

Mgr Adriana Muchowska

**Wpływ wybranych związków hybrydowych zaadsorbowanych na preparatach  
keratynowych na proces gojenia ran w szczurzym modelu cukrzycy indukowanej  
streptozotocyną**

Rozprawa na stopień naukowy doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu  
w dyscyplinie nauki medyczne

Promotor: prof. dr hab. Aleksandra Misicka-Kęsik

Promotor pomocniczy: dr Piotr Kosson



Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Naukową  
Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej  
im. Mirosława Mossakowskiego PAN

Warszawa rok 2021

## Streszczenie

Jednym z powikłań nieleczzonej cukrzycy są źle gojące się owrzodzenia, które z czasem mogą doprowadzić do zapalenia kości i w konsekwencji do amputacji kończyn. Jak dotąd nie opracowano skutecznej metody leczenia przewlekłych owrzodzeń (ran) występujących w przebiegu cukrzycy, dlatego cały czas prowadzi się badania nad opracowaniem nowych potencjalnych leków.

W piśmiennictwie wśród związków, dla których wykazano pozytywny wpływ na gojenie ran znajdują się substancja P (SP) i opioidy. Dlatego w mojej rozprawie podjęto badania mające na celu określenie wpływu na gojenie ran w modelu zwierzęcym dwóch wybranych związków hybrydowych, które są pochodnymi SP i peptydów opioidowych. Oba badane związki hybrydowe AWL3106 i bifalina wykazują działanie przeciwbólowe, co ze względu na ból towarzyszący owrzodzeniom jest działaniem dodatkowo korzystnym.

Pierwszym etapem badań było, w oparciu o proponowane w literaturze modele zwierzęce, dopracowanie modelu doświadczalnego odzwierciedlającego proces gojenia się rany cukrzycowej. Opracowany model zakładał w pierwszej fazie eksperymentu wywołanie u szczurów cukrzycy, a następnie indukcję rany oparzeniowej, na którą nakładano zaplanowane w badaniach opatrunki i obserwowano proces gojenia.

Cukrzycę u szczurów wywoływano za pomocą streptozotocyny (STZ), która powoduje niszczenie komórek  $\beta$  tworzących miąższ wysepek Langerhansa w trzustce. Wywołaną cukrzycę monitorowano za pomocą pomiaru glikemii i masy ciała. Po wywołaniu cukrzycy ranę wyindukowano przez oparzenie, gdyż w przeciwieństwie do cukrzycy występującej u człowieka szczury nie rozwijają samorzutnie źle gojących się owrzodzeń. Stąd istotne było otrzymanie modelu trudno gojącej się rany cukrzycowej przez oparzenie skóry szczurów STZ.

Zasadnicze badania pracy doktorskiej polegały na przebadaniu różnych opatrunków na proces gojenia się wywołanych ran. Wyindukowaną ranę traktowano opatrunkami zawierającymi badane związki, które były wcześniej adsorbowane na preparatach keratynowych z wełny zwierzęcej (alpaki) otrzymanych wg. procedury opracowanej i opatentowanej przez Profesora Andrzeja Lipkowskiego. Przebadano zarówno preparaty keratynowe z zaadsorbowanymi związkami hybrydowymi: AWL3106 i bifaliną, jak i nieinkrustowane preparaty keratynowe.

Działanie opatrunków było porównywane do kontroli negatywnej, którą stanowił brak opatrunku i do kontroli dodatkowej, którą była maść stosowana u pacjentów z owrzodzeniami i oparzeniami – *iruxol®mono*.

Grupa badana składała się łącznie z 95 samców szczurów Wistar, a jako kontrolę użyto 23 samców szczurów Wistar.

Obserwacje gojenia się rany podzielono na trzy etapy. W pierwszym etapie oceny gojenia się rany mierzono pole powierzchni rany. W drugim etapie oceniano morfologiczne wykładniki gojenia się rany: ponowne naskórkowanie oraz odkładanie kolagenu. W trzecim etapie obserwacji dokonano oceny gojenia się rany za pomocą technik immunohistochemicznych (liczba makrofagów, fibroblastów, naczyń krwionośnych). W celu zobiektywizowania wyników zaproponowano użycie skali punktowej. Przyznawane punkty miały odzwierciedlać intensywność procesów towarzyszących gojącej się ranie. Natomiast uzyskana suma punktów miała zapewnić w miarę obiektywną ocenę skuteczności badanego opatrunku jako wskaźnika postępu gojenia.

W zaproponowanej w pracy skali gojenia się rany, największą liczbę punktów uzyskał preparat keratynowy z zaadsorbowanym związkami AWL3106, który był bardziej skuteczny od maści stosowanej u pacjentów z owrzodzeniami i oparzeniami – *iruxol@mono*. Także większy wpływ od *iruxol@mono* na gojącą się ranę miał preparat keratynowy z zaadsorbowaną bifalinią. W porównaniu do kontroli negatywnej oba badane związki zwiększały gojenie się trudnych ran. Natomiast preparat keratynowy bez zaadsorbowanego związku nie wpływał na gojenie rany, stanowił więc tylko pewnego rodzaju rusztowanie dla badanych związków.

Ze względu na szereg cech wspólnych modelu streptozotocynowego u szczurów z cukrzycą człowieka, a także podobieństwa oparzonej skóry szczura do rany cukrzycowej można stwierdzić, że model użyty w badaniu wydaje się adekwatnym modelem eksperymentalnym do oceny wpływu różnych substancji na proces regeneracji owrzodzeń u osób z cukrzycą. Zarówno parametry makro- i mikroskopowe gojenia się rany jak i ocena ilościowa procesu gojenia pozwalają na obiektywizację wyników bardzo złożonego i mało poznanego procesu gojenia się rany cukrzycowej. Zastosowane preparaty można ocenić jako przyszłe potencjalne składniki opatrunków na owrzodzenia występujące w stopie cukrzycowej.

Przeprowadzone badania pozwoliły na sformułowanie następujących wniosków:

1. Związki hybrydowe AWL3106 i bifalina zaadsorbowane na preparacie keratynowym z wełny alpaki i nakładane codziennie na rany szczurów Wistar ograniczają zapalenie, a także wspomagają fazę proliferacyjną gojenia rany. Otrzymane wyniki wskazują, że zarówno związek AWL3106 i bifalina mogą być zastosowane w trudno gojących się ranach cukrzycowych.
2. Zastosowanie związków hybrydowych AWL3106 i bifaliny przyspieszyło proces zarostania rany.

3. Wzrost liczby makrofagów po zastosowaniu obu związków hybrydowych AWL3106 i bifaliny w czwartym dniu gojenia się rany wskazuje, że obydwie związki istotnie zwiększają odpowiedź zapalną, a zmniejszenie liczby makrofagów w czternastym dniu gojenia po zastosowaniu związku AWL3106 oznacza, skrócenie fazy zapalnej.
4. Zwiększenie odkładania kolagenu po zastosowaniu związku AWL3106 pozwala na uzyskanie bardziej wytrzymałej na rozerwanie i rozciąganie blizny.
5. Po zastosowaniu bifaliny zaobserwowano zwiększenie grubości naskórka, co oznacza, że związek ten wpływa pozytywnie na ponowne naskórkowanie rany.
6. Zmiany obserwowane w strukturze naczyń krwionośnych po zastosowaniu związków hybrydowych AWL3106 i bifaliny wskazują, że oba związki wpływają w niewielkim stopniu na śródbłonek naczyń krwionośnych.
7. Zastosowany model owrzodzenia u szczurów naśladuje pod względem zastosowanych parametrów ranę cukrzycową u człowieka.
8. Zaprezentowana skala do oceny procesu gojenia się rany może być stosowana także do innych opatrunków.

Podsumowanie:

*Związki hybrydowe AWL3106 i bifalina zastosowane w zwierzęcym modelu trudno gojącej się rany skracają czas trwania zapalenia i wspomagają procesy zachodzące w fazie proliferacyjnej gojenia się rany. Działanie badanych związków określono bezpośrednio przez zliczenie makrofagów, fibroblastów, pomiar zawartości kolagenu, a także ocenę budowy i ułożenia włókien kolagenowych, budowę naczyń krwionośnych, grubość naskórka i pomiar zarastania rany.*