Effect of Topical Regular Short Acting Insulin "Containing Zinc" *versus* Zinc Solution on Cutaneous Wound Healing

Thesis Submitted for The Partial Fulfillment of Master Degree In Pharmaceutical Sciences (Clinical Pharmacy)

By

Dina Mohamed Ibrahim Ibrahim Belal

Bachelor Degree in Pharmaceutical Sciences ,

Faculty of Pharmacy, Ain Shams University

(2007)

Under Supervision Of

Prof. Dr. Manal Hamed El Hamamsy
Professor and Head of Clinical Pharmacy Department,
Faculty of Pharmacy, Ain Shams University

Prof. Dr. May Hussein El Samahy
Professor of Dermatology, Venerology and Andrology,
Faculty of Medicine, Ain Shams University

Faculty of Pharmacy
Ain Shams University
2013

Acknowledgement

First and foremost thanks to ALLAH, the most merciful.

I wish to express my deepest appreciation and sincere gratitude to ***Prof. Dr. May Hussein El Samahy,*** Professor of Dermatology and Venereology, Faculty of Medicine, Ain Shams University, for her continuous encouragement, kind supervision, valuable instructions and sincere advice which have been the main factors to complete this work. It was a great honour to me to work under her supervision.

Special thanks and deepest gratitude go to ***Prof. Dr. Manal Hamed El Hamamsy,*** Professor of Clinical Pharmacy, Faculty of Pharmacy, Ain Shams University, for her moral and scientific support and valuable guidance throughout the work.

Words can never express my deepest gratitude, appreciation and greatest respect to ***Dr. Enas Attia Saad El-Din Attia,*** Assistant Professor of Dermatology and Venereology, Faculty of Medicine, Ain Shams University, for her great help and indispensable advice in every step of this work.

Extended gratefulness goes to ***Professor Dr. Inas El Attar***, Professor of Biostatistics, Department of Biostatistics & Cancer Epidemiology, National Cancer Institute, for sincere help with the statistical analysis of the study results.

Last, but not least, I am also delighted to express my deep gratitude and thanks to all my dear professors, my colleagues, and my family, that without their help, this work could not have been completed.

Dina Belal

List of Contents

Subject	Page no.
Abstract	**iv**
List of Abbreviations	**vi**
List of Tables	**viii**
List of Figures	**ix**
Introduction	**1**
Review of Literature:	
1: *Physiology of Cutaneous Wound Healing*	**3**
1.1 Types of wounds	**3**
1.2 Phases of wound healing	**4**
1.3 Some factors affecting wound healing	**12**
1.4 Growth factor superfamilies and their role in wound healing	**13**
1.5 Types of wound healing	**16**
1.6 Some clinical aspects of wound healing	**18**
2: *Role of Insulin in Cutaneous Wound Healing*	**20**
2.1. Discovery of Insulin	**20**
2.2. Structure of Insulin	**20**
2.3. Biosynthesis and release of Insulin	**22**
2.4. Physiological effects of Insulin	**24**
2.5 Insulin pharmacokinetics	**25**
2.6 Pharmacology of Insulin	**26**
2.7 Stability of insulin in commercial preparations	**28**
2.8 Insulin and cutaneous wound healing	**29**
2.9 Insulin like growth factors	**30**
3: *Zinc and Cutaneous Wound Healing*	**34**
3.1 Sources of zinc	**34**
3.2 Zinc Function	**34**
3.3 Zinc Pharmacokinetics	**35**
3.4 Zinc Assessment	**38**

3.5 Zinc Pharmacodynamics	**39**
3.6 Zinc Requirements	**43**
3.7 Therapeutic Implications	**44**
3.8 Zinc deficiency	**46**
3.9 Zinc and cutaneous wound healing: Therapeutic implications and drawbacks	**49**
4: Role of clinical pharmacist in burn and injury units	**51**
Aim of the work	**52**
Patients and Methods	**53**
Results	**63**
Discussion	**88**
Summary & Conclusion	**98**
References	**101**
Appendices	**120**
Arabic summary	**-**

Abstract

Background: Regular insulin has a long history of use in improving healing. Another factor; known to facilitate wound healing, is topical zinc application. Zinc is used to crystallize regular insulin. Hence, when wounds are treated with insulin, they are therefore also being treated with zinc. If insulin accelerates wound healing, it is not clear if the increase in the rate of healing would be due to insulin (a known growth factor), the zinc it contains, or a combination of the two.

Key Words: Regular insulin, Wound healing, Zinc, Clinical pharmacy.

Objective: to evaluate the effect of using regular crystalline insulin (containing zinc) topically versus zinc solution compared to controls, on healing of open cutaneous wounds.

Patients and Methods: 90 consecutive patients with skin wounds were randomly assigned to one of three groups (I, II and III); Group I received twice daily regular insulin dressings, Group II received sterile aqueous zinc chloride ($ZnCl_2$) solution, and Group III sterile 0.9% saline (0.9% NaCl), twice daily as a placebo (control group). A questionnaire was used to determine the effect of wounds on the quality of life.

Results: Each of topical crystalline regular insulin and topical aqueous zinc administration enhanced wound healing by shortening the time needed for complete epithelialization of wounds compared to the control group. However, wound healing rates were significantly higher in group I than in group II. The rate of healing showed statistically significant difference being higher in acute wounds than in chronic wounds, and in those $\leq$ 40 years than those >40 years. Comparing lower body and upper body wounds in our study showed statistically significant difference between

rates of healing, where the rate of healing of wounds in the upper body was statistically significantly higher than lower body wounds. A positive correlation was found between the duration of healing in days and wound area in the three studied groups. After controlling for the effect of area, there was excellent negative correlation between the rate of healing and duration of healing in days for all study groups. Comparing before and after questionnaire scores showed enhanced quality of life after healing. Moreover, improvement of all the studied parameters of the questionnaire was directly correlated with the rate of wound healing, particularly pain and general health improvement.

Conclusion: The use of either topical crystalline regular insulin (containing zinc) or topical aqueous zinc on acute or chronic uncomplicated cutaneous wounds of non diabetic patients was proven to be safe and effective in enhancing healing, and hence patients' quality of life. However, topical crystalline regular insulin showed better results, mostly due to synergistic effect between the anabolic actions of insulin as a growth factor and the wound healing promoting influence of the zinc ions present in its formulation.

List of Abbreviations

ACCP…….American College of Clinical Pharmacy

aFGF ……acidic fibroblast growth factor

AI……...Adequate intake

ALP…..……..Alkaline phosphatase

ATP……Adenosine tri phosphate

bFGF ……Basic fibroblast growth factor

BMI……..Body mass index

DM……..……Diabetes mellitus

DV…..…….Daily Value

ECM……Extracellular matrix

EFZ……..……...Endogenous fecal zinc

EGF……Epidermal growth factor

E. coli…… Escherichia coli

FDA ……Food and Drug Administration

FGF……Fibroblast growth factor

GAGs ……Glycosaminoglycans

GH……Growth hormone

GLUT ……Glucose transporter

HDL……..….. High density lipoprotein

IFN……Interferon

IGF……Insulin like growth factor

IGFBP……Insulin like growth factor binding protein

IGFR ……Insulin like growth factor receptor

IL……Interleukin

KD……..Kilo Dalton

KGF ……Keratinocyte growth factor

LP……Lamina propria

MMPs……Matrix metalloproteinases

NPH ……Neutral Protamine Hagedorn

NSAIDs……Nonsteroidal anti-inflammatory drugs

NSILA……Nonsuppressible insulin-like activity

PDGF ……Platelet derived growth factor

RDA……...Recommended daily allowance

TGF……Transforming growth factor

TNF-α……Tumor necrosis factor-α

t-PA……Tissue plasminogen activator

TPN……..Total parenteral nutrition

UV……Ultra Violet

VEGF ……Vascular endothelial growth factor

WHO……World Health Organisation.

WoSSAC……Wound symptom Assessment Chart

ZIP……Zinc importer protein

ZnT……..Zinc transporter protein

List of Tables

Table no.	Title	Page
Table 1	Summary of the inflammatory mediators released during wound healing.	**7**
Table 2	Selected Food Sources of Zinc.	**35**
Table 3	Recommended Dietary Allowances (RDAs) for Zinc.	**44**
Table 4	Effect of Pain From the wound on Quality of Life Questionnaire	**58**
Table 5	**Step 1:** Scoring questionnaire answers	**60**
Table 6	**Step 2:** Averaging items of the Questionnaire to form 7 scales	**61**
Table 7	Baseline characteristics of the three study groups.	**64**
Table 8	Healing data of the three study groups.	**70**
Table 9	The rate of healing in male and female patients of each group and among the three groups.	**71**
Table 10	Comparing the rate of healing of those ≤ 40 and >40 years of each group and among the three groups.	**72**
Table 11	Acute and chronic wounds in patients in each group and each type among the three groups regarding the rate of healing.	**74**
Table 12	Comparing lower body and upper body wounds in patients in each group and each location among the three groups regarding the rate of healing.	**75**
Table 13	Correlation between duration of wound healing and wound area in the three study groups.	**76**
Table 14	Quality of life parameters before and after treatment in the three study groups.	**78**
Table 15	The "change" of the score of the 7 parameters of the questionnaire between the three study groups.	**83**
Table 16	Correlation between the "change" of the 7 parameters of the Questionnaire and the rate of healing in the study groups.	**84**

List of Figures

Figure no.	Title	Page
Figure 1	A Cutaneous Wound Three Days after Injury.	**7**
Figure 2	The time course of the different cells appearing in the wound during the healing process.	**7**
Figure 3	A Cutaneous Wound Five Days after Injury.	**10**
Figure 4	The deposition of wound matrix components over time.	**11**
Figure5	Proinsulin, Insulin, chains A and B linked by two disulfide bonds, and C peptide.	**21**
Figure 6	Computer-generated image of six insulin molecules assembled in a hexamer.	**21**
Figure 7	Insulin biosynthesis.	**23**
Figure 8	Insulin receptor signaling.	**25**
Figure 9	The differentiative and proliferative actions of IGF-I during the stages of B cell development.	**31**
Figure 10	Certain stretches of amino acids can fold independently around a zinc ion to form modules called zinc fingers.	**40**
Figure 11	Effects of zinc deficiency on metabolic processes associated with growth.	**42**
Figure 12	Patient number **1** of Group **I** with second degree burn (acute wound) on the dorsum of the right foot treated with regular insulin dressings.	**65**
Figure 13	Patient number **14** of Group **I** with second degree burn (acute wound) on the medial side of the right forearm treated with regular insulin dressings.	**65**
Figure 14	Patient number 16 of Group I with second degree decubitus ulcer er dorsal aspect of left thigh treated with regular insulin dressings.	**66**
Figure 15	Patient number **21** of Group **I** with second degree burn (acute wound) on the abdomen treated with regular insulin dressings.	**66**

Figure 16	Patient number **5** of Group **II** with second degree burn (acute wound) on the dorsum of the left foot treated with zinc chloride solution dressings.	**67**
Figure 17	Patient number **9** of Group **II** with second degree burn (acute wound) on the medial side of the right forearm treated with zinc chloride solution dressings.	**67**
Figure 18	Patient number **19** of Group **II** with second degree burn (acute wound) on the dorsum of left hand treated with zinc chloride solution dressings.	**68**
Figure 19	Patient number **6** of Group **III** with second degree burn (acute wound) on the dorsum of left hand fingers treated with saline dressings (control).	**68**
Figure 20	Patient number **17** of Group **III** with crush wound (acute wound) on the lateral side of left elbow treated with saline dressings (control).	**69**
Figure 21	Mean rate of healing in both genders among the three studied groups.	**71**
Figure 22	Healing rate in both age categories among the three studied groups.	**73**
Figure 23	Rate of healing in both types of wounds among the 3 studied groups.	**74**
Figure 24	Rate of healing according to location of wounds among the three studied groups.	**76**
Figure 25	The Correlation between duration of wound healing and wound area in group I.	**77**
Figure 26	The Correlation between duration of wound healing and wound area in group II.	**77**
Figure 27	The Correlation between duration of wound healing and wound area in group III.	**77**
Figure 28	Physical non functioning % among the study groups.	**79**

Figure 29	Role limitation due to physical health among the study groups.	**78**
Figure 30	Role limitation due to emotional problems among the study groups.	**80**
Figure 31	Wound status among the study groups.	**80**
Figure 32	Social non-functioning % among the study groups.	**81**
Figure 33	Improvement of pain sensation among the study groups.	**81**
Figure 34	General health improvement among the study groups.	**82**
Figure 35	The Correlation between improvement of physical functioning and the rate of healing.	**84**
Figure 36	The Correlation between improvement of physical health and the rate of healing.	**85**
Figure 37	The Correlation between improvement of emotional problems and the rate of healing.	**85**
Figure 38	The Correlation between improvement of wound status and the rate of healing.	**86**
Figure 39	The Correlation between improvement of social functioning and the rate of healing.	**86**
Figure 40	The Correlation between improvement of pain and the rate of healing.	**87**
Figure 41	The Correlation between improvement of general health and the rate of healing.	**87**

تأثير الانسولين العادى قصير المفعول الذى يحتوي على الزنك مقابل تأثيرمحلول الزنك على شفاء الجروح الجلدية"

رسالة توطئة للحصول على درجة الماجيستير فى العلوم الصيدلية (الصيدلة الاكلينيكية)
مقدم من

الصيدلانية/ دينا محمد ابراهيم ابراهيم بلال
بكالوريوس العلوم الصيدلية 2007
كلية الصيدلة،جامعة عين شمس

تحت اشراف

أ.د/منال حامد الحمامصى
أستاذ الصيدلة الاكلينيكية
كلية الصيدلة، جامعة عين شمس

أ.د/مى حسين السماحى
أستاذ الأمراض الجلدية والتناسلية والذكورة
كلية الطب، جامعة عين شمس

كلية الصيدلة
جامعة عين شمس
2013

الملخص العربى

إن الوظيفة الرئيسية لجلد الإنسان هي حماية الجسم من البيئة الخارجية ولذلك من المهم أن يتم إصلاح أي ضرر بسرعة من خلال عملية شفاء الجروح. ويرتبط ضعف إلتئام الجروح (مثل الجروح المزمنة أو القرح) ، وفرض العبء المالي على الخدمات الصحية في العالم. ولذلك، فإنه من المهم إيجاد مواد تسرع عملية إلتئام الجروح.

وتشير الخصائص الفيسيولوجية للأنسولين إلى أنه قد يؤثر على إلتئام الجروح بشكل إيجابى لأنه يمكن أن يحفز نمو الخلايا الفردية وكذلك يعزز عملية النمو فى الكائن الحي ككل. وقد أثبتت الدراسات الاكلينيكية الآثار الإيجابية للأنسولين على إلتئام الجروح؛ وأجريت هذه الدراسات في المختبرات وعلى حيوانات التجارب، وعلى البشر، وكشفت عن تسارع عملية الشفاء مع استخدام الأنسولين.

الزنك هو معدن أساسي لنمو الانسان ووظائفه الحيوية. وكثير من العمليات الحيوية التى تعتمد على الزنك ضرورية لعملية إلتئام الجروح ، مثل عملية تخليق الكولاجين، وعملية تشكيل النسيج الظهارى وإنقسام الخلايا. وبناء على ذلك، فإن الزنك من المغذيات الأساسية لحدوث عملية إلتئام طبيعية للجروح.

ويستخدم الزنك لبلورة الانسولين من النوع العادى (قصير المفعول). عندما يتم إستخدام هذا النوع من الانسولين لعلاج الجروح الجلدية؛ فبالتالي فهى تعالج أيضا بالزنك. إذا كان الأنسولين العادي يسرع إلتئام الجروح، فإنه ليس من الواضح إذا كانت الزيادة في معدل الشفاء ستكون بسبب الأنسولين (عامل نمو معروف)، أوأنه يحتوي على الزنك، أو مزيج من الاثنين.

لذلك، تهدف هذه الدراسة إلى تقييم أثر استخدام الانسولين العادي البلوري الذي يحتوي على الزنك موضعيا مقابل محلول الزنك على شفاء الجروح الحادة والمزمنة الخالية من المضاعفات فى البشر غير المصابين بداء السكرى.

تم إدراج 90 مريضا على التوالي (41 من الذكور والإناث 49) مصابين بجروح جلدية في هذه التجربة الكلينيكية. وتم تقسيم المرضى عشوائيا الى ثلاث مجموعات (I، II و III)؛ المجموعة الأولى تلقت الأنسولين مرتين يوميا ، المجموعة الثانية تلقت محلول كلوريد الزنك المائي ($ZnCl_2$) مرتين يوميا ، والمجموعة الثالثة تلقت محلول ملح معقم 0.9 ٪ مرتين يوميا كمجموعة ضابطة.

بشكل عام، وجدنا أن إستخدام الأنسولين العادى (الذي يحتوي على الزنك) أو إستخدام محلول الزنك المائي موضعياً على الجروح الحادة والمزمنة على حد سواء آمن وفعال. وجد أن الأنسولين العادى (الذي يحتوي على الزنك) أو إستخدام محلول الزنك المائي موضعياً عزز من إلتئام الجروح عن طريق تقصير الوقت اللازم لتشكل النسيج الظهاري كاملاً للجروح مقارنة مع مجموعة التحكم (المجموعة الضابطة).

ومع ذلك، فكانت معدلات الشفاء أعلى بشكل ملموس في المجموعة الأولى (باستخدام الأنسولين الذى يحتوى على الزنك موضعيا) عن معدلات الشفاء فى المجموعة الثانية (باستخدام محلول الزنك موضعيا فى تركيز مماثل لذلك في الانسولين البلورى المستخدم في المجموعة الأولى).

بمقارنة المرضى المصابين بالجروح الحادة والمزمنة في كل مجموعة وبين المجموعات الثلاث التي تمت دراستها، وجد أن معدل الشفاء أظهر فروق ذات دلالة إحصائية أعلى في الجروح الحادة عنها فى المزمنة. كما وجدنا أن معدل الشفاء فى المرضى ذوى الأعمار أقل من أو يساوى 40 عاما ($40 \leq$) أعلى إحصائياً من ذوى الأعمار أكثر من 40 عاما ($40<$). وبمقارنة الجروح فى النصف الأسفل والنصف العلوي من الجسم في دراستنا أظهرت النتائج أن معدل شفاء الجروح في الجزء العلوي من الجسم كان أعلى إحصائيا من الجروح في النصف السفلي من الجسم.

وجد أن هنالك علاقة إيجابية بين مدة الشفاء بالأيام ومساحة الجروح في المجموعات الثلاث التي شملتها الدراسة. بعد ضبط تأثير مساحة الجروح، كان هناك علاقة عكسية بين معدل الشفاء ومدة الشفاء بالأيام لجميع مجموعات الدراسة، أى كلما زاد معدل الشفاء، قلت مدة الشفاء بالأيام.

تم إجراء استبيان لتحديد تأثير الجروح على جودة الحياة. بمقارنة نتائج الاستبيان قبل وبعد الشفاء، كان هناك تحسن كبير لجميع نتائج الأسئلة في المجموعات الثلاث (تحسن الوظائف البدنية، تحسن الاعاقة بسبب الحالة الجسدية، وتحسن الاعاقة بسبب الحالة النفسية، تحسن وضع الجرح، وتحسن الأداء الاجتماعي، تقليل الشعور بالألم، وتحسن الصحة العامة)، مما يعني تحسن جودة الحياة بعد الشفاء. وعلاوة على ذلك، وجدنا أن تحسن المعايير التى تم قياسها فى الاستبيان يتناسب طردياً مع معدل إلتئام الجروح وخاصة الشعور بالألم وتحسين الصحة العامة.

الاستنتاجات

قد ثبت أن إستخدام الأنسولين العادي البلوري الذي يحتوي على الزنك أو إستخدام محلول الزنك موضعياً على الجروح الحادة أوالمزمنة - بغير مضاعفات- فى المرضى غير المصابين بداء السكرى آمن وفعال في تعزيز إلتئام الجروح، وبالتالي تحسين جودة حياة المرضى. ومع ذلك، أظهر إستخدام الانسولين العادى نتائج أفضل، وذلك بسبب الجمع بين تأثير الأنسولين وهو عامل نمو وتأثير أيونات الزنك الموجودة فى الأنسولين والتى تساعد على إلتئام الجروح.

بسبب تاريخه الطويل من الإستخدام الآمن في البشر، ثبت أن الانسولين العادي البلوري عامل مساعد فعال على إلتئام الجروح دون آثار سلبية. ويمكن استخدامه كبديل أو بالاشتراك مع علاجات مستخدمة حالياً لإلتئام الجروح.