

# **lek. Mateusz Mieczkowski**

## **Streszczenie w języku polskim**

***Tytuł: Translacja wyników badań nad zwierzęcymi modelami ran na ich zastosowanie w praktyce klinicznej gojenia ran u pacjentów z cukrzycą***

## **Wstęp**

W dobie starzenia się populacji problem leczenia trudno gojących się ran nabiera coraz większego znaczenia klinicznego. Generatorem opóźnionego procesu gojenia tkanek są wszystkie choroby, u podłoża których leży zmniejszenie utlenowania tkanek, zarówno na poziomie mikrokrażenia, jak i w łożysku dużych naczyń krwionośnych. Wiodącą jednostką chorobową wikłającą gojenie ran jest cukrzyca. Badania podstawowe kierowane są na poszukiwania zarówno cząsteczek, jak i metod optymalizujących proces gojenia ran, związanych szczególnie z wieloletnim niewyrównanym przebiegiem cukrzycy. Istotą takich terapii jest minimalizacja ryzyka zakażenia tkanek poprzez zmniejszenie wielkości owrzodzeń, a zatem wpływ na proces ich regeneracji. Rana bez cech zakażenia to mniejsze ryzyko takich powikłań jak sepsa, z możliwością zgonu włącznie. Utrzymywanie się cech infekcji to ryzyko potencjalnie nieodwracalnej utraty nie tylko stopy, ale także całej kończyny dolnej, w wyniku ich martwicy. Jednak zanim nowe formy terapii będą mogły być zastosowane u ludzi, niezbędne są badania kliniczne powstałe w oparciu o właściwie opracowane modele zwierzęce.

Celem badań wchodzących w skład niniejszej rozprawy doktorskiej było stworzenie eksperymentalnego modelu zwierzęcego rany przewlekłej. Kolejne badania pozwoliły na uzyskanie warunków możliwie jak najwierniej odzwierciedlających zmiany patofizjologiczne obecne w tkankach pacjentów poddanych wpływowi hiperglikemii. Po wytworzeniu takiego modelu dokonano oceny wpływu dwóch form terapeutycznych na efektywność gojenia ran u zwierząt doświadczalnych.

Prace nr 1 i 2 niniejszej rozprawy mają charakter oryginalny i zostały przeprowadzone po dogłębnej analizie dostępnego piśmiennictwa w zakresie projektowania badań na modelach zwierzęcych. Pierwsza praca stanowi opis badania pilotażowego z zaproponowanym autorskim modelem gojenia ran przewlekłych u szczurów rasy Wistar, u których wytworzono cukrzycę

za pomocą streptozotocyny (STZ). Druga praca powstała na bazie wniosków wynikających z doświadczeń opisanych w pierwszej pracy. W drugiej pracy uporządkowano wnioski z badania pierwszego, modyfikując pierwotnie stworzony zwierzęcy model rany przewlekłej oraz zastosowano dwie odrębne cząsteczki przeciwcukrzycowe celem porównania ich wpływu na sam proces gojenia rany, a więc wykorzystujące działania pozahipoglikemizujące leków rutynowo stosowanych w terapii cukrzycy *per se*. Podsumowaniem zebranych doświadczeń jest trzecia praca, która ma charakter poglądowy. Uwagi zawarte w pracy stanowią drogowskaz dla badaczy, którzy będą oceniali skuteczność nowych leków bazując na zwierzęcym modelu rany z towarzyszącą cukrzycą.

## **Materialy i Metody**

Badania opisywane w pracach 1 i 2 przeprowadzono po uzyskaniu zgody II Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach w Warszawie. Badania przeprowadzono we współpracy z Zakładem Farmakologii Doświadczalnej i Klinicznej WUM. W obu przeprowadzonych badaniach wykorzystano szczury rasy Wistar, płci męskiej, o masie ciała około 300 g (+/-30g).

Badanie nr 1 było badaniem pilotażowym. Jego celem było uzyskanie średnio-ciężkiej cukrzycy z jednoczesną stwierdzoną obecnością neuropatii, co miało imitować warunki analogiczne do tych, jakie można zaobserwować u osób z wieloletnią, niewyrównaną cukrzycą. Protokół badania zakładał ostateczne przygotowanie takiego modelu, który mógłby w przyszłości być wzorem dla różnych badań oceniających skuteczność nowych cząsteczek w leczeniu trudno gojących się ran w cukrzycy. Dotyczy to zarówno cząsteczek podawanych ogólnoustrojowo, jak i miejscowo do łożyska rany. Celem wywołania cukrzycy zwierzęta otrzymywały domięśniowo streptozotocynę (STZ) w dawce 35 - 38mg/kg masy ciała. Obecność oraz rozwój neuropatii oceniano odpowiednio po 7., 14., 21. i 28. dniu od podania STZ, uzyskując po tym okresie średnią redukcję antynocycepcji w zakresie 43,6 – 44% w stosunku do wartości wyjściowych. Do właściwego etapu badania pilotażowego wybrano 14 osobników, które utrzymywały glikemie w zakresie 250-350 mg/dl. Zwierzęta te podzielono na dwie grupy. Grupa I otrzymywała podskórne iniekcje insuliny NPH (neutral protamin Hagedorn) w dawce 5 j.m./kg masy ciała, natomiast grupa II (grupa kontrolna) otrzymywała iniekcje soli fizjologicznej (0.9% NaCl). Po 21 dniach stabilizacji glikemii w grupie I (glikemie w zakresie 80-150 mg/dl), w obydwu grupach dokonywano wytworzenia powierzchownej rany. Za pomocą skalpela usuwano z grzbietu cienką warstwę naskórka oraz skóry właściwej o wymiarach 1,5 cm x 2,5 cm, następnie ostrzykiwano roztworem lipopolisacharydu

uzyskanego z *Pseudomonas aeruginosa* o stężeniu 5mg/dl (celem imitacji warunków miejscowego stanu zapalnego) i ostatecznie ranę zabezpieczano za pomocą opatrunku. Opatrunki zmieniano co 3 dni celem dokonania pomiarów rany oraz pobierania wycinków z rany do oceny histopatologicznej.

Trudności między innymi w zakresie stabilizacji procesu gojenia rany w badaniu pierwszym, pilotażowym (opisane w Rozdziale 4., uzasadniającym połączenie opisywanych prac w cykl), stały się podstawą do modyfikacji protokołu badania drugiego. Badanie nr 2, przeprowadzono na grupie 200 szczurów rasy Wistar płci męskiej, chowu wsobnego, u których wywoływano cukrzycę metodą analogiczną jak w badaniu nr 1. W fazie wstępnej, służącej do określenia odpowiedniej dawki leków przeciwcukrzycowych, wykorzystano 120 szczurów. Założeniem było uzyskanie glikemii w przedziale 350-450 mg/dl. W ostatecznej fazie badania wykorzystano 45 osobników o najbardziej stabilnych glikemiach. Osobniki te podzielono na 3 grupy. W grupie I podawano dootrzewnowo insulinę ludzką NPH (5 j./kg m.c. raz dziennie), grupa II otrzymywała dożołądkowo metforminę (500 mg/kg m.c. raz dziennie), a grupa III (kontrolna) otrzymywała dootrzewnowo sól fizjologiczną (0.9% NaCl). Po 14 dniach leczenia przeciwcukrzycowego u szczurów dokonywano wytworzenia powierzchownej rany. Na grzbiecie szczurów wycinano cienką warstwę naskórka oraz skóry właściwej o wymiarach 2x2 cm i wszywano silikonowy krążek o średnicy 4 cm z otworem w środku w celu stabilizacji skóry i standaryzacji procesu gojenia. Celem monitorowania procesu gojenia rany co 3 dni dokonywano zarówno fotograficznej oceny wielkości rany, jak i pobierano biopsję z jej powierzchni. Proces gojenia się ran śledzono przez 9 dni. Próbki biopsyjne poddawano barwieniu hematoksyliną i eozyną (H+E), a także przeprowadzano badania immunohistochemiczne w celu oceny ekspresji markera proliferacji - antygenu Ki67.

## **Wyniki**

W pracy nr 1 zaobserwowano szybsze tempo gojenia rany u szczurów z grupy I otrzymującej insulinę. Średnia powierzchnia rany w 12. dniu po jej wytworzeniu w grupie I wynosiła 3808 px, natomiast w grupie II (kontrolnej) 13104 px, a procentowy stosunek powierzchni końcowej rany do początkowej wynosił odpowiednio w grupie I 8%, natomiast w grupie II – 23%. Analiza materiału biopsyjnego wykazała znacznie większe nagromadzenie komórek zapalnych oraz podwyższoną ekspresję miejscowego stanu zapalnego w grupie II (kontrolnej). W grupie I po pierwszych 3 dniach obserwowano przejściowe powiększenie powierzchni rany, czego nie obserwowano w grupie II. Wynik ten najprawdopodobniej był konsekwencją braku stabilizacji rany z uwagi na odmienny mechanizm gojenia ranu u

szczurów (zjawisko kontrakcji mięśnia *panniculus carnosus*) w sposób umożliwiający idealne porównanie wyników w każdym momencie czasowym. Konsekwencji wpływu tego mechanizmu na proces gojenia rany uniknięto w pracy nr 2 dzięki zastosowaniu opisywanych krążków silikonowych.

W pracy nr 2 średnie stężenia glukozy w badanych grupach po 30 dniach terapii insuliną lub metforminą oraz w grupie kontrolnej były podobne i mieściły się w przedziale 350-450 mg/dl, co odpowiadało zakładanemu celowi, jakim było odwzorowanie stanu niewyrównania metabolicznego cukrzycy. Takie przedziały glikemii utrzymywały się podczas całego procesu obserwacji gojenia rany, co było istotną modyfikacją w stosunku do pierwotnego modelu.

Średnie zmiany pola powierzchni rany ( $\pm$  odchylenie standardowe) wynosiły odpowiednio dla grupy I (insulina) -66,8% ( $\pm$  9,7%), grupy II (metformina) -40,4% ( $\pm$  15,8%) i grupy III (kontrolnej) -48,0% ( $\pm$  9,8%). Testy post-hoc Scheffégo i Bonferroniego wykazały istotne różnice pomiędzy grupą I (insulina) a grupą II (metformina), przy  $p < 0,002$  dla obu testów oraz pomiędzy grupą I (insulina) a grupą III (kontrolna), przy  $p < 0,03$  dla obu testów. Nie odnotowano natomiast istotnych różnic pomiędzy grupą otrzymującą metforminę (grupa II) a grupą kontrolną (grupa III) ( $p > 0,51$  dla obu testów). Dlatego najwyższy wskaźnik gojenia się ran dotyczył grupy insulinowej (grupa I).

Materiał biopsyjny pobrany od szczurów grupy I (leczonych insuliną) w analizie histopatologicznej wykazywał istotnie niższy poziom nacieku zapalnego aniżeli te uzyskane od szczurów leczonych metforminą (grupa II) oraz grupą kontrolną (grupa III). Ocena immunohistochemiczna wykazała największą gęstość ośrodków proliferacji (wyrażoną ekspresją markera proliferacji - antygenu Ki67) w grupie zwierząt leczonych insuliną (indeks proliferacyjny 27,5% vs 18%).

Wyniki badań 1 i 2 posłużyły do przygotowania pracy poglądowej (praca nr 3) podsumowującej dotychczasową wiedzę w zakresie przygotowania modelu zwierzęcego rany przewlekłej z towarzyszącą cukrzycą.

## **Wnioski**

Autorzy poszukiwali powtarzalnego modelu rany przewlekłej w cukrzycy, który mógłby znaleźć zastosowanie w badaniu wpływu różnych cząsteczek farmakologicznych na efektywność gojenia ran. Cel ten został osiągnięty, a wyniki drugiego z przeprowadzonych badań wykazały przydatność, uniwersalność oraz powtarzalność zaprojektowanego modelu zwierzęcego rany przewlekłej. W badaniu tym udowodniono, że insulina istotnie bardziej pobudza proces proliferacji komórek w łożysku rany w stosunku do metforminy, czego

dowodem była zwiększona ekspresja antygenu Ki67. Ponieważ badanie prowadzono w warunkach utrzymującej się na stałym poziomie hiperglikemii niezależnie od zastosowanych cząsteczek, efekt zmniejszenia powierzchni rany nie był zależny od zmian wartości glikemii. Badanie dowodzi, że na proces gojenia ran w cukrzycy ma wpływ zastosowanie konkretnego leku przeciwcukrzycowego. Uzyskany materiał może stanowić początek rozważań dotyczących szerokiego wpływu leków przeciwcukrzycowych, w tym insuliny, na mechanizmy gojenia się ran w cukrzycy. Ustalenie tych mechanizmów oraz próba molekularnego wyjaśnienia zauważalnego przyspieszenia gojenia ran w warunkach hiperglikemii u chorych leczonych insuliną będzie celem kolejnego etapu naszych badań.