEERS
ชื่อผู้วิจัยหลัก (ภาษาไทย)	รศ. ดร. พรอนงค์ อร่ามวิทย์
(ภาษาอังกฤษ)	Associate Professor Pornanong Aramwit, Pharm.D., Ph.D.
หน่วยงานที่ทำการศึกษาวิจัย	คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
โทรศัพท์ (สามารถติดต่อได้ 24 ชั่วโมง)	089-921-7255

ท่านได้รับเชิญให้เข้าร่วมการศึกษาวิจัยเรื่อง ความปลอดภัยของแผ่นโปรตีนเส้นไหมเคลือบด้วยสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพในอาสาสมัครสุขภาพดี ก่อนที่ท่านจะตัดสินใจให้ความยินยอมเข้าร่วมการศึกษาวิจัยนี้ ผู้วิจัยใคร่ขอชี้แจงรายละเอียดของโครงการวิจัยให้ท่านทราบ และขอให้ท่านทำความเข้าใจขั้นต้นตอนที่ผู้วิจัยจะขอให้ท่านปฏิบัติ ขั้นตอนนี้เป็น “กระบวนการให้คำยินยอม” ก่อนเริ่มดำเนินการวิจัย ผู้วิจัยจะขอทำการคัดกรองว่าท่านมีความเหมาะสมที่จะเข้าร่วมการวิจัยหรือไม่ โดยจะตรวจสุขภาพผิวหน้าและซักถามข้อมูลต่าง ๆ เพื่อดูว่าท่านมีคุณสมบัติหรือสุขภาพดีตามเกณฑ์คัดเลือกเข้าร่วมการวิจัย หากท่านผ่านการตรวจคัดกรองแล้วพบว่าท่านมีความเหมาะสมที่จะเข้าร่วมการวิจัย ผู้วิจัยจะดำเนินการเป็นขั้นตอนดังจะชี้แจงให้ทราบต่อไป

กรุณาอ่านข้อมูลต่อไปนี้ด้วยความรอบคอบ และสอบถามถึงข้อสงสัยต่างๆ โดยไม่ลังเล

1. บทนำ

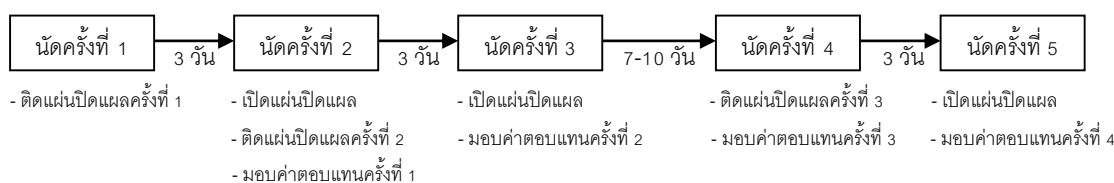
โครงการวิจัยนี้เป็นการศึกษาเชิงคลินิก เพื่อประเมินความปลอดภัยของแผ่นโปรตีนเส้นไหมเคลือบด้วยสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพในอาสาสมัครสุขภาพดี จำนวนผู้เข้าร่วมโครงการวิจัย 112 คน

2. วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อประเมินความปลอดภัยของแผ่นโปรตีนเส้นไหมเคลือบด้วยสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพในอาสาสมัครสุขภาพดี โดยการตรวจวัดระดับความแดงและความดำของผิวหนัง และประเมินสภาพผิวหนังที่สัมผัสกับแผ่นเนื้อเยื่อตัวอย่างโดยแพทย์ผิวหนัง ก่อนและหลังใช้

3. วิธีการศึกษาวิจัย

หากท่านตกลงเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้และผ่านเกณฑ์การคัดเลือกเข้าตามกำหนดอันได้แก่ มีอายุระหว่าง 18-65 ปี สามารถปฏิบัติตามแผนงานวิจัยได้และสามารถพบผู้วิจัยตามนัดหมายได้สม่ำเสมอ โดยไม่มีภาวะผิวหนังเรื้อรังเช่น สะเก็ดเงิน ผิวหนังอักเสบ อีกทั้งยังต้องไม่เป็นโรคภูมิคุ้มกันบกพร่องหรือใช้ยากดภูมิคุ้มกัน, ใช้ยาต้านฮิสตามีนหรือยาแก้แพ้ชนิดสเตียรอยด์ภายใน 2 สัปดาห์ก่อนเข้าร่วมวิจัย นอกจากนี้ยังต้องไม่มีประวัติแพ้โปรตีนกาวไหมหรือโปรตีนเส้นไหม ผู้วิจัยจะขอบันทึกข้อมูลทั่วไปของท่าน ตรวจระดับความแดงและความดำของผิวหนังบริเวณแผ่นหลังด้วยเครื่องมือเฉพาะ และถ่ายภาพผิวหนังก่อนเริ่มการวิจัย จำนวนผู้เข้าร่วมการวิจัยนี้ คาดว่าจะมี 112 คน ซึ่งทุกคนจะได้รับการติดแผ่นโปรตีนเส้นไหมเคลือบด้วยสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพ และแผ่นปิดแผลตามห้องตลาดบริเวณแผ่นหลัง อย่างละ 1 แผ่น ทิ้งไว้ 3 วัน จากนั้นนัดครั้งที่ 2 จะเปลี่ยนแผ่นปิดแผล และทิ้งไว้อีก 3 วัน ต่อจากนั้นเว้นระยะประมาณ 7 - 10 วัน ก่อนจะติดแผ่นปิดแผลทั้งสองชนิดที่ตำแหน่งเดิมซ้ำอีกครั้ง โดยทุกครั้งที่มีการเปลี่ยนแผ่นปิดแผล ผู้วิจัยจะตรวจระดับความแดงและความดำของผิวหนังด้วยเครื่องมือเฉพาะ ถ่ายภาพผิวหนังภายใน 30 นาที หลังเปิดแผ่นปิดแผล เพื่อนำไปประเมินสภาพผิวโดยแพทย์ผู้เชี่ยวชาญด้านผิวหนัง โดยในแต่ละครั้งที่อาสาสมัครมาตามนัดจะใช้เวลาทั้งสิ้นประมาณ 30 นาที



4. ความเสี่ยง ความไม่สบาย และผลข้างเคียงที่อาจเกิดขึ้น

ท่านมีโอกาสแพ้โปรตีนกาวไหมหรือโปรตีนเส้นไหม อย่างไรก็ตามการศึกษาวินิจฉัยนี้มีการติดตามการรักษาโดยแพทย์ผู้เชี่ยวชาญด้านผิวหนังตลอดระยะเวลาวิจัย จึงมีการเฝ้าระมัดระวังเหตุการณ์ไม่พึงประสงค์อย่างต่อเนื่องและใกล้ชิดจนจบการวิจัย หากพบอาการไม่พึงประสงค์เกิดขึ้น แผ่นตัวอย่างจะถูกนำออกและท่านจะได้รับการรักษาโดยใช้ยาสเตียรอยด์ทาบริเวณที่เกิดการแพ้ประมาณ 1 สัปดาห์

5. ผลประโยชน์ที่อาจจะได้รับ

ท่านจะไม่ได้รับประโยชน์ใดๆ จากการศึกษานี้โดยตรง แต่ผลการศึกษาจะเป็นการยืนยันความปลอดภัยของแผ่นโปรตีนเส้นไหมเคลือบด้วยสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพในการเป็นอีกทางเลือกหนึ่งให้กับผู้ป่วยที่มีบาดแผลบริเวณผิวหนัง เนื่องจากเป็นแผ่นปิดแผลที่สามารถผลิตได้เองโดยวัสดุในประเทศ รวมถึงเพิ่มมูลค่าทั้งทางเศรษฐกิจ สังคมและสิ่งแวดล้อมของประเทศไทยต่อไป

6. ทางเลือกอื่นในการรักษา

ไม่มี

7. ค่าใช้จ่ายและค่าชดเชย

เพื่อแสดงความขอบคุณที่ท่านได้เสียสละเข้าร่วมงานวิจัย รวมถึงให้ความร่วมมือตลอดระยะเวลาวิจัย ผู้วิจัยจะขอมอบค่าตอบแทน 800 บาทแก่ท่าน โดยท่านจะได้รับค่าตอบแทนครั้งละ 200 บาทในการนัดครั้งที่ 2, 3, 4 และ 5

8. เงินชดเชยสำหรับการบาดเจ็บหรืออันตรายที่อาจเกิดขึ้น

กรณีที่ท่านเกิดเหตุการณ์ไม่พึงประสงค์ในระหว่างการศึกษา ท่านจะได้รับการดูแลรักษาอย่างใกล้ชิดจากแพทย์ผู้เชี่ยวชาญด้านผิวหนังจนหายสนิท โดยผู้วิจัยจะเป็นผู้รับผิดชอบค่าใช้จ่ายทั้งหมดอันได้แก่ค่ารักษาพยาบาล การชดเชยรายได้ที่สูญเสียไประหว่างการรักษาพยาบาลดังกล่าว ตลอดจนเงินทดแทนความพิการที่อาจเกิดขึ้น

9.สิทธิในการถอนตัวออกจากการศึกษาวิจัย

ท่านมีสิทธิในการถอนตัวออกจากการศึกษาวิจัยเมื่อใดก็ได้ โดยไม่มีผลกระทบใดๆ ทั้งสิ้น

10.การรักษาความลับของบันทึกทางการแพทย์ และข้อมูลการศึกษาวิจัย

ข้อมูลทุกอย่างของท่านจะเก็บเป็นความลับในตู้เอกสารซึ่งคณะผู้วิจัยเท่านั้นที่สามารถนำมาใช้ได้ การรายงานผลการวิจัยจะเป็นภาพรวม และนำเสนอเป็นรหัสรายบุคคล ไม่มีข้อมูลส่วนหนึ่งส่วนใดที่เป็นการระบุถึงตัวท่าน

11.การเปิดเผยข้อมูลการศึกษาวิจัย

ผู้ที่มีสิทธิเข้าถึงข้อมูลการวิจัย ได้แก่ ภาญ.สุคนธา หาสาสน์ศรีและ รศ. ดร. พรอนงค์ อร่ามวิทย์ ซึ่งเป็นผู้วิจัยในโครงการนี้เท่านั้น

12.การสอบถามข้อสงสัย

ชื่อผู้วิจัยที่สามารถติดต่อได้ คือ รศ. ดร. พรอนงค์ อร่ามวิทย์ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย หมายเลขโทรศัพท์ที่ติดต่อได้สะดวก คือ 089-921-7255 (ตลอด 24 ชั่วโมง) หรือ 02-218-8409 หรือ ภาญ.สุคนธา หาสาสน์ศรี คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย หมายเลขโทรศัพท์ที่ติดต่อได้สะดวก คือ 089-944-9191 (ตลอด 24 ชั่วโมง) หรือ 02-218-8403 และหากผู้วิจัยไม่ปฏิบัติตามที่ชี้แจงในเอกสารข้อมูลคำอธิบาย ท่านสามารถร้องเรียนมายัง คณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการศึกษาวิจัยในมนุษย์ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โทร 02-218-8256

Appendix C

หนังสือแสดงความยินยอม

(Consent Form)

การศึกษาวิจัยเรื่อง ความปลอดภัยของแผ่นโปรตีนเส้นไหมเคลือบด้วยสารมีฤทธิ์ทาง
(ภาษาไทย) ชีวภาพในอาสาสมัครสุขภาพดี
(ภาษาอังกฤษ) SAFETY OF THE SILK FIBROIN WOVEN FABRIC WITH
BIOACTIVE COATING LAYER IN HEALTHY VOLUNTEERS
วันที่คำยินยอม วันที่..... เดือน..... พ.ศ.

ข้าพเจ้า (นาย/ นาง/ นางสาว) นามสกุล
อยู่บ้านเลขที่ ซอย ถนน
แขวง/ ตำบล เขต/ อำเภอ
จังหวัด รหัสไปรษณีย์

ก่อนที่จะลงนามในใบยินยอมให้ทำการวิจัยนี้ ข้าพเจ้าได้รับเอกสารข้อมูลคำอธิบาย/ คำชี้แจงสำหรับอาสาสมัครที่เข้าร่วมการวิจัย จากผู้วิจัยให้ทราบถึงวัตถุประสงค์ของการวิจัย วิธีวิจัย อันตรายหรืออาการข้างเคียงที่อาจเกิดขึ้นจากการวิจัยหรือจากแผ่นโปรตีนเส้นไหมเคลือบด้วยสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ใช้ รวมทั้งประโยชน์ที่เกิดขึ้นจากการวิจัยอย่างละเอียด และมีความเข้าใจดีแล้ว

ผู้วิจัยได้ตอบคำถามต่างๆ ที่ข้าพเจ้าสงสัยด้วยความเต็มใจ ไม่ปิดบัง ซ่อนเร้น จนข้าพเจ้าพอใจ

ข้าพเจ้าเข้าร่วมโครงการนี้ด้วยความสมัครใจและมีสิทธิที่จะบอกเลิกการเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้เมื่อใดก็ได้โดยการบอกเลิกจะไม่มีผลต่อการรักษาที่ข้าพเจ้าจะได้รับต่อไป

ผู้วิจัยรับรองว่า “จะเก็บข้อมูลเฉพาะเกี่ยวกับตัวข้าพเจ้าไว้เป็นความลับ และจะเปิดเผยได้เฉพาะในรูปที่เป็นสรุปผลการวิจัย” เท่านั้น

ในการวิจัยครั้งนี้ ข้าพเจ้ายอมให้ผู้วิจัยติดแผ่นโปรตีนเส้นไหมเคลือบด้วยสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผิวหนังปกปิดบริเวณแผ่นหลังของข้าพเจ้า ณ จุดที่กำหนดโดยเปลี่ยนทุก 3 วัน ติดต่อกัน 2 ครั้ง เว้นระยะเวลาประมาณ 1 สัปดาห์ และทำซ้ำอีก 1 รอบ เพื่อประเมินลักษณะของผิวหนังหลัง

สัมผัสกับแผ่นเนื้อเยื่อดังกล่าว สารชนิดต่าง ๆ ที่อยู่ในแผ่นโปรตีนเส้นไหมเคลือบด้วยสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพนั้นเป็นสารที่อนุญาตให้ใช้ในเครื่องสำอางได้โดยไม่เกิดอันตรายกับผิวหนัง แต่สำหรับบางคนซึ่งมีผิวหนังที่แพ้ง่ายอาจจะเกิดอาการระคายเคืองหรือเกิดผื่นแพ้ได้ ผู้วิจัยรับรองว่า หากเกิดอันตรายใดๆ จากการวิจัยดังกล่าว ข้าพเจ้าจะได้รับการรักษาพยาบาลโดยไม่คิดมูลค่า และจะได้รับการชดเชยรายได้ที่สูญเสียไประหว่างการรักษาพยาบาลดังกล่าว ตลอดจนเงินทดแทนความพิการที่อาจจะเกิดขึ้น หากมีข้อสงสัยใด ๆ ข้าพเจ้าสามารถติดต่อได้ที่ 089-921-7255 โดยบุคคลที่รับผิดชอบเรื่องนี้ รศ.ดร.พรอนงค์ อร่ามวิทย์ หรือสามารถติดต่อได้ที่ ภ.ญ.สุคนธา หาสาสน์ศรี หมายเลขโทรศัพท์ 089-944-9191 ตลอดการวิจัย

นอกจากนี้ข้าพเจ้าอาจเสียเวลาเพียงเล็กน้อยในการตอบคำถาม

ข้าพเจ้าได้อ่านข้อความข้างต้นแล้ว และมีความเข้าใจดีทุกประการ จึงได้ลงนามในใบยินยอมนี้ด้วยความเต็มใจ

พร้อมนี้ข้าพเจ้าได้รับสำเนาเอกสารแสดงความยินยอมเข้าร่วมการวิจัยที่ข้าพเจ้าได้ลงนามและวันที่แล้วและเอกสารข้อมูลคำอธิบายสำหรับผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยแล้ว 1 ชุด

ลงนาม ผู้ให้ความยินยอม

(.....) ชื่อตัวบรรจง

ลงนาม ผู้รับผิดชอบการวิจัย

(.....) ชื่อตัวบรรจง

ลงนาม พยาน

(.....) ชื่อตัวบรรจง

ลงนาม พยาน

(.....) ชื่อตัวบรรจง

หมายเหตุ ในกรณีที่ผู้เข้าร่วมการวิจัยไม่สามารถอ่านออกเขียนได้ จะให้ใช้พิมพ์ลายนิ้วมือ โดยมีพยานลงนาม 2 คน

Appendix D

แบบบันทึกข้อมูลพื้นฐานของอาสาสมัครเรื่อง
ความปลอดภัยของแผ่นโปรตีนเส้นไหมเคลือบด้วยสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพในอาสาสมัครสุขภาพดี


ข้อมูลพื้นฐานอาสาสมัคร หมายเลขที่ □□□
เพศ <input type="checkbox"/> 1. ชาย <input type="checkbox"/> 2. หญิง
อายุ.....ปี วัน/เดือน/ปี เกิด วันที่.....เดือน.....ปี.....
น้ำหนักตัว กิโลกรัม
ความสูง..... เซนติเมตร
ประวัติโรคประจำตัว <input type="checkbox"/> 1. มี ระบุ..... ยาที่ใช้รักษา
<input type="checkbox"/> 2. ไม่มี (ปฏิเสธโรคประจำตัว)
อาชีพที่ทำเป็นประจำ <input type="checkbox"/> 1. ว่างาน <input type="checkbox"/> 2. แม่บ้าน/พ่อบ้าน <input type="checkbox"/> 3. ผู้ใช้แรงงาน/รับจ้าง <input type="checkbox"/> 4. นักเรียน/นักศึกษา <input type="checkbox"/> 5. ข้าราชการ <input type="checkbox"/> 6. พนักงานรัฐวิสาหกิจ <input type="checkbox"/> 7. พนักงานบริษัท <input type="checkbox"/> 8. ค้าขาย/ธุรกิจส่วนตัว <input type="checkbox"/> 9. อื่นๆ (ระบุ).....

Appendix E

Repeated insult patch test scoring scale

Grade	Type of response
0	No evidence of any effect
0.5	(Barely perceptible) minimal faint (light pink) uniform or spotty erythema
1	(Mild) pink uniform erythema covering most of contact site
2	(Moderate) pink/red erythema visibly uniform in entire contact area
3	(Marked) bright red erythema with accompanying edema, petechiae or papules
4	(Severe) deep red erythema with vesiculation or weeping with or without edema

Appendix F



COA No. 506/2013
IRB No. 184/56

INSTITUTIONAL REVIEW BOARD
Faculty of Medicine, Chulalongkorn University
1873 Rama 4 Road, Patumwan, Bangkok 10330, Thailand, Tel 662-256-4493 ext 14, 15

Certificate of Approval

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

Study Title : Clinical efficacy of wound dressing containing silk fibroin woven fabric with bi-active coating layer versus medicated paraffin gauze dressing in the treatment of split-thickness skin graft donor sites.

Study Code : -

Principal Investigator : Miss Sukhontha Hasatsri, RPh.

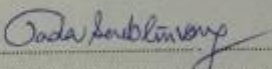
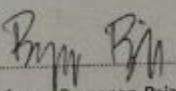
Affiliation of PI : Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University.

Review Method : Expert board.

Continuing Report : At least once annually or submit the final report.

Document Reviewed :

1. Research Proposal Version 3, Dated 18 July 2013
2. Protocol Synopsis Version 2, Dated 27 June 2013
3. Information sheet for research participant Version 2 Dated 27 June 2013
4. Informed Consent Form Version 2 Dated 27 June 2013
5. Appendix A: Case report form version 3, Dated 18 July 2013
6. Appendix B: Follow up report version 3, Dated 18 July 2013
7. Curriculum Vitae Version 1, 27 June 2013

Signature:  **Signature:** 

(Emeritus Professor Tada Suebthong MD) (Assistant Professor Prapapan Rajatapiti MD, PhD)

Chairperson **Member and Secretary**

The Institutional Review Board **Secretary The Institutional Review Board**

Date of Approval : July 30, 2013

Approval Expire Date : July 29, 2014

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

Appendix G

เอกสารข้อมูลคำอธิบายสำหรับผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย (Information sheet for research participant)

ชื่อโครงการวิจัย ประสิทธิภาพทางคลินิกของแผ่นปิดแผลผสมโปรตีนเส้นไหมเคลือบด้วยสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพเทียบกับแผ่นปิดแผลชนิดผ้ากอซตาข่ายเคลือบพาราฟินแบบมียา ในการรักษาบาดแผลจากการปลูกถ่ายผิวหนังที่มีหนังแท้เหลืออยู่บางส่วน

ผู้สนับสนุนการวิจัย คือ สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน)

ผู้ทำวิจัย

1. ชื่อ รงศาสตราจารย์ ดร.พรอนงค์ อร่ามวิทย์
ที่อยู่ ภาควิชาเภสัชกรรมปฏิบัติ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ถนนพญาไท แขวงปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330
เบอร์โทรศัพท์ 02-218-8409, 089-921-7255
(ที่ทำงานและมือถือ)
2. ชื่อ เกสัชกรหญิง สุคนธา หาสาสน์ศรี นิสิตปริญญาเอก
ภาควิชาเภสัชกรรมปฏิบัติ
ที่อยู่ ภาควิชาเภสัชกรรมปฏิบัติ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ถนนพญาไท แขวงปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330
เบอร์โทรศัพท์ 089-944-9191
(มือถือ)

แพทย์ผู้ร่วมในโครงการวิจัย

1. ชื่อ รงศาสตราจารย์นายแพทย์ อภิชัย อังสพัทธ์
ที่อยู่ หน่วยศัลยกรรมตกแต่งและเสริมสร้าง โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ถนน
พระราม 4 ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330
เบอร์โทรศัพท์ 02-256-4120, 081-491-3657
(ที่ทำงานและมือถือ)

2. ชื่อ แพทย์หญิงปัทมา ปัญญาวงศ์
 ที่อยู่ หน่วยศัลยกรรมตกแต่งและเสริมสร้าง โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ถนน
 พระราม 4 ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330
 เบอร์โทรศัพท์ 02-256-4120, 087-772-6766
 (ที่ทำงานและมือถือ)

เรียน ผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยทุกท่าน

ท่านได้รับเชิญให้เข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้เนื่องจากท่านเป็นผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาด้วยการปลูกถ่ายผิวหนังที่มีหนังแท้เหลืออยู่บางส่วน และก่อนที่ท่านจะตัดสินใจเข้าร่วมในการศึกษาวิจัยดังกล่าว ขอให้ท่านอ่านเอกสารฉบับนี้อย่างถี่ถ้วน เพื่อให้ท่านได้ทราบถึงเหตุผลและรายละเอียดของการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ หากท่านมีข้อสงสัยใดๆ เพิ่มเติม กรุณาซักถามจากทีมงานของแพทย์ผู้ทำวิจัย หรือแพทย์ผู้ร่วมทำวิจัยซึ่งจะเป็นผู้สามารถตอบคำถามและให้ความกระจ่างแก่ท่านได้

ท่านสามารถขอคำแนะนำในการเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้จากครอบครัว เพื่อน หรือแพทย์ประจำตัวของท่านได้ ท่านมีเวลาอย่างเพียงพอในการตัดสินใจโดยอิสระ ถ้าท่านตัดสินใจแล้วว่า จะเข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้ ขอให้ท่านลงนามในเอกสารแสดงความยินยอมของโครงการวิจัยนี้

เหตุผลความเป็นมา

การปลูกถ่ายผิวหนังที่มีหนังแท้เหลืออยู่บางส่วนใช้ในการรักษาบาดแผลที่มีขนาดใหญ่ หรือแผลที่ไม่สามารถหายได้โดยวิธีการปิดแผลพื้นฐานทางการแพทย์ เช่น การเย็บแผล ซึ่งบริเวณที่ถูกนำผิวหนังออกไปปลูกถ่ายจะเกิดเป็นแผลใหม่ การเร่งให้บาดแผลใหม่นี้หายเร็ว ไม่มีการติดเชื้อ และลดการเจ็บปวดเป็นเป้าหมายหลักในการดูแลผู้ป่วย ปัจจุบันนิยมใช้แผ่นปิดแผลชนิดผ้ากอซตาข่ายเคลือบพาราฟินในการรักษาบาดแผลจากการปลูกถ่ายผิวหนังที่มีหนังแท้เหลืออยู่บางส่วน ซึ่งมีราคาถูกแต่ยึดติดกับบาดแผล ทำให้เกิดความเจ็บปวด และไม่มีความสามารถในการดูดซับสารคัดหลั่งจากบาดแผล ขณะที่แผ่นปิดแผลชนิดอื่นที่มีความสามารถในการดูดซับสูง ก็ไม่มีคุณสมบัติในการกระตุ้นการหายของบาดแผล ส่วนแผ่นปิดแผลชนิดที่มีคุณสมบัติในการกระตุ้นการหายของบาดแผล ยังคงมีราคาที่สูงมากเนื่องจากต้องนำเข้าจากต่างประเทศ ดังนั้นจึงมีการพัฒนาแผ่นปิดแผลที่ทำจากโปรตีนใหม่

โปรตีนไหมแบ่งออกเป็น 2 ชนิด ได้แก่ โปรตีนเส้นไหมและโปรตีนกาวไหม โดยมีงานวิจัยพบว่าโปรตีนเส้นไหมและโปรตีนกาวไหมสามารถกระตุ้นการเจริญของเซลล์ผิวหนัง โดยไม่เกิดการอักเสบระคายเคือง โปรตีนเส้นไหมยังมีสมบัติเชิงกลที่ดี มีความสามารถในการเข้ากันได้ทางชีวภาพ มีความสามารถในการซึมผ่านของน้ำและออกซิเจนได้ดี ส่วนโปรตีนกาวไหมยังมีคุณสมบัติให้ความชุ่มชื้นและกระตุ้นการสร้างคอลลาเจน จากคุณสมบัติดังกล่าวข้างต้นจึงพัฒนาแผ่นปิดแผลผสมโปรตีนเส้นไหมเคลือบด้วยสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพนี้จะประกอบด้วยโปรตีนไหมทั้ง 2 ชนิด แล้วนำมาศึกษาประสิทธิภาพทางคลินิกของแผ่นปิดแผลผสมโปรตีนเส้นไหมเคลือบด้วยสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพเทียบกับแผ่นปิดแผลชนิดผ้ากอซตาข่ายเคลือบพาราฟินแบบมียา ในการรักษาบาดแผลจากการปลูกถ่ายผิวหนังที่มีหนังแท้เหลืออยู่บางส่วน

วัตถุประสงค์ของการศึกษา

เพื่อศึกษาผลการรักษาและอาการไม่พึงประสงค์ที่อาจเกิดขึ้นจากการใช้แผ่นปิดแผลผสมโปรตีนเส้นไหมเคลือบด้วยสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพเทียบกับแผ่นปิดแผลชนิดผ้ากอซตาข่ายเคลือบพาราฟินแบบมียา ในการรักษาบาดแผลจากการปลูกถ่ายผิวหนังที่มีหนังแท้เหลืออยู่บางส่วน จำนวนผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย คือ 30 คน

วิธีการที่เกี่ยวข้องกับการวิจัย

หลังจากท่านให้ความยินยอมที่จะเข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้ แพทย์และผู้วิจัยจะซักประวัติและบันทึกข้อมูลทั่วไปเพื่อคัดกรองว่าท่านมีคุณสมบัติที่เหมาะสมที่จะเข้าร่วมในการวิจัย

หากท่านมีคุณสมบัติตามเกณฑ์คัดเข้า ในวันที่เข้ารับการผ่าตัด บาดแผลจากการปลูกถ่ายผิวหนังบริเวณต้นขาจะถูกแบ่งเป็น 2 ส่วนเท่าๆกัน โดยแต่ละส่วนจะมีโอกาสเท่าๆกันในการได้รับการรักษาด้วยแผ่นปิดแผลผสมโปรตีนเส้นไหมเคลือบด้วยสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพหรือแผ่นปิดแผลชนิดผ้ากอซตาข่ายเคลือบพาราฟินแบบมียา จากนั้นจะถูกปิดทับด้วยผ้ากอซปราศจากเชื้อและพันผ้ายึดทับผ้ากอซอีกชั้นหนึ่ง

ท่านจะได้รับการติดตามดูแลบาดแผลทุกวันหลังการผ่าตัด โดยผู้วิจัยจะบันทึกระยะเวลาตั้งแต่หลังการผ่าตัดจนกระทั่งแผ่นปิดแผลหลุดออกจากบาดแผลเองทั้งหมดและบาดแผลหายอย่างสมบูรณ์ อีกทั้งในแต่ละวันผู้วิจัยจะให้ท่านประเมินระดับความเจ็บปวดของบาดแผล โดยใช้ช่วงคะแนน 0 – 10 คะแนน และผู้วิจัยจะสอบถามอาการไม่พึงประสงค์ที่อาจเกิดขึ้น เช่น บวม อักเสบ

ทั้งนี้กรณีท่านออกจากโรงพยาบาลก่อนบาดแผลจะหายอย่างสมบูรณ์ ผู้วิจัยขอให้ท่านบันทึกวันที่แผ่นปิดแผลหลุดออกเองทั้งหมดโดยไม่ทำให้ท่านเจ็บปวดบาดแผลอีกต่อไป และเก็บแผ่นปิดแผลหลังหลุดออกจากบาดแผลทั้งแผ่นปิดแผลผสมโปรตีนเส้นไหมเคลือบด้วยสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพและแผ่นปิดแผลชนิดผ้ากอซตาข่ายเคลือบพาราฟินแบบมียาในถุงพลาสติกที่ปิดสนิท และแช่ในตู้เย็นช่องธรรมดา (4 องศาเซลเซียส) และนำมาให้แพทย์ผู้ทำวิจัยในการนัดครั้งต่อไป

ท่านจะได้รับเชิญให้มาพบแพทย์ทั้งหมด 5 ครั้ง คือเมื่อครบ 30, 60, 90, 120, 150 วัน หลังการผ่าตัด เพื่อติดตามบาดแผลและวัดการสูญเสียน้ำหนักผิวหนังเปรียบเทียบระหว่างบริเวณบาดแผลและบริเวณผิวหนังปกติโดยใช้เครื่องวัดสภาพผิว

โดยตลอดระยะเวลาที่ท่านอยู่ในโครงการวิจัย คือ ประมาณ 5 เดือน และมาพบผู้วิจัยหรือผู้ร่วมทำวิจัยหลังจากออกจากโรงพยาบาลแล้วทั้งสิ้น 5 ครั้ง

ความรับผิดชอบของอาสาสมัครผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย

เพื่อให้งานวิจัยนี้ประสบความสำเร็จ ผู้ทำวิจัยใคร่ขอความความร่วมมือจากท่าน โดยจะขอให้ท่านปฏิบัติตามคำแนะนำของผู้ทำวิจัยอย่างเคร่งครัด รวมทั้งแจ้งอาการผิดปกติต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นกับท่านระหว่างที่ท่านเข้าร่วมในโครงการวิจัยให้ผู้ทำวิจัยได้รับทราบ

เพื่อความปลอดภัย ท่านไม่ควรรับประทานยาอื่น จากการจ่ายยาโดยแพทย์อื่นหรือซื้อยาจากร้านขายยา นอกเหนือจากยาที่ได้รับอยู่เดิมแล้ว ดังนั้นขอให้ท่านแจ้งผู้ทำวิจัยเกี่ยวกับยาที่ท่านได้รับในระหว่างที่ท่านอยู่ในโครงการวิจัย

ความเสี่ยงที่ท่านจะได้รับ

มีข้อมูลที่แสดงว่าโปรตีนเส้นไหมและโปรตีนกาวไหม อาจมีผลข้างเคียงทำให้ผิวหนังแดงหรือคันเฉพาะบริเวณที่สัมผัส รวมถึงอาการข้างเคียงและความไม่สบายที่ยังไม่มีการรายงานด้วย ดังนั้นระหว่างที่ท่านอยู่ในโครงการวิจัยจะมีการติดตามดูแลสุขภาพของท่านอย่างใกล้ชิด

กรุณาแจ้งผู้ทำวิจัยในกรณีที่พบอาการดังกล่าวข้างต้น หรืออาการอื่น ๆ ที่พบร่วมด้วยระหว่างที่อยู่ในโครงการวิจัย ถ้ามีการเปลี่ยนแปลงเกี่ยวกับสุขภาพของท่าน ขอให้ท่านรายงานให้ผู้ทำวิจัยทราบโดยเร็ว

ความเสี่ยงที่ไม่ทราบแน่นอน

ท่านอาจเกิดอาการข้างเคียง หรือความไม่สบาย นอกเหนือจากที่ได้แสดงในเอกสารฉบับนี้ ซึ่งอาการข้างเคียงเหล่านี้เป็นอาการที่ไม่เคยพบมาก่อน เพื่อความปลอดภัยของท่าน ควรแจ้งผู้ทำวิจัยให้ทราบทันทีเมื่อเกิดความผิดปกติใดๆ เกิดขึ้น

หากท่านมีข้อสงสัยใดๆ เกี่ยวกับความเสี่ยงที่อาจได้รับการเข้าร่วมในโครงการวิจัย ท่านสามารถสอบถามจากผู้ทำวิจัยได้ตลอดเวลา

หากมีการค้นพบข้อมูลใหม่ ๆ ที่อาจมีผลต่อความปลอดภัยของท่านในระหว่างที่ท่านเข้าร่วมในโครงการวิจัย ผู้ทำวิจัยจะแจ้งให้ท่านทราบทันที เพื่อให้ท่านตัดสินใจว่าจะอยู่ในโครงการวิจัยต่อไปหรือจะขอถอนตัวออกจากการวิจัย

การพบแพทย์นอกตารางนัดหมายในกรณีที่เกิดอาการข้างเคียง

หากมีอาการข้างเคียงใด ๆ เกิดขึ้นกับท่าน ขอให้ท่านรีบมาพบแพทย์ที่สถานพยาบาลทันที ถึงแม้ว่าจะอยู่นอกตารางการนัดหมาย เพื่อแพทย์จะได้ประเมินอาการข้างเคียงของท่าน และให้การรักษาที่เหมาะสมทันที หากอาการดังกล่าวเป็นผลจากการเข้าร่วมในโครงการวิจัย ท่านจะไม่เสียค่าใช้จ่าย

ประโยชน์ที่อาจได้รับ

การเข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้อาจจะทำให้ระยะเวลาในการหายของบาดแผลและระดับความเจ็บปวดบริเวณบาดแผลลดลงได้ แต่ไม่ได้รับรองว่าระยะเวลาในการหายของบาดแผลและระดับความเจ็บปวดบริเวณบาดแผลจะลดลงอย่างแน่นอน อีกทั้งข้อมูลการศึกษาที่ได้รับจากท่านจะมีประโยชน์ในการพัฒนาแผ่นปิดแผลผสมโปรตีนเส้นไหมเคลือบด้วยสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพ เพื่อใช้ในการรักษาบาดแผลจากการปลูกถ่ายผิวหนังในผู้ป่วยท่านอื่นต่อไป

วิธีการและรูปแบบการรักษาอื่น ๆ ซึ่งมีอยู่สำหรับอาสาสมัคร

ท่านไม่จำเป็นต้องเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้เพื่อประโยชน์ในการรักษาโรคที่ท่านเป็นอยู่ เนื่องจากมีแนวทางการรักษาอื่น ๆ หลายแบบสำหรับรักษาโรคของท่านได้ ดังนั้นจึงควรปรึกษาแนวทางการรักษาวิธีอื่นๆ กับแพทย์ผู้ให้การรักษาท่านก่อนตัดสินใจเข้าร่วมในการวิจัย

ข้อปฏิบัติของท่านขณะที่ร่วมในโครงการวิจัย

ขอให้ท่านปฏิบัติดังนี้

- ขอให้ท่านให้ข้อมูลทางการแพทย์ของท่านทั้งในอดีต และปัจจุบัน แก่ผู้ทำวิจัยด้วยความสัตย์จริง
- ขอให้ท่านแจ้งให้ผู้ทำวิจัยทราบความผิดปกติที่เกิดขึ้นระหว่างที่ท่านร่วมในโครงการวิจัย
- ขอให้ท่านงดการใช้อื่นนอกเหนือจากที่ผู้ทำวิจัยได้จัดให้ รวมถึงการรักษาอื่น ๆ เช่น การรักษาด้วยสมุนไพร การซื้อยาจากร้านขายยา
- ขอให้ท่านแจ้งให้ผู้ทำวิจัยทราบทันที หากท่านได้รับยาอื่นนอกเหนือจากยาที่ใช้ในการศึกษาตลอดระยะเวลาที่ท่านอยู่ในโครงการวิจัย
- ขอให้ท่านนำแผ่นปิดแผลทั้งหมดที่หลุดออกจากบาดแผลเองหลังจากบาดแผลหายอย่างสมบูรณ์มาให้ผู้ทำวิจัยในการนัดครั้งถัดไปหลังการผ่าตัด

อันตรายที่อาจเกิดขึ้นจากการเข้าร่วมในโครงการวิจัยและความรับผิดชอบของผู้ทำวิจัย/ผู้สนับสนุนการวิจัย

หากพบอันตรายที่เกิดขึ้นจากการวิจัย ท่านจะได้รับการรักษาอย่างเหมาะสมทันที และท่านปฏิบัติตามคำแนะนำของทีมผู้ทำวิจัยแล้ว ผู้ทำวิจัย/ผู้สนับสนุนการวิจัยยินดีจะรับผิดชอบต่อค่าใช้จ่ายในการรักษาพยาบาลของท่าน และการลงนามในเอกสารให้ความยินยอม ไม่ได้หมายความว่าท่านได้สละสิทธิ์ทางกฎหมายตามปกติที่ท่านพึงมี

ในกรณีที่ท่านได้รับอันตรายใด ๆ หรือต้องการข้อมูลเพิ่มเติมที่เกี่ยวข้องกับโครงการวิจัย ท่านสามารถติดต่อกับผู้ทำวิจัยคือ รศ.ดร.พรอนงค์ อร่ามวิทย์ หมายเลขโทรศัพท์ 089-921-7255 หรือ ภญ. สุคนธา หาสาส์ศรี หมายเลขโทรศัพท์ 089-944-9191 หรือ พญ.ปัทมา ปัญญาวงศ์ หมายเลขโทรศัพท์ 087-772-6766 ได้ตลอด 24 ชั่วโมง

ค่าใช้จ่ายของท่านในการเข้าร่วมการวิจัย

ท่านจะได้รับแผ่นปิดแผลที่ใช้รักษาบาดแผลจากการปลูกถ่ายผิวหนังในโครงการวิจัยจากผู้สนับสนุนการวิจัยโดยไม่ต้องเสียค่าใช้จ่าย ผู้สนับสนุนการวิจัยจะเป็นผู้รับผิดชอบทั้งหมด

ค่าตอบแทนสำหรับผู้เข้าร่วมวิจัย

ท่านจะไม่ได้รับเงินค่าตอบแทนจากการเข้าร่วมในการวิจัย แต่ท่านจะได้รับค่าเดินทางและเงินชดเชยการสูญเสียรายได้ หรือความไม่สะดวก ไม่สบาย ในการมาพบแพทย์ครั้งละ 300 บาท รวมทั้งหมด 5 ครั้ง

การเข้าร่วมและการสิ้นสุดการเข้าร่วมโครงการวิจัย

การเข้าร่วมในโครงการวิจัยครั้งนี้เป็นไปโดยความสมัครใจ หากท่านไม่สมัครใจจะเข้าร่วมการศึกษาแล้ว ท่านสามารถถอนตัวได้ตลอดเวลา โดยผู้วิจัยเป็นผู้รับเอกสารการยกเลิก ทั้งนี้การขอถอนตัวออกจากโครงการวิจัยจะไม่มีผลต่อการดูแลรักษาโรคของท่านแต่อย่างใด

ผู้ทำวิจัยอาจถอนท่านออกจากโครงการวิจัย เพื่อเหตุผลด้านความปลอดภัยของท่าน หรือเมื่อผู้สนับสนุนการวิจัยยุติการดำเนินงานวิจัย หรือ ในกรณีดังต่อไปนี้

- ท่านไม่สามารถปฏิบัติตามคำแนะนำของผู้ทำวิจัย
- ท่านรับประทานยาหรือใช้แผ่นปิดแผลชนิดอื่นที่ไม่อนุญาตให้ใช้ในการศึกษา
- ท่านเกิดอาการข้างเคียง หรือความผิดปกติของผลทางห้องปฏิบัติการจากการได้รับแผ่นปิดแผลที่ใช้ในการศึกษา
- ท่านแพ้แผ่นปิดแผลที่ใช้ในการศึกษา
- ท่านต้องการปรับเปลี่ยนการรักษาด้วยยาหรือแผ่นปิดแผลตัวที่ไม่ได้รับอนุญาตจากการวิจัยครั้งนี้

การปกป้องรักษาข้อมูลความลับของอาสาสมัคร

ข้อมูลนี้อาจนำไปสู่การเปิดเผยตัวท่าน จะได้รับการปกปิดและจะไม่เปิดเผยแก่สาธารณชน ในกรณีที่ผลการวิจัยได้รับการตีพิมพ์ ชื่อและที่อยู่ของท่านจะต้องได้รับการปกปิดอยู่เสมอ โดยจะใช้เฉพาะรหัสประจำโครงการวิจัยของท่าน

จากการลงนามยินยอมของท่านผู้ทำวิจัย และผู้สนับสนุนการวิจัยสามารถเข้าไปตรวจสอบบันทึกข้อมูลทางการแพทย์ของท่านได้แม้จะสิ้นสุดโครงการวิจัยแล้วก็ตาม หากท่านต้องการยกเลิกการให้สิทธิ์ดังกล่าว ท่านสามารถแจ้ง หรือเขียนบันทึกขอยกเลิกการให้คำยินยอมโดยส่งไปที่ หน่วยศัลยกรรมตกแต่งและเสริมสร้าง โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ถนนพระราม 4 ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

หากท่านขอยกเลิกการให้คำยินยอมหลังจากที่ท่านได้เข้าร่วมโครงการวิจัยแล้ว ข้อมูลส่วนตัวของท่านจะไม่ถูกบันทึกเพิ่มเติม อย่างไรก็ตามข้อมูลอื่น ๆ ของท่านอาจถูกนำมาใช้เพื่อประเมินผลการวิจัย และท่านจะไม่สามารถกลับมาเข้าร่วมในโครงการนี้ได้อีก ทั้งนี้เนื่องจากข้อมูลของท่านที่จำเป็นสำหรับใช้เพื่อการวิจัยไม่ได้ถูกบันทึก

จากการลงนามยินยอมของท่านแพทย์ผู้ทำวิจัยสามารถบอกรายละเอียดของท่านที่เกี่ยวข้องกับการเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้ให้แก่แพทย์ผู้รักษาท่านได้

สิทธิของผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย

ในฐานะที่ท่านเป็นผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย ท่านจะมีสิทธิดังต่อไปนี้

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

หากท่านไม่ได้รับการชดเชยอันควรต่อการบาดเจ็บหรือเจ็บป่วยที่เกิดขึ้นโดยตรงจากการวิจัย หรือท่านไม่ได้รับการปฏิบัติตามที่ปรากฏในเอกสารข้อมูลคำอธิบายสำหรับผู้เข้าร่วมในการ

วิจัย ท่านสามารถร้องเรียนได้ที่ คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์
มหาวิทยาลัย ตึกอำนวยการ 3 ชั้น โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ถนนพระราม 4 ปทุมวัน กรุงเทพฯ
10330 โทร 0-2256-4455 ต่อ 14, 15 ในเวลาราชการ

ขอขอบคุณในการร่วมมือของท่านมา ณ ที่นี้

.....



Appendix H

เอกสารแสดงความยินยอมเข้าร่วมในโครงการวิจัย

(Consent form)

การวิจัยเรื่อง ประสิทธิภาพทางคลินิกของแผ่นปิดแผลผสมโปรตีนเส้นไหมเคลือบด้วยสารมี
ฤทธิ์ทางชีวภาพเทียบกับแผ่นปิดแผลชนิดผ้ากอซตาข่ายเคลือบพาราฟินแบบมียา ในการรักษา
บาดแผลจากการปลูกถ่ายผิวหนังที่มีหนังแท้เหลืออยู่บางส่วน

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

ข้าพเจ้า นาย/นาง/นางสาว

ที่อยู่.....

ได้อ่านรายละเอียดจากเอกสารข้อมูลสำหรับผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยวิจัยที่แนบมาฉบับวันที่
..... และข้าพเจ้ายินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัยโดยสมัครใจ

ข้าพเจ้าได้รับสำเนาเอกสารแสดงความยินยอมเข้าร่วมในโครงการวิจัยที่ข้าพเจ้าได้ลงนาม
และ วันที่ พร้อมด้วยเอกสารข้อมูลสำหรับผู้เข้าร่วมโครงการวิจัย ทั้งนี้ก่อนที่จะลงนามในใบ
ยินยอมให้ทำการวิจัยนี้ ข้าพเจ้าได้รับการอธิบายจากผู้วิจัยถึงวัตถุประสงค์ของการวิจัย ระยะเวลา
ของการทำวิจัย วิธีการวิจัย อันตราย หรืออาการที่อาจเกิดขึ้นจากการวิจัย หรือจากยาที่ใช้ รวมทั้ง
ประโยชน์ที่จะเกิดขึ้นจากการวิจัย และแนวทางรักษาโดยวิธีอื่นอย่างละเอียด ข้าพเจ้ามีเวลาและ
โอกาสเพียงพอในการซักถามข้อสงสัยจนมีความเข้าใจอย่างดีแล้ว โดยผู้วิจัยได้ตอบคำถามต่าง ๆ
ด้วยความเต็มใจไม่ปิดบังซ่อนเร้นจนข้าพเจ้าพอใจ

ข้าพเจ้ารับทราบจากผู้วิจัยว่าหากเกิดอันตรายใด ๆ จากการวิจัยดังกล่าว ข้าพเจ้าจะได้รับ
การรักษาพยาบาลโดยไม่เสียค่าใช้จ่าย หากพบอันตรายที่เกิดขึ้นจากการวิจัยและพิสูจน์ได้ว่าท่าน
ปฏิบัติตามคำแนะนำของทีมผู้ทำวิจัยแล้ว ผู้สนับสนุนโครงการวิจัยยินดีจะรับผิดชอบต่อค่าใช้จ่าย
ในการรักษาพยาบาลของท่าน

ข้าพเจ้ามีสิทธิที่จะบอกเลิกเข้าร่วมในโครงการวิจัยเมื่อใดก็ได้ โดยไม่จำเป็นต้องแจ้ง
เหตุผล และการบอกเลิกการเข้าร่วมการวิจัยนี้ จะไม่มีผลต่อการรักษาโรคหรือสิทธิอื่น ๆ ที่ข้าพเจ้า
จะพึงได้รับต่อไป

ผู้วิจัยรับรองว่าจะเก็บข้อมูลส่วนตัวของข้าพเจ้าเป็นความลับ และจะเปิดเผยได้เฉพาะเมื่อ
ได้รับการยินยอมจากข้าพเจ้าเท่านั้น บุคคลอื่นในนามของบริษัทผู้สนับสนุนการวิจัย

คณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในคน สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาอาจได้รับอนุญาตให้เข้ามาตรวจสอบและประมวลข้อมูลของข้าพเจ้า ทั้งนี้จะต้องกระทำไปเพื่อวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของข้อมูลเท่านั้น โดยการตกลงที่จะเข้าร่วมการศึกษานี้ข้าพเจ้าได้ให้คำยินยอมที่จะให้มีการตรวจสอบข้อมูลประวัติทางการแพทย์ของข้าพเจ้าได้

ผู้วิจัยรับรองว่าจะไม่มีการเก็บข้อมูลใด ๆ เพิ่มเติม หลังจากที่ข้าพเจ้าขอยกเลิกการเข้าร่วมโครงการวิจัยและต้องการให้ทำลายเอกสารและ/หรือ ตัวอย่างที่ใช้ตรวจสอบทั้งหมดที่สามารถสืบค้นถึงตัวข้าพเจ้าได้

ข้าพเจ้าเข้าใจว่า ข้าพเจ้ามีสิทธิที่จะตรวจสอบหรือแก้ไขข้อมูลส่วนตัวของข้าพเจ้าและสามารถยกเลิกการให้สิทธิในการใช้ข้อมูลส่วนตัวของข้าพเจ้าได้ โดยต้องแจ้งให้ผู้วิจัยรับทราบ

ข้าพเจ้าได้ตระหนักว่าข้อมูลในการวิจัยรวมถึงข้อมูลทางการแพทย์ของข้าพเจ้าที่ไม่มีการเปิดเผยชื่อ จะผ่านกระบวนการต่าง ๆ เช่น การเก็บข้อมูล การบันทึกข้อมูลในระบบบันทึกและในคอมพิวเตอร์ การตรวจสอบ การวิเคราะห์ และการรายงานข้อมูลเพื่อวัตถุประสงค์ทางวิชาการ รวมทั้งการใช้ข้อมูลทางการแพทย์ในอนาคตหรือการวิจัยทางด้านเภสัชภัณฑ์ เท่านั้น

ข้าพเจ้าได้อ่านข้อความข้างต้นและมีความเข้าใจดีทุกประการแล้ว ยินดีเข้าร่วมในการวิจัยด้วยความเต็มใจ จึงได้ลงนามในเอกสารแสดงความยินยอมนี้

.....ลงนามผู้ให้ความยินยอม
(.....) ชื่อผู้ยินยอมตัวบรรจง
วันที่เดือน.....พ.ศ.....

ข้าพเจ้าได้อธิบายถึงวัตถุประสงค์ของการวิจัย วิธีการวิจัย อันตราย หรืออาการไม่พึงประสงค์หรือความเสี่ยงที่อาจเกิดขึ้นจากการวิจัย หรือจากแผ่นปิดแผลที่ใช้ รวมทั้งประโยชน์ที่จะเกิดขึ้นจากการวิจัยอย่างละเอียด ให้ผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัยตามนามข้างต้นได้ทราบและมีความเข้าใจดีแล้ว พร้อมลงนามลงในเอกสารแสดงความยินยอมด้วยความเต็มใจ

.....ลงนามผู้ทำวิจัย
(.....) ชื่อผู้ทำวิจัย ตัวบรรจง
วันที่เดือน.....พ.ศ.....

.....ลงนามพยาน
(.....) ชื่อพยาน ตัวบรรจง
วันที่เดือน.....พ.ศ.....

Appendix I

Case report form

Title: Comparative clinical efficacy of wound dressing containing silk fibroin with bioactive coating layer versus medicated paraffin gauze dressing in the treatment of split-thickness skin graft donor sites

Patient information and demographics			
Patient code: _____	Date: ____/____/____	Sex: <input type="checkbox"/> Male <input type="checkbox"/> Female	
Date of birth: ____/____/____	Weight (kg): _____	Height (cm): _____	
Comorbids: _____ _____			
Current medications: _____ _____			
Drinking: <input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No			
Smoking: <input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No			
Allergies: _____			
Treatment information			
Diagnosis: _____			
Size of donor site (cm ²): _____ Thickness of donor site (inch) _____			
Medications	Dose	How and How often	Date started
1.			
2.			
3.			
4.			
5.			
6.			
7.			
8.			
9.			
10.			

Appendix J

Follow up report










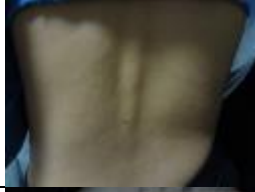














Title: Comparative clinical efficacy of wound dressing containing silk fibroin with bioactive coating layer versus medicated paraffin gauze dressing in the treatment of split-thickness skin graft donor sites










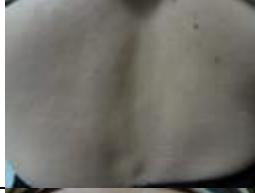





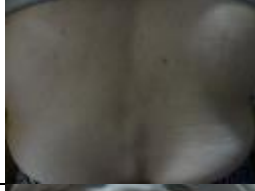








Patient code: _____	Date: ____/____/____
Wound dressing	
A. wound dressing containing silk fibroin woven fabric with bioactive coating layer - Dressing change <input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No - Exudates <input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No - Dressing separate completely from donor site <input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No	B. medicated paraffin gauze dressing - Dressing change <input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No - Exudates <input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No - Dressing separate completely from donor site <input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No
Visual analogue scale	
A. wound dressing containing silk fibroin woven fabric with bioactive coating layer No pain ----- Unbearable 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	
B. medicated paraffin gauze dressing No pain ----- Unbearable 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	












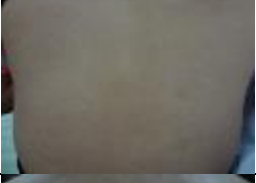
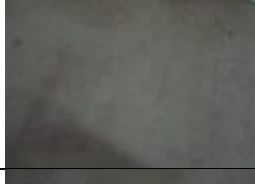
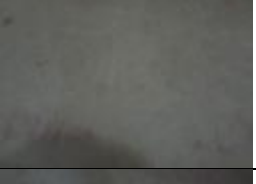










Signs of infection	
<p>A. wound dressing containing silk fibroin woven fabric with bioactive coating layer</p> <p>Pus <input type="checkbox"/> Yes _____ <input type="checkbox"/> No</p> <p>Others _____</p>	<p>B. medicated paraffin gauze dressing</p> <p>Pus <input type="checkbox"/> Yes _____ <input type="checkbox"/> No</p> <p>Others _____</p>
Complication	
<p>A. wound dressing containing silk fibroin woven fabric with bioactive coating layer</p> <p><input type="checkbox"/> Yes _____ <input type="checkbox"/> No</p>	<p>B. medicated paraffin gauze dressing</p> <p><input type="checkbox"/> Yes _____ <input type="checkbox"/> No</p>
Vital signs	
Heart rate (beats per minute): _____	Respiration (breaths per minute): _____
Blood pressure (mmHg): _____	Temperature (°C): _____
Kidney & liver function	
BUN (mg/dL): _____	Serum creatinine (mg/dL): _____
AST (U/L): _____	ALT (U/L): _____
Alkaline phosphatase (U/L) _____	Albumin (g/dL): _____


Appendix K

























Participants' skins at the back area among three phases of skin patch test

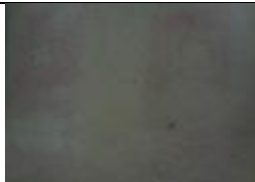























No. of participant	Induction phase I	Induction phase II	Challenge phase
1			
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			

























No. of participant	Induction phase I	Induction phase II	Challenge phase
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			
16			
















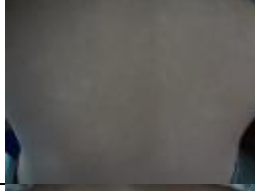








No. of participant	Induction phase I	Induction phase II	Challenge phase
17			
18			
19			
20			
21			
22			
23			
24			

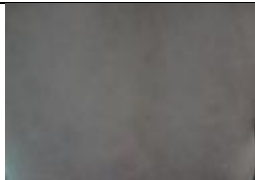

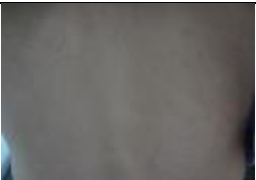









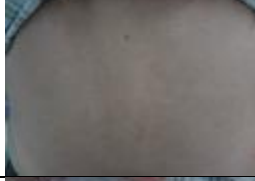






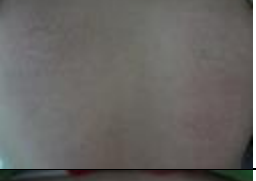




No. of participant	Induction phase I	Induction phase II	Challenge phase
25			
26			
27			
28			
29			
30			
31			
32			











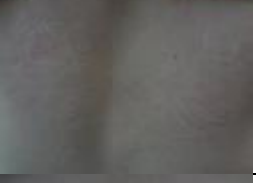
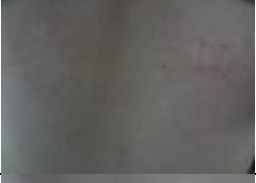
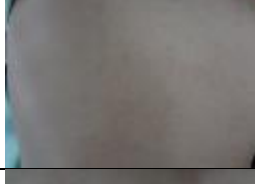





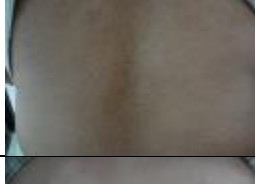





No. of participant	Induction phase I	Induction phase II	Challenge phase
33			
34			
35			
36			
37			
38			
39			
40			


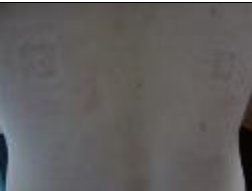






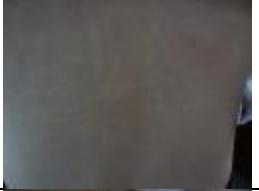











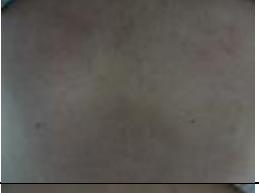



No. of participant	Induction phase I	Induction phase II	Challenge phase
41			
42			
43			
44			
45			
46			
47			
48			


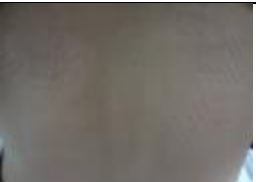






















No. of participant	Induction phase I	Induction phase II	Challenge phase
49			
50			
51			
52			
53			
54			
55			
56			







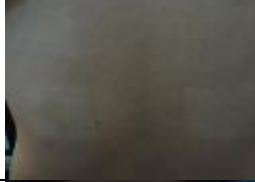







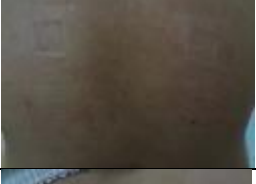









No. of participant	Induction phase I	Induction phase II	Challenge phase
57			
58			
59			
60			
61			
62			
63			
64			




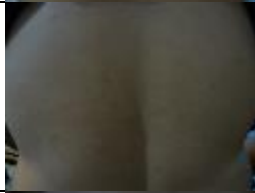








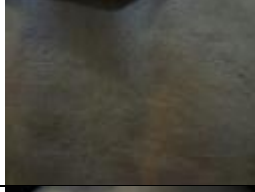





No. of participant	Induction phase I	Induction phase II	Challenge phase
65			
66			
67			
68			
69			
70			
71			
72			

No. of participant	Induction phase I	Induction phase II	Challenge phase
73			
74			
75			
76			
77			
78			
79			
80			









No. of participant	Induction phase I	Induction phase II	Challenge phase
81			
82			
83			
84			
85			
86			
87			
88			

No. of participant	Induction phase I	Induction phase II	Challenge phase
89			
90			
91			
92			
93			
94			
95			
96			

No. of participant	Induction phase I	Induction phase II	Challenge phase
97			
98			
99			
100			
101			
102			
103			
104			















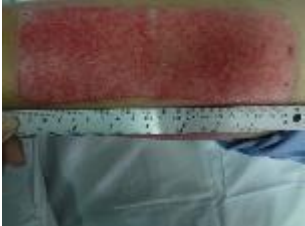



No. of participant	Induction phase I	Induction phase II	Challenge phase
105			
106			
107			
108			
109			
110			

Appendix L









Donor site characteristics (part 1)			
No.	Operative day		Donor site after healed
	Donor site	Donor site with dressings	On the first day
1			
2			
3			
4			
5			
6			




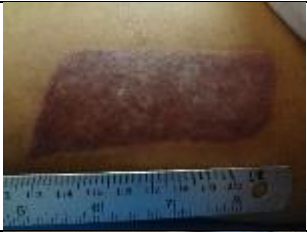
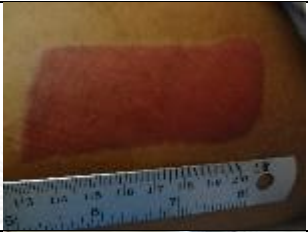













Donor site characteristics (part 1; continued)			
No.	Operative day		Donor site after healed
	Donor site	Donor site with dressings	On the first day
7			
8			
9			
10			
11			
12			



















Donor site characteristics (part 1; continued)			
No.	Operative day		Donor site after healed
	Donor site	Donor site with dressings	On the first day
13			
14			
15			
16			
17			
18			


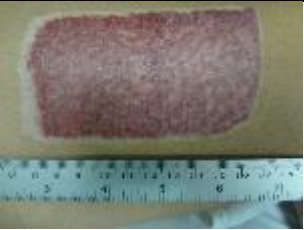










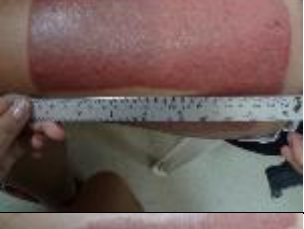




Donor site characteristics (part 1; continued)			
No.	Operative day		Donor site after healed
	Donor site	Donor site with dressings	On the first day
19			
20			
21			
22			
23			
24			



Donor site characteristics (part 1; continued)			
No.	Operative day		Donor site after healed
	Donor site	Donor site with dressings	On the first day
25			
26			
27			
28			
29			
30			

Donor site characteristics (part 2)			
No.	Donor site after healed		
	1 week	1 month	2 months
1			
2			
3			
4			
5			
6			

Donor site characteristics (part 2; continued)			
No.	Donor site after healed		
	1 week	1 month	2 months
7			
8			
9			
10			
11			
12			

Donor site characteristics (part 2; continued)			
No.	Donor site after healed		
	1 week	1 month	2 months
13			
14			
15			
16			
17			
18			




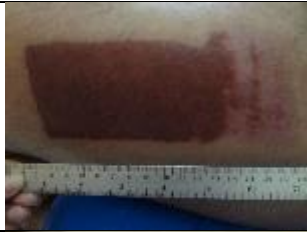













Donor site characteristics (part 2; continued)			
No.	Donor site after healed		
	1 week	1 month	2 months
19			
20			
21			
22			
23			
24			





Donor site characteristics (part 2; continued)			
No.	Donor site after healed		
	1 week	1 month	2 months
25			
26			
27			
28			
29			
30			

Donor site characteristics (part 3)			
No.	Donor site after healed		
	3 months	4 months	5 months
1			
2			
3			
4			
5			
6			

Donor site characteristics (part 3; continued)			
No.	Donor site after healed		
	3 months	4 months	5 months
7			
8			
9			
10			
11			
12			

Donor site characteristics (part 3; continued)			
No.	Donor site after healed		
	3 months	4 months	5 months
13			
14			
15			
16			
17			
18			

Donor site characteristics (part 3; continued)			
No.	Donor site after healed		
	3 months	4 months	5 months
19			
20			
21			
22			
23			
24			

Donor site characteristics (part 3; continued)			
No.	Donor site after healed		
	3 months	4 months	5 months
25			
26			
27			Loss to follow-up
28			
29			
30			

VITA

Sukhontha Hasatsri was born on July 29, 1983 in Bangkok, Thailand. She received the Bachelor of Pharmacy (First-Class Honors) from the Faculty of Pharmacy, Rangsit University, Thailand in March 2007 and the Master of Science in Pharmacy from the Department of Pharmacy Practice, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, Thailand in May 2011. She received a Royal Golden Jubilee Ph.D. scholarship awarded by the Thailand Research Fund under the Office of the Prime Minister, the Royal Thai Government during 2011 – 2013 (Grant no. PHD/0149/2553) under the supervision of Professor Pornanong Aramwit, Pharm.D., Ph.D. Her researches have been published in journals for 3 publications as follows:

1. Hasatsri S, Angspatt A, aramwit P. Randomized clinical trial of the innovative bilayered wound dressing made of silk and gelatin: safety and efficacy tests using a split-thickness skin graft model. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2015;1-8.
2. Hasatsri S, Yamdech R, Chanvorachote P, Aramwit P. Physical and biological assessments of the innovative bilayered wound dressing made of silk and gelatin for clinical applications. *J Biomater Appl.* 2015;29(9):1304-13.
3. Hasatsri S, Chaiprasert A, Aramwit P. Relationship between changes of calcineurin inhibitor levels and serum creatinine and cystatin C levels in kidney transplant patients. *Chula Med J.* 2011;55(5):437-46.