

lek. Wiktor Paskal

Wpływ N-acetylocysteiny na gojenie ran chirurgicznych na modelu zwierzęcym

**Streszczenie rozprawy na stopień naukowy doktora nauk medycznych
w zakresie medycyny**

Promotor: prof. dr hab. n. med. Paweł Włodarski

Centrum Badań Przedklinicznych, Zakład Metodologii Badań Naukowych
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego



Rozprawa doktorska przed Radą I Wydziału Lekarskiego

Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Warszawa 2019

Wstęp: N-acetylocysteina (NAC) jest znanym i szeroko wykorzystywanym bezpośrednim i pośrednim antyoksydantem. Badania *in vitro* oraz *in vivo* wykazały jej dodatkowe korzystne właściwości przeciwzapalne, zmniejszające stres oksydacyjny uszkodzonych komórek. Szereg badań wykazało też jej pozytywny wpływ na proces gojenia ran. Celem niniejszej pracy było zbadanie czy NAC dodana do środka miejscowo znieczulającego stosowanego powszechnie przed planowym nacięciem skóry wpłynie na proces gojenia.

Materiały i metody: Projekt badania uzyskał pozytywną opinię I Lokalnej Komisji Bioetycznej (Uchwała 304/2017). Wykorzystano 24 szczury, samce Sprague-Dawley, u których zaplanowano wykonanie 6 nacięć – po trzy nacięcia długości 15 mm po obu stronach grzbietu. W miejscu planowanych nacięć podawano środek miejscowo znieczulający z adrenaliną jako kontrolę, a po przeciwnej stronie podawano ten sam roztwór z dodatkiem jednego z trzech stężeń n-acetylocysteiny (0,015%, 0,03% lub 0,045%). Po wykonaniu nacięć, brzegi rany zbliżono 2 szwami materacowymi. Eutanazji zwierząt dokonywano w 3., 7., 14. i 60. dobie od zabiegu, pobierając całą ranę/bliznę, którą dzielono na 3 części i zachowywano do dalszych analiz. Z pobranych tkanek wykonano preparaty histologiczne z wykorzystaniem szeregu barwień: standardowego - hematoksyliną i eozyną, trichromem Massona oraz immunohistochemicznego przeciwko antygenom: CD31, CD68 oraz MPO. Uzyskano cyfrowe skany wysokiej rozdzielczości zabarwionych preparatów i poddano je klasycznej lub zautomatyzowanej ocenie. Dodatkowo, z bioptatów skóry wyizolowano RNA a następnie metodą qRT-PCR wykonano oznaczenie ekspresji 88 genów związanych z procesem gojenia ran. Makroskopowy efekt gojenia oceniono dokonując pomiarów wielkości blizn na podstawie wykonanej dokumentacji fotograficznej w 11 punktach czasowych. Do analizy statystycznej wykorzystano testy ANOVA, t-studenta, Mann-U Whitney.

Wyniki: NAC w żadnym spośród zastosowanych stężeń nie zmieniło istotnie budowy histologicznej skóry w porównaniu z blizną kontrolną, w różnych fazach gojenia. Pomiaru morfometryczne obrazów histologicznych wskazały, iż dodatek NAC w stężeniu 0,03% powoduje w 7. dobie większą powierzchnię ziarniny oraz bardziej nasilone obkurczenie rany ($p=0,04$ i $p=0,03$). W tym samym stężeniu odnotowano w tkance rany wyższą ekspresję CD31 oraz CD68 w 14. dobie gojenia. W każdym ze stosowanych stężeń NAC odnotowaliśmy obniżoną wariancję ułożenia włókien kolagenowych wokół blizny w 7. dobie, natomiast w 14. dobie zwiększało wariancję ich ułożenia w obrębie samej blizny ($p<0,05$). NAC nie wpływała na gęstość i dojrzałość włókien kolagenowych. NAC wywołała liczne i istotne statystycznie ($p<0,05$) zmiany w ekspresji genów we wszystkich punktach czasowych. W 3., 7. i 14. dobie

zwiększała ekspresję czynników wzrostowych i cytokin, białek związanych z hemostazą, ponadto wpłynęła na szlaki komórkowe w tym WNT/ β -katenina, HIF1 α i PTEN. Zwiększała ekspresję mRNA dla genów związanych z adhezją komórek oraz przebudową macierzy zewnątrzkomórkowej.

Największe zmiany w profilu ekspresji genów między tkankami otrzymującymi NAC a tkanką kontrolną zaobserwowano w 60. dobie. NAC zwiększała ekspresję cytokin, chemokin i czynników wzrostowych oraz licznych genów związanych z remodelingiem blizny m.in. ELANE, MMP9, CSK, ACTC1, integryny. Podobnie jak we wcześniejszych punktach czasowych, także 60 dni po zabiegu okolice ran poddane działaniu NAC wykazywały podwyższoną ekspresję HIF1 α . W analizie makroskopowej rany NAC w stężeniu 0,03% zmniejszało długość, szerokość i powierzchnię ran, z czego istotne statystycznie było zmniejszenie szerokości i powierzchni w 3. i 4. dobie ($p=0,02$).

Wnioski: Dodanie NAC do roztworu znieczulającego miejscowo wywołuje długotrwałe efekty biologiczne w gojącej się skórze i zmniejsza wymiary blizny. Obserwowany korzystny efekt nie niesie za sobą istotnych zmian w budowie histologicznej blizn. W stosowanych dawkach NAC nie wpływa istotnie na zmniejszenie stanu zapalnego wyrażonego zmianą profilu obecnych komórek zapalnych. Natomiast wywołuje w skórze szereg zmian wyrażonych podwyższoną ekspresją czynników wzrostowych, cytokin modulujących proces zapalny, białek przebudowujących macierz zewnątrzkomórkową. Ważną obserwacją poczynioną w tym badaniu jest stale zwiększona ekspresja czynnika transkrypcyjnego HIF1 α , który może być odpowiedzialny za wiele zmian w ekspresji cytokin, czynników wzrostowych i innych genów, które zaobserwowano w tym badaniu. Wyniki tych doświadczeń mogą posłużyć w przyszłości do planowania badań klinicznych, szczególnie u pacjentów z utrudnionym gojeniem, np. w przebiegu cukrzycy.



KIEROWNIK
Zakładu Metodologii Badań Naukowych



prof. dr hab. n. med. Paweł Włodarski