

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

Wyniki badań prezentowane w rozprawie zostały opublikowane w:

Muchowska A., Redkiewicz P., Różycki K., Matalińska J., Lipiński P., Czuwara J., Kosson P.,
*The analgesic hybrid of dermorphin/substance P and analog of enkephalin improve wound
healing in streptozotocin-induced diabetic rats.*

Wound Repair and Regeneration 28, 177–184, 2020 doi:10.1111/wrr.12775

**Badania naukowe przedstawione w pracy były finansowane z projektu MMRC-KNOW
2013-2017.**

*Dziękuję Pani prof. dr hab. Aleksandrze Misickiej-Kęsik i dr Piotrowi Kosson
za serdeczność, cierpliwość i pomoc przy realizacji pracy doktorskiej.*

*Chciałabym podziękować także dwóm osobom, które bardzo mnie wspierały
przy powstawaniu tej pracy dr Joannie Matalińskiej i dr Patrycji Redkiewicz.*

*Dziękuję również dr Piotrowi Lipińskiemu, Krzysztofowi Różyckiemu,
pani dr Joannie Czuwarze, pani Zdzisławie Kowalskiej i Marcie Bochyńskiej-Czyż.*

*Serdecznie dziękuję też pozostałym kolegom, koleżankom i pracownikom
Zakładu Neuropeptydów, jak i IMDiK PAN.*

*Jestem wdzięczna bliskim mi Osobom za wyrozumiałość
w czasie badań i przygotowania pracy doktorskiej.*

Pracę tę dedykuję śp. Profesorowi dr hab. Andrzejowi Lipkowskiemu.

Wykaz ważniejszych skrótów i nazw używanych w pracy

Nazwa	Rozwinięcie
Akt	ang. <i>RAC-alpha serine/threonine-protein kinase</i> , kinaza serynowo-treoninowa / kinaza białkowa B
Alpaka	łac. <i>Vicugna pacos</i> , gatunek należący do rodziny wielbłądowatych (Camelidae) o wysokiej jakości wełny, jest zwierzęciem pastwiskowym stadnym, pochodzącym z Ameryki Południowej
AWL3106	związek hybrydowy, agonista receptorów μ , δ i NK-1, pochodna dermorfiny i substancji P
Bifalina	związek hybrydowy, agonista receptorów μ i δ , dimeryczna pochodna enkefaliny
CD34	ang. <i>cluster of differentiation 34</i> , transbłonowa glikoproteina należąca do molekuł sialomucyn
CD68	ang. <i>cluster of differentiation 68</i> , białko błony lizosomalnej charakteryzujące makrofagi
CGRP	ang. <i>calcitonin gene-related peptide</i> , peptyd związany z genem kalcytoniny
CK16	ang. <i>cytokeratin 16</i> , cytokeratyna 16
ECM	ang. <i>extracellular matrix</i> , macierz pozakomórkowa
EGF	ang. <i>epidermal growth factor</i> , naskórkowy czynnik wzrostu
EPC	ang. <i>endothelial progenitor cells</i> , komórki progenitorowe śródbłónka
ERK 1/2	ang. <i>extracellular signal-regulated kinase 1 and 2</i> , kinaza aktywowana przez czynniki pozakomórkowe 1 i 2
GM-CSF	ang. <i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i> , czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów
H&E	ang. <i>hematoxylin and eosin</i> , hematoksylina i eozyna
IgG	ang. <i>immunoglobulin G</i> , przeciwciała typu G
IL-6	ang. <i>interleukin 6</i> , interleukina 6
IL-10	ang. <i>interleukin 10</i> , interleukina 10
iNOS	ang. <i>inducible nitric oxide synthase</i> , indukowana syntaza tlenku azotu
M1	ang. <i>type 1 macrophages</i> , makrofagi typu 1 / makrofagi aktywowane klasycznie

M2	ang. <i>type 2 macrophages</i> , makrofagi typu 2 / makrofagi aktywowane alternatywnie
MMPs	ang. <i>matrix metalloproteinases</i> , metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej
MMP-2	ang. <i>matrix metalloproteinases 2</i> , metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej 2
MMP-9	ang. <i>matrix metalloproteinases 9</i> , metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej 9
mTOR	ang. <i>mammalian target of rapamycin kinase</i> , ssacza kinaza serynowo-treoninowa hamowana przez rapamycynę
NGF	ang. <i>nerve growth factor</i> , czynnik wzrostu nerwów
NK-1	ang. <i>neurokinin-1 receptor</i> , receptor neurokininy-1
NO	ang. <i>nitric oxide</i> , tlenek azotu
OUN	ośrodkowy układ nerwowy
PBS	ang. <i>phosphate buffered saline</i> , sól fizjologiczna buforowana fosforanem
PNS	ang. <i>peripheral nervous system</i> , obwodowy układ nerwowy
SD	ang. <i>Sprague Dawley</i> , szczury stada Sprague Dawley
SP	ang. <i>substance P</i> , substancja P
STAT3	ang. <i>signal transducer and activator of transcription 3</i> , przekaźnik sygnału i aktywator transkrypcji 3
STZ	ang. <i>streptozotocin</i> , streptozotocyna
T1DM	ang. <i>type 1 diabetes mellitus</i> , cukrzyca typu 1
TGF-β	ang. <i>transforming growth factor β</i> , transformujący czynnik wzrostu β
TGF-β1	ang. <i>transforming growth factor β1</i> , transformujący czynnik wzrostu β 1
TNF-α	ang. <i>tumor necrosis factor α</i> , czynnik martwicy nowotworu α
VEGF	ang. <i>vascular endothelial growth factor</i> , czynnik wzrostu śródbłonna naczyń
ZSC	zespół stopy cukrzycowej
α-SMA	ang. <i>α-smooth muscle actin</i> , α -aktyna mięśni gładkich

Streszczenie

Jednym z powikłań nieleczonej 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 β 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.

Abstract

One of the complications of untreated diabetes is ulcers that heal poorly, which over time can lead to osteitis and, consequently, amputation of the limbs. So far, no effective method of treating chronic ulcers (wounds) during diabetes has been developed, and therefore research is continuing towards the development of new potential drugs.

Substance P (SP) and opioids are among the compounds that have been shown to have a positive effect on wound healing in the medical literature. Therefore, in my dissertation, studies were undertaken to determine the effect on wound healing in an animal model of two selected hybrid compounds, which are derivatives of SP and opioid peptides. Both the tested hybrid compounds AWL3106 and biphalin show an analgesic effect, which is additionally beneficial due to the pain accompanying ulcerations.

The first stage of the research was to refine an experimental model reflecting the healing process of a diabetic wound, based on animal models proposed in the literature. The developed model assumed in the first phase of the experimental induction of diabetes mellitus in rats and then induction of a burn wound, on which the dressings planned in the research were applied and the healing process was observed.

Diabetes mellitus in rats was induced by streptozotocin (STZ), which destroys the β -cells that make up the parenchyma of Langerhans islets in the pancreas. Induced diabetes was monitored by measuring blood glucose and body weight. After induction of diabetes mellitus, a burn-induced wound develops as diabetes in rats, unlike human diabetes, does not cause the development of spontaneously poorly healing ulcers. Hence, it was important to obtain a model of a difficult-to-heal diabetic wound from a skin burn of STZ rats.

The main research of the doctoral dissertation consisted in testing various dressings for the healing process of the induced wounds. The induced wound was treated with dressings containing the tested compounds, which had previously been adsorbed in keratin preparations made of animal wool (alpaca) prepared according to a procedure developed and patented by the late Professor Andrzej Lipkowski. Both keratin preparations with adsorbed hybrid compounds: AWL3106 and biphalin, as well as non-incrusted keratin preparations were tested.

The performance of the dressings was compared to the negative control, which was with no dressing, and to the additional control, which was the ointment used in patients with ulceration and burns – *iruxol®mono*.

The test group consisted of a total of 95 male Wistar rats, and 23 male Wistar rats were used as controls.

Wound healing observations were divided into three stages. In the first stage of wound healing evaluation, the wound surface area was measured. In the second stage, the morphological markers of wound healing were assessed: re-epithelization and collagen deposition. In the third stage of observation, wound healing was assessed using immunohistochemical techniques (the number of macrophages, fibroblasts, and blood vessels). In order to objectify the results, the use of a scale was proposed. Points were awarded to reflect the intensity of the processes accompanying the healing of the wound. However, the obtained sum of points was to provide an objective assessment of the effectiveness of the tested dressing and it was a quantitative indicator of healing progress.

In the wound healing scale proposed in the study, the keratin preparation with adsorbed compound AWL3106 received the highest number of points, which was more effective than the ointment used in patients with ulcers and burns - *iruxol®mono*. The keratin preparation with adsorbed biphalin also had a greater effect than *iruxol®mono* on wound healing. Compared to the negative control, both tested compounds increased the healing of hard-to-heal wounds. On the other hand, the keratin preparation without the adsorbed compound did not affect the wound healing, so it was only a kind of scaffold for the tested compounds.

Due to a number of common features of the streptozotocin model in human diabetic rats, as well as the similarity of burned rat skin to a diabetic wound, it can be concluded that the model used in the study seems to be an adequate experimental model for assessing the effect of various substances on the ulcer regeneration process in people with diabetes. Both the macro- and microscopic parameters of wound healing and the quantitative assessment of the healing process allow for the objectification of the results of a very complex and little-known process of diabetic wound healing. The applied preparations can be assessed as future potential components of dressings for diabetic foot ulcers.

The conducted research allowed for the formulation of the following conclusions:

1. Hybrid compounds AWL3106 and biphalin adsorbed on a keratin preparation made of alpaca wool and applied daily to wounds of Wistar rats reduce inflammation and promote the proliferative phase of wound healing. The obtained results indicate that both the compound AWL3106 and biphalin can be used in diabetic wounds that are difficult to heal.
2. The application of hybrid compounds AWL3106 and biphalin accelerated the process of wound contraction.
3. The increase in the number of macrophages after the use of both hybrid compounds AWL3106 and biphalin on the fourth day of wound healing indicates that both

compounds significantly increase the inflammatory response, and the decrease in the number of macrophages on the fourteenth day of healing after the application of compounds AWL3106 means a shortening of the inflammatory phase.

4. Increasing collagen deposition after application the compound AWL3106 allows for a scar that is more resistant to tearing and stretching.
5. After the application of biphalin, an increase in the thickness of the epidermis was observed, which means that this compound has a positive effect on the re-epithelialization of the wound.
6. The changes observed in the structure of blood vessels after the application of hybrid compounds AWL3106 and biphalin indicate that both compounds have little effect on the endothelium of blood vessels.
7. The applied model of ulceration in rats mimics the parameters of the human diabetic wound.
8. The presented scale for assessing the wound healing process can also be applied to other dressings.

Conclusion:

Hybrid compounds AWL3106 and biphalin used in an animal model of a difficult-to-heal wound reduce the duration of inflammation and support the processes occurring in the proliferative phase of wound healing. The effect of the tested compounds was determined directly by counting macrophages, fibroblasts, measuring the collagen content, as well as assessing the structure and arrangement of collagen fibers, the structure of blood vessels, measuring the thickness of the epidermis and wound contraction.

Spis treści

Wykaz ważniejszych skrótów i nazw używanych w pracy.....	7
Streszczenie.....	9
Abstract.....	13
Innowacyjność pracy.....	21
1. Wstęp.....	23
1.1. Stopa cukrzycowa jedna z najczęstszych trudno gojących się ran	23
1.1.1. Epidemiologia stopy cukrzycowej.....	23
1.1.2. Przyczyny powstawania stopy cukrzycowej i najczęstsze powikłania.....	23
1.1.3. Streptozotocynowy model cukrzycy.....	25
1.1.4. Modele rany cukrzycowej.....	27
1.2. Fizjologia gojenia rany z elementami patofizjologii rany cukrzycowej.....	32
1.2.1. Naciek makrofagów.....	32
1.2.2. Ponowne naskórkowanie.....	35
1.2.3. Neowaskularyzacja.....	37
1.2.4. Proliferacja fibroblastów.....	39
1.2.5. Tworzenie włókien kolagenowych.....	40
1.2.6. Patofizjologia modelu rany cukrzycowej.....	42
1.3. Leczenie trudno gojących ran – kolagenaza.....	43
1.4. Endogenne neuropeptydy i białka wspomagające gojenie ran.....	44
1.4.1. Substancja P.....	44
1.4.2. Peptydy opioidowe.....	47
1.4.2.1. Bifalina	48
1.4.3. Preparaty keratynowe.....	50
2. Założenia i cel pracy.....	52
3. Materiały i metody.....	54
3.1. Zwierzęta doświadczalne.....	54
3.1.1. Wywołanie cukrzycy u szczurów.....	56
3.2. Indukowanie rany i postępowanie z raną.....	56

3.3.	Badane związki i sposób ich podania.....	56
3.4.	Podział szczurów na grupy.....	58
3.5.	Ocena wpływu badanych związków na proces gojenia ran.....	60
3.5.1.	Pomiar pola powierzchni ran.....	60
3.5.2.	Przygotowanie tkanek do barwień i oznaczeń immunohistochemicznych..	62
3.5.2.1.	Barwienie hematoksyliną i eozyną.....	62
3.5.2.2.	Barwienie trichromem wg. Masson'a.....	62
3.5.2.3.	Oznaczenie makrofagów / naczyń krwionośnych / fibroblastów pierwszorzędowym przeciwciałem skierowanym przeciwko antygenowi CD68/CD34/wimentynie.....	63
3.5.3.	Ocena preparatów i analiza immunohistochemiczna pod mikroskopem światlnym.....	63
3.6.	Analiza statystyczna.....	64
4.	Wyniki	65
4.1.	Ocena rozwoju cukrzycy wywołanej iniekcją streptozotocyny u szczurów.....	65
4.2.	Ocena gojenia się modelowego owrzodzenia.....	66
4.2.1.	Pole powierzchni rany.....	67
4.2.2.	Badania histopatologiczne.....	67
4.2.3.	Badania immunohistochemiczne.....	69
4.3.	Ocena wpływu <i>iruxol®mono</i> na proces gojenia się trudno gojącej rany.....	72
4.3.1.	Wpływ <i>iruxol®mono</i> na liczbę makrofagów.....	72
4.3.2.	Wpływ <i>iruxol®mono</i> na liczbę naczyń krwionośnych.....	72
4.3.3.	Wpływ <i>iruxol®mono</i> na procesy zachodzące w ranie.....	73
4.4.	Ocena wpływu związku AWL3106 na proces gojenia się trudno gojącej rany.....	75
4.4.1.	Wpływ związku AWL3106 na zarastanie rany.....	75
4.4.2.	Wpływ związku AWL3106 na liczbę makrofagów.....	75
4.4.3.	Wpływ związku AWL3106 na odkładanie kolagenu.....	76
4.4.4.	Wpływ związku AWL3106 na procesy zachodzące w ranie.....	77
4.5.	Ocena wpływu bifaliny na proces gojenia się trudno gojącej rany.....	79
4.5.1.	Wpływ bifaliny na zarastanie rany.....	79
4.5.2.	Wpływ bifaliny na liczbę makrofagów.....	79
4.5.3.	Wpływ bifaliny na grubość naskórka.....	80
4.5.4.	Wpływ bifaliny na procesy zachodzące w ranie.....	81

4.6. Ocena wpływu preparatu keratynowego na proces gojenia się trudno gojącej rany.....	82
5. Dyskusja.....	86
6. Podsumowanie i wnioski.....	97
Piśmiennictwo.....	99

Innowacyjność pracy

W mojej pracy doktorskiej zawarto następujące elementy innowacyjności z zakresu:

I. badań przedklinicznych

1. Opracowanie modelu trudno gojącej rany

- pojedyncza rana na zwierzęciu uzyskana przez oparzenie skóry samca szczura Wistar z 10-tygodniową cukrzycą wywołaną streptozotocyną

2. Zastosowanie związków o budowie peptydów hybrydowych:

- AWL3106 będącego pochodną dermorfiny i substancji P
- bifaliny będącej dimeryczną pochodną enkefaliny

w modelu trudno gojącej rany (opis modelu pkt. 1) naśladującej owrzodzenie w stopie cukrzycowej

3. Zastosowanie nowego źródła keratyny jako nośnika dla związków

- keratyna uzyskana z wełny alpaki

4. Opracowanie sposobu oceny skuteczności opatrunku

- skala opierająca się na punktach odzwierciedlających nasilenie procesów zachodzących w gojącej się ranie

II. nowych terapii w leczeniu trudno gojących ran

1. Związek o właściwościach przyspieszających zarastanie rany, zwiększający odpowiedź zapalną, zwiększający ilość odłożonego kolagenu w odbudowującej się tkance

- związek AWL3106

2. Związek o właściwościach przyspieszających zarastanie rany, zwiększający odpowiedź zapalną, grubość naskórka

- bifalina

3. Białko pełniące funkcję nośnika związków

- rusztowania keratynowe uzyskana z wełny alpaki

1. Wstęp

1.1. Stopa cukrzycowa jedna z najczęstszych trudno gojących się ran

Zgodnie z definicją WHO (ang. *World Health Organization*, Światowa Organizacja Zdrowia) *stopa cukrzycowa / zespół stopy cukrzycowej (ZSC)* oznacza zakażenie, owrzodzenie lub zniszczenie głębokich tkanek związanych z zaburzeniami neurologicznymi i różnym zaawansowaniem chorób naczyń obwodowych kończyn dolnych. Powstaje na skutek cukrzycy i jej powikłań. Można ją podzielić na: neuropatyczną, niedokrwinną i mieszaną. Typ ZSC zależy od przeważającego czynnika etiologicznego. Dotyczy zmian czynnościowych i morfologicznych, które występują w skórze, kościach, mięśniach, nerwach i naczyniach krwionośnych stopy. (Drzewoski 2010)

1.1.1. Epidemiologia stopy cukrzycowej

W Polsce odsetek osób z ZSC wynosi 1,7%. Prawdopodobieństwo wystąpienia ZSC u chorego na cukrzycę to 15÷25%. Najczęściej właśnie ze względu na ZSC pacjenci z cukrzycą są hospitalizowani (ogółem 25%). Około 80% amputacji, niewynikających z urazu, jest wywołanych cukrzycą. Taką operację przeprowadza się, co 30 sekund na świecie. W 85% przypadków poprzedza ją wystąpienie wrzodu. U osób po amputacji pojawiają się często nowe owrzodzenia, które prowadzą do powtórnej operacji. (Muhammad Ibrahim 2019)

1.1.2. Przyczyny powstawania stopy cukrzycowej i najczęstsze powikłania

Przyczyna powstania owrzodzenia jest wieloczynnikowa. Powstaje ono na skutek modzeli, źle dopasowanego lub nowego obuwia, deformacji i niewłaściwej pielęgnacji stóp, ich urazów, oparzenia, odleżyn pięt, suchej skóry, upośledzonego krążenia obwodowego, neuropatii obwodowej i niewyrównanego poziomu glukozy we krwi. (Watkins 2004, Oliver i Mutluoglu 2020).

Do trzech głównych przyczyn powstania stopy cukrzycowej należy zaliczyć zmiany neuropatyczne, naczyniowe i czynnik mechaniczny (Drzewoski 2010). W wyniku neuropatii cukrzycowej, która rozwija się u około 60% diabetyków dochodzi do nieprawidłowości anatomicznych i strukturalnych. Można je podzielić na czuciowe, motoryczne i autonomiczne. Do owrzodzenia dochodzi wtedy, gdy do obwodowej neuropatii czuciowej dołączają obwodowe nieprawidłowości autonomiczne i ruchowe. Na skutek tej neuropatii, uraz w początkowej fazie jest bezbolesny, co prowadzi do jego pogłębiania (Aguilar i wsp. 2012, Oliver i Mutluoglu 2020). Na początku chory nie odczuwa ucisku buta na stopę i uszkodzenie kończyny zauważa dopiero po dłuższym czasie. Deformacje strukturalne i nadmierny ucisk

prowadzą do rozwoju rany. Trzeci rodzaj neuropatii (autonomiczna) charakteryzuje się tym, że w dolnych kończynach prowadzi do rozszerzenia żył stóp i małych tętnic. U chorych obserwuje się wysuszoną i pozbawioną owłosienia skórę, a także przebarwienia w dolnej części nóg. W takiej sztywnej i suchej skórze powstają bruzdy i modzele dookoła urazu. Są one zlokalizowane głównie na pierwszym stawie śródstopno-paliczkowym (MTP, ang. *metatarsophalangeal joint*), krawędzi pięty i części przyśrodkowej podeszwy stopy. Uszkodzenia skóry mogą prowadzić do małych podłużnych owrzodzeń. (Aguilar i wsp. 2012)

Oprócz neuropatii udział w rozwoju owrzodzenia stopy cukrzycowej i następczych amputacji ma palenie tytoniu, hipertriglicydemia lub PAD (ang. *peripheral artery disease*, choroba tętnic obwodowych), która może prowadzić do rozwoju martwicy i zgorzeli. Amputacja kończyny dolnej jak i samo ZSC są prawdopodobnie zależne od statusu społeczno-ekonomicznego, czynników biologicznych i środowiskowych. (Shi 2019, Oliver i Mutluoglu 2020)

Podwyższony poziom glukozy we krwi powoduje zwiększenie stresu oksydacyjnego, glikacji białek i lipidów komórkowych. Późniejsze wyrównanie jej poziomu nie wpływa na zatrzymanie tych patologicznych procesów. Organizm „zapamiętuje” stan hiperglikemiczny i długoterminowo można obserwować jej skutki. (Otto-Buczowska 2014) Pamięć metaboliczna, czyli utrwalenie procesów biochemicznych, takich jak zwiększenie produkcji wolnych rodników przez mitochondria komórkowe na skutek długotrwałego działania dużych stężeń glukozy, które prowadzą do późnych powikłań cukrzycy, a głównie do mikro- i makroangiopatii (Drzewoski 2010) jest jednym z czynników, który utrudnia walkę z ranami cukrzycowymi. Dłuższy okres utrzymującej się wcześniej długotrwałej hiperglikemii ma wpływ na rodzaj przyszłych powikłań cukrzycy pomimo już wyrównanego poziomu glukozy we krwi. Na skutek pamięci metabolicznej podawanie insuliny nie powoduje zanikania powikłań naczyniowych. Pozostające wzorce epigenetyczne związane z hiperglikemią, odtwarzają fenotyp cukrzycowy. (Otto-Buczowska 2014, Jhamb i wsp. 2016) Każda komórka ma swoje własne wzorce epigenetyczne, które określają ekspresję genów. Ich zmiana w komórce powoduje zmianę ekspresji genów i „tożsamości” komórki. Do modyfikacji epigenetycznych należą: modyfikacja histonów i metylacja DNA. (Kubota i wsp. 2013)

Ze względu na ciągły wzrost liczby zachorowań na cukrzycę nawet szybki postęp medycyny nie skutkuje zmniejszeniem liczby powikłań cukrzycy i śmiertelności przez nią wywołanej. W ciągu pięciu lat śmiertelność związana z ZSC, w przypadku której była konieczna amputacja, wynosiła od 39÷80%. (Shi 2019).

1.1.3. Streptozotocynowy model cukrzycy

Streptozotocyna (ang. *streptozotocin*, STZ) pozwala wyindukować chemicznie eksperymentalną cukrzycę typu 1 (T1DM, ang. *type 1 diabetes mellitus*) – model T1DM. Cukrzyca jest chorobą autoimmunologiczną. Powstaje w wyniku nieodwracalnego niedoboru insuliny powstałego na skutek zniszczenia komórek β trzustki przez martwicę. Stan ją naśladujący można osiągnąć stosując diabetogenny czynnik STZ, ponieważ STZ jest podobna pod względem struktury do glukozy. (Szkudelski 2001, Akbarzadeh i wsp. 2007, Šoltésová i Herichová 2014) Po raz pierwszy takie działanie STZ opisał w 1963 r. Rakieten i wsp. Obecnie po wpisaniu do PubMed Central® hasła „streptozotocin diabetes” wyświetla się 150 102 publikacje (dane na 02.03.2021 r.). Ilość dostępnych prac nie zmienia faktu, że zaplanowanie precyzyjnego doświadczenia stosując ten chemiczny związek w celu wywołania cukrzycy jest trudne. (Deeds i wsp. 2011) Jednak liczne dane literaturowe od poznania pochodzenia antybiotyku STZ przez zakres stosowanych dawek do późnych powikłań występujących po podaniu tego środka chemicznego ułatwiają zrozumienie modelu T1DM i jego wartości w badaniach nad cukrzycą. I tak antybiotyk ten jest produkowany przez drobnoustroje glebowe *Streptomyces achromogenes* o szerokim spektrum właściwości przeciwbakteryjnych. Wcześniej stosowano izolowane, a obecnie używa się syntetyczne STZ, które podane w dużej dawce powoduje selektywną toksyczność komórek β . Dzięki wielu badaniom prowadzonym nad mechanizmem jej działania obecnie jest on dobrze poznany. Proces niszczenia komórek β trzustki można podzielić na 3 fazy. W ostatniej obserwuje się wysoki poziom glukozy i zahamowane wydzielanie insuliny. (Szkudelski 2001, Wu i Huan 2008, Lenzen 2008, King 2012, Sharma i wsp. 2013, Šoltésová i Herichová 2014, Tripathi i Verma 2014)

Proces niszczenia komórek β trzustki jest jednak bardziej złożony i zaczyna się od wniknięcia do komórek β STZ. Duże podobieństwo STZ i cząsteczki glukozy sprawia, że STZ z łatwością dostaje się do wnętrza komórek β przez transporter monosacharydu o nazwie GLUT2 (ang. *glucose transporter 2*, transporter glukozy 2) zlokalizowany w błonach komórek β . GLUT2 wykazuje niskie powinowactwo do glukozy, co znaczy, że łatwiej łączy się z STZ niż z glukozą. Dlatego z czasem STZ uniemożliwia jej późniejszy transport do komórek trzustki. (Szkudelski 2001, Fröde i Medeiros 2008, King 2012, Sharma i wsp. 2013, Magier i Jarzyna 2013, Šoltésová i Herichová 2014, Tripathi i Verma 2014)

Diabetogenne działanie związku STZ obserwuje się po podaniu pozajelitowym (Sharma i wsp. 2013). Jedną z prac, która przedstawia protokół przeprowadzenia indukcji cukrzycy za pomocą STZ jest praca Wu i Huan 2008. Jednak według Deeds i wsp. 2011 nie ma standardowego protokołu dla dawki, podania czy sporządzenia roztworu, który następnie jest

podawany zwierzęciu. Za pomocą modelu STZ można uzyskać łagodną jak i ciężką postać cukrzycy. Zastosowanie pojedynczej dużej dawki STZ wpływa bezpośrednio na toksyczność dla komórek β trzustki, prawie zupełnie je niszcząc i prowadząc do wystąpienia ciężkiej postaci T1DM z niewielką lub niewykrywalną ilością produkowanej insuliny. Do doświadczeń używa się zwykle szczególnie wrażliwych szczurów m.in. stada Wistar. (Wu i Huan 2008, Deeds i wsp. 2011) Jak zauważa Deeds i wsp. 2011 do badań z użyciem STZ pod względem płci bardziej odpowiednie wydają się samce szczurów tego gatunku, gdyż są bardziej podatne na STZ. Mniejsza wrażliwość u samic wynika prawdopodobnie z faktu, że estradiol chroni samice przed apoptozą komórek β trzustki wywołaną stresem oksydacyjnym. (Le i wsp. 2006)

Najczęściej stosowanym zwierzęcym modelem ludzkiej cukrzycy jest szczurzy model streptozotocynowy. Po podaniu STZ obserwuje się u nich stabilne objawy tej choroby, wśród których należy wymienić hiperglikemię, poliurię, polidypsję, polifagię, brak przyrostu masy ciała, mniejszą objętość insuliny i peptydu C. Występuje wiele symptomów podobnych do cukrzycy u ludzi. (Wei i wsp. 2003, Akbarzadeh i wsp. 2007, Wu i Huan 2008, Šoltésová i Herichová 2014) Model cukrzycy indukowanej tym związkiem chemicznym jest dobrym modelem do badania rodzaju powikłań powstających na skutek działania hiperglikemii. (Le i wsp. 2011) Zmiany jakie zachodzą po podaniu STZ zostały przedstawione w pracach DePre i wsp. 2000, Wei i wsp. 2003 oraz Howarth i wsp. 2005. I tak samo jak u ludzi z cukrzycą obserwuje się zaburzony metabolizm porównywalnie dzieje się w organizmie szczura z cukrzycą wyindukowaną STZ. Obserwuje się także zmniejszenie częstości akcji serca czy zmienność jego rytmu i zaćmę. (Wei i wsp. 2003, Howarth i wsp. 2005, Akbarzadeh i wsp. 2007, Wu i Huan 2008, Šoltésová i Herichová 2014) Jak podaje Wei i wsp. 2003 szczury po podaniu STZ rozwijają ślepotę, która następuje po 4 miesiącach i jest wynikiem zaćmy. Model T1DM tego związku prowadzi do takich powikłań jak miażdżyca, neuropatia i nefropatia cukrzycowa. (Akbarzadeh i wsp. 2007) Według Wei i wsp. 2003 zmiany powstałe w organizmie po długotrwałym działaniu diabetogennym w modelu T1DM mogą posłużyć za model przewlekłych powikłań cukrzycy u ludzi i zostać wykorzystane do badania preparatów, które posłużą do ich leczenia.

Podsumowując, dane literaturowe zawierają szczegółowe informacje dotyczące zarówno wywołania cukrzycy przez STZ, jak i rodzaje powikłań, które mogą wystąpić na skutek podania STZ. Śmiertelność z jej udziałem jest bardzo niska, przy właściwym podawaniu prawie zerowa, w przeciwieństwie do innego związku używanego do wywołania cukrzycy – alloxanu, który ma wąski zakres dawki i powoduje wysoką śmiertelność (Fröde i Medeiros 2008, Sharma i wsp. 2013, Šoltésová i Herichová 2014). Znany jest mechanizm wywołujący

cukrzycę (niszczenie trzustki), powikłania i zmiany w skórze po jej zastosowaniu. Sama indukcja choroby jest nieskomplikowana i szybka.

1.1.4. Modele rany cukrzycowej

Prowadzenie badań nad opracowaniem nowych leków umożliwiają modele *in vitro* i *in vivo*, które w pewnym zakresie naśladują choroby, na które zapada człowiek. Rana cukrzycowa wymaga modelu *in vivo*, gdyż proces gojenia ran jest wieloczynnikowy i jest zakłócany przez czynniki wewnętrzne (procesy, związki), które nie zostały do końca poznane. Z powodu dużych różnic gatunkowych żaden ze zwierzęcych modeli zaproponowanych w literaturze nie odzwierciedla w pełni wszystkich cech rany przewlekłej występującej u ludzi. Jednak opracowane zwierzęce modele umożliwiają wgląd w mechanizmy molekularne procesów zachodzących w ranie, jak również pozwalają testować możliwe środki terapeutyczne. (Dorsett-Martin i Wysocki 2008, Nunan i wsp. 2014)

W literaturze nie ma danych, które stado jest optymalne do modelowania rany i wyróżnia się na tle pozostałych zwierząt. Na pewno ważnym kryterium jest możliwość jak najdokładniejszego pomiaru powierzchni rany. Szczury SD (ang. *Sprague Dawley*, szczury stada Sprague Dawley) i Wistar należą do najczęściej stosowanych niespokrewnionych stad. Oba są łagodne i mogą być stosowane w różnych doświadczeniach. Przy wyborze zwierzęcia istotne kryterium stanowi płeć. Samice szczurów charakteryzują się cienką skórą, która goi się przez obkurczenie rany i szybciej niż u samców. Rany u tych drugich mają tendencję do gojenia się przez naskórkowanie. W dodatku wiadomo, że niedobór estrogenów upośledza gojenie ran skórnych. Podsumowując, można stwierdzić, że najlepszym modelem jest model *in vivo* z wykorzystaniem samców szczurów SD czy Wistar.

Zewnętrzna bariera jaką jest skóra, ma za zadanie chronić wnętrze organizmu przed środowiskiem zewnętrznym np. szkodliwymi mikroorganizmami takimi jak bakterie chorobotwórcze i ciałami obcymi np. drzazgą. Budowa skóry jest różna u różnych gatunków. Dlatego przed wyborem szczura do modelowania rany cukrzycowej człowieka należy poznać różnice w histologii ich skóry (tab. 1.1). Zrozumienie odrębności w jej anatomii i strukturze jest kluczowe w planowaniu doświadczeń. W budowie skóry szczurów i ludzi są elementy wspólne. U obu gatunków występuje naskórek, błona podstawna, skóra właściwa i mieszki włosowe. Budowa skóry szczura i człowieka ma też elementy różniące się. Po pierwsze skóra szczurów jest luźna, a człowiek ma sztywną i przylegającą skórę. Wydaje się, jakby szczury miały jej „nadmiar”, jest ona elastyczna i nie przytwierdzona sztywno do struktur znajdujących się pod spodem. Ma to wpływ na szybkość gojenia się ich ran. Za pomocą obkurczania rany,

proces gojenia przebiega szybciej niż u ludzi, ponieważ zajmuje mniej czasu niż tworzenie nowej tkanki. Ponadto razem z tworzeniem kolagenu są wspomagane przez podskórny mięsień *panniculus carnosus*. *Panniculus carnosus* to cienka warstwa tkanki mięśniowej poprzecznie prążkowanej połączona ze skórą i powięzią. Niemniej jednak krótszy czas gojenia pozwala na przeprowadzenie takich doświadczeń w laboratorium z użyciem szczurów. Dodatkowo pozostawienie podskórnej warstwy mięśni *panniculus carnosus* i naczyń w szczurzym modelu rany ułatwia gojenie. Skórę szczurów i ludzi różni także wzrost włosów. U tych pierwszych występuje płatowy (ang. *patches*) w przeciwieństwie do mozaikowego u człowieka (ang. *mosaic*). U ludzi zapewnia on jednolitą grubość skóry w różnych miejscach ciała. Natomiast u szczurów skóra jest grubsza i bardziej unaczyniona tam, gdzie zachodzi faza anagenu. Wzrost włosów u szczurów przechodzi w kierunku od rostralnego do ogonowego i od brzuszego do grzbietowego. Inną ich cechą jest posiadanie oksydazy L-gulonono- γ -laktonowej enzymu, który przekształca α -gulono- γ -lakton w kwas α -askorbinowy (witaminę C). Witamina C pełni istotną funkcję w syntezie kolagenu. U człowieka ten enzym nie występuje. Szczury mają także dobrą odpowiedź immunologiczną gospodarza i nie są podatne na zakażenia. Infekcję u szczurów w ranie można wywołać tylko celowo wprowadzając bakterie. (Dorsett-Martin i Wysocki 2008, Abdullahi i wsp. 2014, Nunan i wsp. 2014, Ranjbar i Takhtfooladi 2016)

Tab. 1.1 Porównanie skóry człowieka i szczura (źródło: zmodyfikowano na podstawie Dorsett-Martin i Wysocki 2008, Abdullahi i wsp. 2014)

Warstwa/cecha/struktura skóry	Człowiek	Szczur
Naskórek	Gruby	Cienki
Skóra właściwa	Gruba	Cienka
Przyleganie skóry do niższych warstw (architektura skóry)	Mocno przytwierdzona	Luźna
<i>Panniculus carnosus</i>	Brak	Obecny
Wzrost włosów	Mozaikowy	Płatowy
Pokrycie włosami/sierścią	Rzadkie	Gęste
Gruzoły apokrynowe	Obecne	Brak
Gruzoły ekrynowe	Obecne	Brak
Źródło witaminy C	Egzogenne	Endogenne
Blizna keloidowa/przerostowa	Możliwa	Nie występuje
Mechanizm gojenia się rany	Ponowne naskórkowanie	Obkurczanie rany

Opisane w literaturze modele rany cukrzycowej, są najczęściej otrzymywane przez wyindukowanie rany ostrej u zwierzęcia, u którego wcześniej wywołano jej pierwotną klinicznie przyczynę, czyli cukrzycę. Indukcja rany jest wymagana, ponieważ u zwierząt doświadczalnych nie występują rany cukrzycowe. Modele ran cukrzycowych różnią się czasem gojenia. (Nunan i wsp. 2014) Wyróżnia się następujące modele ran: model niedokrwienny, ostrej rany chirurgicznej zrobiony przez nacięcie (ang. *incisional*) lub wycięcie (ang. *excisional*) skóry i rany przewlekłej. Model rany może być modyfikowany przez dodatkowe uszkodzenia, martwy obszar, zamkniętą powierzchnię (podskórna przestrzeń) i oparzenie. W literaturze są opisane też związki chemiczne, mające wpłynąć na gojenie rany np. hydrokortyzon, który zmniejsza ich wytrzymałość czy adriamycyna zakłócająca produkcję komórek odpornościowych.

Jednym z czynników, który bierze się pod uwagę przy indukcji rany jest jej lokalizacja, która powinna ograniczyć zwierzęciu ingerencję w nią. Bardzo często modele rany, które służą do badania procesu gojenia uzyskuje się poprzez nacięcie lub wycięcie skóry grzbietowej. (Dorsett-Martin i Wysocki 2008, Huang i wsp. 2015)

Kluczowe dla przyszłych środków terapeutycznych, które mogą mieć zastosowanie w gojeniu ran cukrzycowych, jest testowanie ich w modelu rany możliwie najbardziej

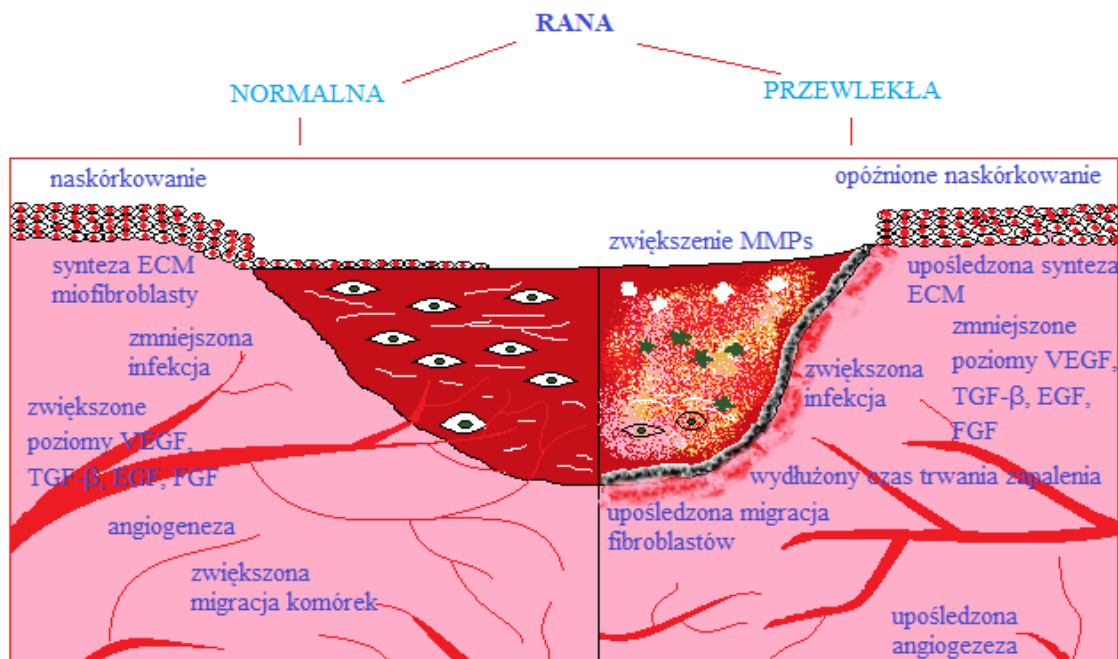
naśladującym postacią kliniczną rany cukrzycowej. W dużej mierze naśladuje ją oparzenie u szczura z wyindukowaną cukrzycą (tab. 1.2), gdyż dostarcza cech rany cukrzycowej, których nie zapewnia nacinanie czy wycinanie skóry. Do podstawowych różnic między oparzeniem a ranami ciętymi należy kierunek uszkodzenia, mechanizm komórkowy i skomplikowany proces ich gojenia. Podczas oparzenia dochodzi do poziomego urazu tkanek i ich termicznej koagulacji. W przypadku nacięcia skóry kierunek uszkodzenia tkanek jest pionowy. Oparzenia goją się wolniej od urazów wertykalnych ze względu na rozległą martwicę, obrzęk i względne niedotlenienie. (Feezor i wsp. 2004) Wyróżnia się w nich 3 strefy według Jackson'a z 1953 r. W środkowej (koagulacji) obserwuje się martwicę tkanek na skutek rozległego ścięcia białek, denaturacji i degradacji. Tkanka ta musi zostać oczyszczona. Środkowy region otacza strefa zastoju (niedokrwienia). Występuje w niej zwężenie naczyń i niedokrwienie. Tkanka jest żywa, jednak przez kolejne 48 godzin od urazu, może nastąpić progresja oparzenia i tkanka może ulec martwicy na skutek rozwoju zakażenia, obrzęku, niedotlenienia i zmniejszonej perfuzji. Ostatnia strefa przekrwienia otacza region zastoju. Jest w stanie ulec naprawie dzięki wzrostowi przepływu krwi przez rozszerzone naczynia krwionośne. Zwiększenie przez nie średnicy zapewniają uwalniane mediatory zapalne z rezydentnych komórek skóry. (Sterling i wsp. 2010, Rowan i wsp. 2015) Opisana powyżej indukcja ran oparzeniowych musi być prowadzona dokładnie, a protokół doświadczenia należy wystandardyzować, pamiętając o możliwości wystąpienia wcześniej wspomnianej progresji oparzenia, która trwa do 2 dni po urazie. (Dorsett-Martin i Wysocki 2008)

Tab. 1.2 Zestawienie wspólnych cech owrzodzenia i oparzenia, z uwzględnieniem charakterystyki oparzenia (Feezor i wsp. 2004, Gantwerker i Hom 2012, Bairy i wsp. 2014, Rowan i wsp. 2015)

Wspólne cechy owrzodzenia i oparzenia	Charakterystyka oparzenia
Wolniejsze gojenie rany	Goi się wolniej niż cięcie chirurgiczne
Martwica	Rozległa martwica
Niedotlenienie	Względne niedotlenienie
Zaburzenia w funkcjonowaniu układu immunologicznego: zmiana poziomów cytokin i wpływ na komórki układu immunologicznego	Oparzenia o większych rozmiarach powodują zmiany stężenia krążących zapalnych mediatorów i przekształcenie fenotypu leukocytów, obserwowane w miejscu urazu oraz ogólnoustrojowo, prowadząc do zaburzeń układu immunologicznego. Zalicza się do nich urazy $\geq 20\%$ TBSA (ang. <i>total body surface area</i> , całkowita powierzchnia ciała).
Niedokrwienie	Zmiany w przepływie krwi
Stres oksydacyjny	Obecny
Oslabiona reakcja zapalna	Obecna
Zaburzenia w ponownym naskórkowaniu	Uszkodzenie jednostki włosowo-łojowej i gruczołów apokrynowych. Ta pierwsza zawiera nabłonkowe komórki macierzyste, które pomagają w ponownym naskórkowaniu.

Znacznie rzadziej w literaturze naukowej można znaleźć prace poświęcone modelowi trudno gojącej się rany, która powstała przez wywołanie cukrzycy u zwierząt za pomocą STZ i oparzenia. Większość tych prac ukazała się już po podjęciu przeze mnie badań. (Wang i wsp. 2008, Bairy i wsp. 2014, Fantinati i wsp. 2016, Ranjbar i Takhtfooladi 2016, Azevedo i wsp. 2016, Tian i wsp. 2016, Hamed i wsp. 2017)

W modelach zwierzęcych cukrzycy nie obserwuje się anatomicznych i strukturalnych zmian, które z czasem skutkowałyby powstaniem owrzodzeń u tych zwierząt. Ten czynnik ryzyka jest wytwarzany sztucznie przez wyindukowanie rany. W zwierzęcym modelu cukrzycy istnieje podłoże fizjopatologiczne, czyli spowodowane hiperglikemią, występujące na poziomie biomolekularnym (ryc. 1.1).



Ryc. 1.1 Najważniejsze różnice między raną normalną a raną przewlekłą. VEGF – czynnik wzrostu śródbłonna naczyń, TGF- β – transformujący czynnik wzrostu β , EGF – naskórkowy czynnik wzrostu, FGF – czynnik wzrostu fibroblastów, MMPs – metaloproteiny macierzy zewnątrzkomórkowej. (źródło: zmodyfikowano na podstawie Turner i Badylak 2014).

Model zwierzęcy rany nie odzwierciedla w pełni gojenia ran u ludzi, ale przy jego pomocy można ocenić wpływ jaki mają testowane preparaty na ważne procesy zachodzące podczas naprawy tkanki.

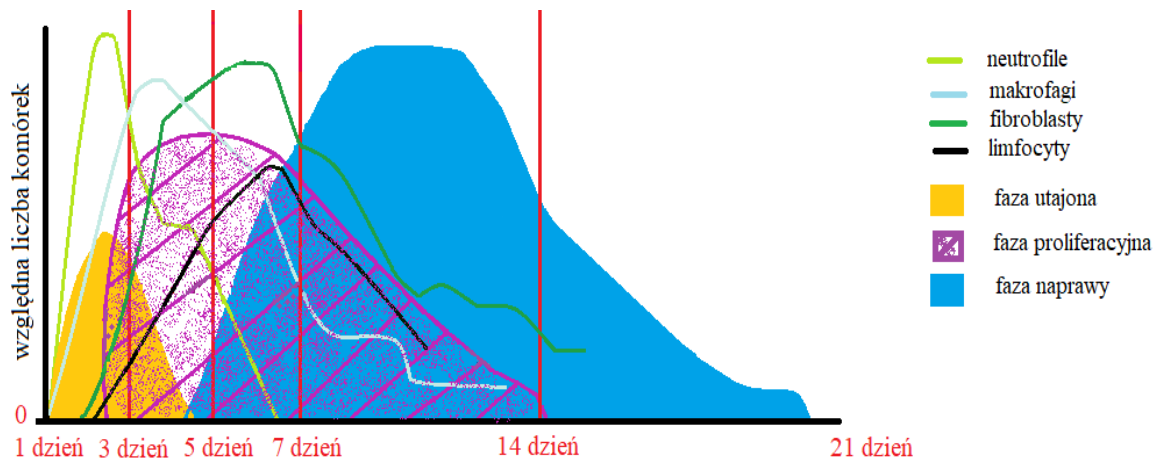
1.2. Fizjologia gojenia rany z elementami patofizjologii rany cukrzycowej

1.2.1. Naciek makrofagów

Przejście z hemostazy do fazy zapalnej charakteryzuje się pojawieniem neutrofilów, makrofagów i limfocytów (ryc. 1.2). W miejscu uszkodzenia jako pierwsze komórki pojawiają się neutrofile, które oczyszczają ranę z zanieczyszczeń i bakterii, umożliwiając w ten sposób przygotowanie rany do gojenia. Neutrofile wydzielają cytokiny prozapalne. Następnie funkcję oczyszczania rany około 48 h po zranieniu przejmują makrofagi, które migrują do rany, kiedy znajdą się w niej produkty uboczne, pochodzące z apoptozy neutrofilów. Makrofagi odgrywają istotną rolę w przejściu rany z fazy zapalnej do proliferacyjnej. Biorą udział w tworzeniu ziarniny, produkcji cytokin, ponownym naskórkowaniu, obkurczaniu rany i angiogenezie. (Gantwerker i Hom 2012, Sorg i wsp. 2017, Wang i wsp. 2018) Liczne badania wykazały, że

brak makrofagów w obu tych fazach wpływa na wystąpienie wynaczyń, zmniejsza odbudowę ubytku skóry i pozostanie rany na tym samym etapie gojenia.

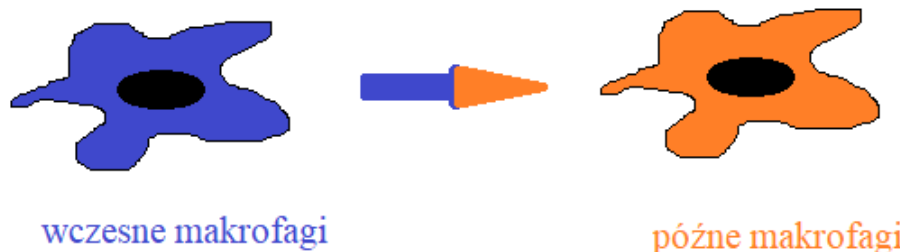
Makrofagi można podzielić na fenotypy: M1 (ang. *type 1 macrophages*, makrofagi typu 1 / makrofagi aktywowane klasycznie) i M2 (ang. *type 2 macrophages*, makrofagi typu 2 / makrofagi aktywowane alternatywnie) (ryc. 1.3). M1 (wczesne makrofagi) zajmują się produkcją mediatorów prozapalnych i fagocytozą. Z czasem przekształcają się w M2 (późne makrofagi). Funkcją M2 jest inicjacja proliferacji fibroblastów, produkcja ECM (ang. *extracellular matrix*, macierz pozakomórkowa) i mediatorów przeciwzapalnych, a także udział w angiogenezie. Ponadto M2 fagocytują bakterie, neutrofile i resztki komórek w ranie. (Sorg i wsp. 2017) Pierwsza faza – faza zapalna, z reguły trwa około 3 dni. (Wang i wsp. 2018)



Ryc. 1.2 Zmiany ilościowe neutrofilów, limfocytów, makrofagów i fibroblastów w czasie gojenia rany (źródło: zmodyfikowano na podstawie Mendonça, R., 2012)

aktywacja
czynniki prozapalne
fagocytoza
indukcja apoptozy granulocytów

fagozytoza neutrofilii
czynniki angiogenne/zwłóknieniowe
czynniki przeciwzapalne



Ryc. 1.3 Przejście makrofagów o fenotypie M1 (wczesne makrofagi) w fenotyp M2 (późne makrofagi) (źródło: zmodyfikowano na podstawie Koh i DiPietro 2011)

Faza zapalna pełni istotną funkcję chociażby ze względu na fagocytozę bakterii. Procesy zachodzące w tej fazie jednak nie mogą trwać zbyt długo. Nadmierne zapalenie może prowadzić do hamowania procesu gojenia, zwiększonego uszkodzenia tkanek lub patologicznego gojenia ran. (Wang i wsp. 2018) W ranach cukrzycowych makrofagi o fenotypie M1 nie są przekształcane do fenotypu M2 (Sorg i wsp. 2017). W mikrośrodowisku niegojącej się rany dochodzi do: ciężkiego i długotrwałego zapalenia (samopodtrzymująca się odpowiedź prozapalna makrofagów o fenotypie M1) (Turner i Badylak 2014) Przedłużająca się obecność prozapalnych makrofagów wykazuje negatywny wpływ na gojenie rany (Okizaki i wsp. 2016). W fazie zapalnej obserwuje się rozregulowany i utrzymujący się stan zapalny. W takiej ranie dochodzi do długotrwałej indukcji chemokin. Obok makrofagów obserwuje się także dłuższą obecność neutrofilii. (Davidson i DiPietro 2006)

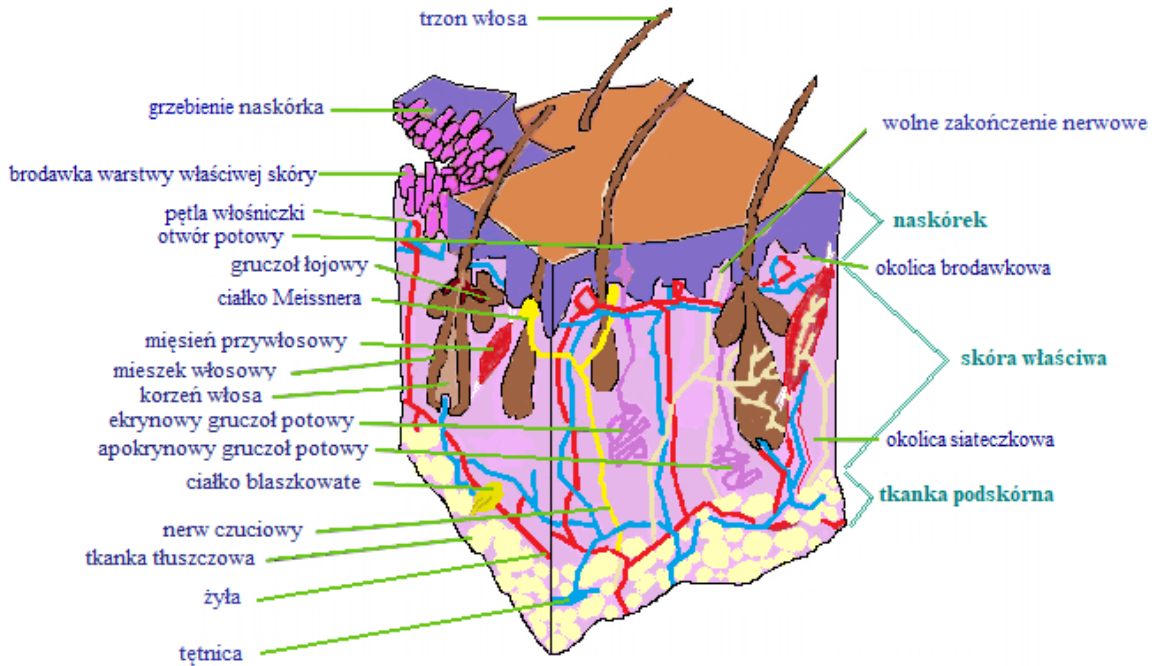
Ponadto owrzodzeniom stopy cukrzycowej towarzyszy niedotlenienie, które także może wzmacniać wczesną odpowiedź zapalną. Dochodzi do zwiększenia poziomów rodników tlenowych i w ten sposób czas gojenia rany się wydłuża. Hiperglikemia może prowadzić do zwiększenia stresu oksydacyjnego podczas produkcji ROS (ang. *reactive oxygen species*, reaktywne formy tlenu) przewyższającej zdolność antyoksydacyjną. (Guo i DiPietro 2010)

W ranie cukrzycowej wczesna odpowiedź zapalna prowadzi do podwyższonego poziomu proteaz. Za zwiększenie ilości proteaz tak samo jak za stymulowanie stanu zapalnego odpowiadają wolne rodniki, które są produkowane przez PMN (ang. *polymorphonuclear leukocytes*, leukocyty wielojądrzaste). Proteazy niszczą czynniki angiogenne. (Aguilar i wsp. 2012) W wydzielinie z przewlekłej rany jest około 30 do 60 razy wyższy poziom MMPs (ang.

matrix metalloproteinases, metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej) niż w ranie ostrej. Tak podwyższona aktywność proteaz prowadzi do niszczenia tkanek i hamuje prawidłowe procesy naprawcze. Czynniki wzrostu i MMPs to dwie główne klasy regulatorów ECM. (Mclennan i wsp. 2006, Guo i Dipietro 2010) MMPs potrafią degradować większość składników ECM i hamują odkładanie macierzy zewnątrzkomórkowej. Takie działania MMPs przyczyniają się do hamowania migracji komórek. Ponadto degradują również cytokiny i czynniki wzrostu, które na zasadzie sprzężenia zwrotnego regulują gojenie się rany. W ranach przewlekłych ze względu na środowisko zapalne obserwuje się podwyższone poziomy: IL-1 α (ang. *interleukin 1 α* , interleukina 1 α), IL-1 β (ang. *interleukin 1 β* , interleukina 1 β), TNF- α (ang. *tumor necrosis factor- α* , czynnik martwicy nowotworu alfa). Wiele z tych cytokin prowadzi do zwiększenia MMPs i obniżenia produkcji cząsteczek ECM. (Turner i Badyłak 2014) W przewlekłych owrzodzeniach cukrzycowych Mclennan i wsp. 2006 obserwowali, utrzymującą się aktywację MMP-9 (ang. *matrix metalloproteinases-9*, metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej 9) i MMP-2 (ang. *matrix metalloproteinases-2*, metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej 2). W ich badaniach fibroblasty z nieuszkodzonej skóry pacjentów z cukrzycą charakteryzowały się zwiększonymi poziomami MMP-3 (ang. *matrix metalloproteinases-3*, metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej 3) i MMP-2.

1.2.2. Ponowne naskórkowanie

Jednym z ważnych procesów zachodzących podczas gojenia się rany jest ponowne naskórkowanie. Naskórek jest złożony w 95% z keratynocytów i rozróżnia się w nim 5 warstw. Nie jest unaczyniony, a składniki odżywcze docierają do niego przez dyfuzję. Warstwa podstawna naskórka dostarcza keratynocytów, których istotną rolę jest odpowiedź w gojeniu ran. (Gantwerker i Hom 2012).



Ryc. 1.4 Budowa skóry (źródło: zmodyfikowano na podstawie Jenkins i wsp. 2006)

Ponowne naskórkowanie rozpoczyna fazę proliferacyjną gojenia rany, która jest drugim etapem gojenia, zaraz po fazie zapalnej. Naskórkowanie odbywa się dzięki napływającym keratynocytom, które w zetknięciu z ECM przyczepiają się do niej i zaczynają wytwarzać błonę podstawną. W czasie migracji keratynocyty trawią ECM za pomocą proteaz. A w momencie zetknięcia się sąsiednich keratynocytów, ich proces migracji ustaje. Ma ono chronić ranę przed utratą wody i zakażeniem. (Gantwerker i Hom 2012, Sorg i wsp. 2017)

Ponowne naskórkowanie zaczyna się od przekształcenia stacjonarnych keratynocytów w typ migrujący. U ludzi naskórek regeneruje się z ekrynowych gruczołów potowych, jednostek łojowych włosów i zewnętrznej osłonki korzeniowej mieszka włosowego (ryc. 1.4). Brakujące komórki naskórka są odtwarzane przez komórki macierzyste z wybrzuszenia mieszków włosowych i niszy międzypęcherzykowej naskórka. (Sorg i wsp. 2017)

W niegojących się owrzodzeniach i ranach przewlekłych nisza komórek macierzystych naskórka jest ograniczona z powodu niedotlenienia, niedokrwienia, nadmiernego wysięku, zakażeń i zapalenia. (Sorg i wsp. 2017) W ranie cukrzycowej migracja i proliferacja keratynocytów są upośledzone, a czynniki hamujące ich migrację w łożysku owrzodzenia mają wpływ na nieprawidłową organizację tkanki ziarninowej (Jhamb i wsp. 2016)

W ranach przewlekłych aktywacja naskórkowych keratynocytów nie przebiega prawidłowo, co wpływa na ich proliferację i migrację. W dobrze gojącej się ranie ekspresja

receptora EGF (ang. *epidermal growth factor*, naskórkowy czynnik wzrostu), który odpowiada za stymulację tych procesów ma miejsce w błonie komórkowej keratynocytów. Natomiast w ranach przewlekłych ulega ekspresji w ich cytoplazmie, przez co ligand nie może się z nim połączyć. W ZSC obserwuje się hiperkeratozę (nadmierne rogowacenie naskórka) i parakeratozę (przyspieszone rogowacenie naskórka) wynikającą z upośledzonego różnicowania keratynocytów. Hiperproliferacyjne komórki obecne są w warstwie podstawnej i ponadpodstawnej naskórka (*basal layers and suprabasal layers*). Ponadto w przewlekłych owrzodzeniach zmniejszona jest ekspresja kluczowej cząsteczki dla ich migracji – prekursora łańcucha alfa-3 lamininy 5. (Pastar i wsp. 2018)

1.2.3. Neowaskularyzacja

Neowaskularyzacja to proces, który prowadzi do tworzenia nowych naczyń krwionośnych. VEGF (ang. *vascular endothelial growth factor*, czynnik wzrostu śródbłona naczyń) jest uwalniany na skutek niedotlenienia i indukuje śródbłonek komórki do rozpoczęcia tego procesu. Odgrywa ona kluczową rolę w gojeniu ran. Na początku zanim w łożysku rany powstaną nowe naczynia krwionośne, transport substancji do rany odbywa się z nieuszkodzonych naczyń znajdujących się na jej krawędziach. Dzięki angiogenezie ze zdrowych naczyń zaczynają powstawać odgałęzienia i całą ranę zaczynają pokrywać naczynia krwionośne. Powstające kapilary są przyczyną obrzęku tkanki i powstania gojącej się tkanki ziarninowej. Dzieje się tak ze względu na ich kruchość i przepuszczalność. W powstałym mikrośrodowisku tworzą się i regenerują nowe naczynia, przez które usuwane są pozostałości obumarłych komórek i dostarczane składniki odżywcze. W gojącej się ranie obserwuje się dużą liczbę naczyń włosowatych, z których część jest dysfunkcyjna. Z czasem ten rodzaj naczyń ulegnie apoptozie albo dojrzeje. W gojącej się ranie naczynia układają się w krąg na granicy rany, z którego odchodzą promieniście kolejne naczynia aż do zdrowej skóry. Zadaniem angiogenezy jest zapewnienie na odpowiednim poziomie perfuzji odżywczej, gdy jest zapewniona rana goi się prawidłowo. (Singh i wsp. 2017, Sorg i wsp. 2017) Ostatnia faza przebudowy (na ryc. 1.2 podpisana jako faza naprawy) w prawidłowo gojącej się ranie trwa najdłużej. W przeważającej części dominują w niej procesy anaboliczne, które wymagają dostarczenia energii, a brak dostatecznej ilości składników odżywczych może prowadzić do przeważenia na korzyść katabolizmu, który wydłuża czas gojenia rany. Każde zaburzenie w fazie przebudowy może prowadzić do przejścia rany w stan przewlekłego gojenia. (Gantwerker i Hom 2012, Wang i wsp. 2018)

W ranach cukrzycowych z upośledzonym gojeniem obserwuje się zaburzony przepływ krwi w naczyniach krwionośnych stopy neuropatycznej. W prawidłowej skórze stymulacja włókien nocyceptywnych typu C powoduje wsteczną stymulację sąsiedniego włókna, na skutek czego są wydzielane: histamina, SP (ang. *substance P*, substancja P), NPY (ang. *neuropeptide Y*, neuropeptyd Y) i CGRP (ang. *calcitonin gene-related peptide*, peptyd związany z genem kalcytoniny), co prowadzi do rozszerzenia naczyń krwionośnych. Mechanizm ten jest widoczny jako reakcja skórna o nazwie potrójna odpowiedź Lewisa (ang. *lewis triple flair response*). U osób z cukrzycą nie dochodzi do reakcji Lewisa. (Aguilar i wsp. 2012)

U osób z owrzodzoną stopą cukrzycową obserwuje się zmniejszoną angiogenezę, co powoduje, że skóra jest słabo utleniona. Jest wiele różnych zaburzeń związanych z angiogenezą. Do uszkodzenia naczyń krwionośnych może dochodzić np. poprzez odkładanie toksycznego sorbitolu w tkankach nerwowych, powstałego na skutek dodatkowego metabolizmu glukozy w szlaku poliolowym, który to szlak został aktywowany długotrwałą obecnością hiperglikemii. (Turner i Badylak 2014, Jhamb i wsp. 2016)

Brak odpowiednio wydolnego krążenia w dużych naczyniach wpływa na krążenie w mniejszych naczyniach, a to skutkuje pogrubieniem błony podstawnej. Dochodzi także do obniżenia zdolności naprawczych naczyń. Tylko w obrębie śródbłonna pojawia się wiele zmian, które prowadzą do jego dysfunkcji. Należą do nich zmiany w proliferacji komórek śródbłonna, zwiększona lepkość krwi, zmniejszony przepływ krwi, synteza NO (ang. *nitric oxide*, tlenek azotu) i zmiany napięcia mikronaczyniowego. Obniżenie poziomu NO i odpowiedzi proangiogennej jest wywołane negatywnym wpływem hiperglikemii na komórki nabłonkowe. Zmniejszone stężenie tego pierwszego nie pozwala na rozszerzenie naczyń krwionośnych, w wyniku czego następuje niedokrwienie. Liczne badania naukowe z użyciem zwierzęcego modelu rany cukrzycowej poświęca się śródbłonkowi ze względu na fakt, że zaburzenia w jego obrębie są jednymi z najpoważniejszych w mikrokrażeniu. (Aguilar i wsp. 2012, Jhamb i wsp. 2016) Przewlekła hiperglikemia powoduje uszkodzenie śródbłonna, zmniejszenie jego właściwości fibrynolitycznych i zmniejszenie migracji oraz proliferacji jego komórek. (Obońska i wsp. 2011)

Podczas procesu gojenia ran cukrzycowych dochodzi do nieprawidłowej odpowiedzi immunologicznej i zaburzenia równowagi między zapaleniem, angiogenezą, MMPs i ekspresją białek tworzących połączenia szczelinowe (ang. *gap junction*). Większa część omawianych procesów jest regulowana przez ekspresję receptora TLR2 (ang. *toll-like receptor 2*, receptora toll-podobnego 2). I tak np. na skutek ostrego urazu niedokrwiennego moduluje on za pomocą

limfocytów przepuszczalność komórek śródbłonka, ich inwazję i migrację. Pobudzając w ten sposób angiogenezę. (Jhamb i wsp. 2016).

Ponadto w owrzodzeniach cukrzycowych opóźnione gojenie ran i zmniejszona angiogeneza współwystępują z obniżonym poziomem VEGF, IGF-1 (ang. *insulin-like growth factor 1*, insulinopodobnego czynnika wzrostu 1), PDGF-BB (ang. *platelet-derived growth factor-BB*, płytko-pochodnego czynnika wzrostu typu BB) i TGF- β 1 (ang. *transforming growth factor β 1*, transformujący czynnik wzrostu β 1). (Turner i Badylak 2014) Zmniejszona ekspresja czynników angiogennych prowadzi do ubytków skórnych w tkance stopy cukrzycowej. Także badania z zastosowaniem EPC (ang. *endothelial progenitor cells*, komórki progenitorowe śródbłonka) wiązały się z mniejszą odbudową naczyń krwionośnych u cukrzyków. Ich mobilizacja i pozyskiwanie są upośledzone. (Jhamb i wsp. 2016, Guo i Dipietro 2010)

Neowaskularyzacja, czyli proces powstawania nowych naczyń włosowatych w czasie gojenia się rany cukrzycowej jest zakłócony i podczas angiogenezy – tworzenia z już istniejących, i podczas waskulogenezy – *de novo* z progenitorowych komórek śródbłonka ze szpiku kostnego. Upośledzenie angiogenezy wynika ze starzenia fibroblastów, utraty zdolności w tworzeniu nowych naczyń przez komórki śródbłonka, braku równowagi między degradacją składników ECM i ich akumulacją. Natomiast nieprawidłowe zachodzenie waskulogenezy wynika z ograniczonego dopływu krwi do rany, upośledzonych: funkcji, mechanizmów i odpowiedzi proliferacyjnej EPC, a także ich zmniejszonej liczby krążącej w krwioobieg. Brak przystosowania tych komórek do pełnionych funkcji wynika ze zwiększonego stresu oksydacyjnego, aktywacji oksydazy NADPH (ang. *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*, fosforan dinukleotydu nikotynoamidoadeninowy), hiperglikemii i utrzymującego się stanu zapalnego. (Pastar i wsp. 2018).

1.2.4. Proliferacja fibroblastów

W fazie proliferacyjnej gromadzi się duża ilość tkanki łącznej i komórek w ranie. Oprócz keratynocytów obserwuje się też obecność komórek śródbłonka i fibroblastów. (Wang i wsp. 2018) Ze skrzepu uwalniane są czynniki wzrostu, które stymulują fibroblasty do proliferacji. W trzecim dniu tkanka jest bogata w fibroblasty. (Singh i wsp. 2017) Wytwarzanie przez nie ECM i kolagenu pozwala zachować integralność skóry i odbudować ubytek skóry. ECM powstała przy ich udziale tworzy „rusztowanie”, które ma za zadanie pomagać strukturalnie i dostarczać cząsteczek sygnałowych. W syntezie i przebudowie macierzy bogatej w kolagen uczestniczy TGF- β 1, który także pośredniczy w przekształceniu części fibroblastów

w miofibroblasty. Odpowiadają one za obkurczanie rany i wykazują ekspresję α -SMA (ang. *α -smooth muscle actin*, α -aktyna mięśni gładkich). (Pastar i wsp. 2018)

Fibroblasty obecne w skórze osób z cukrzycą nie wykazują nieprawidłowości w funkcjonowaniu. Ekspresja ich miRNA (mikroRNA, ang. *micro-ribonucleic acid*, kwas mikrorybonukleinowy) i mRNA (ang. *messenger ribonucleic acid*, matrycowy kwas rybonukleinowy) w skórze stóp cukrzyków i osób zdrowych są na podobnym poziomie. (Ramirez i wsp. 2015) Nieprawidłowe funkcjonowanie fibroblastów obserwuje się dopiero w owrzodzeniach stopy cukrzycowej. Zostaje zmniejszona ich migracja i proliferacja oraz odpowiedź na czynniki wzrostu. (Pastar i wsp. 2018) Maione i wsp. 2015 zaprojektowali modele 3D niegojącej się rany z fibroblastami pobranymi z owrzodzonej stopy cukrzycowej, na których wykazali zmniejszone ponowne nabłonkowanie, zwiększoną proliferację keratynocytów, zmniejszoną stymulację angiogenezy i upośledzone odkładanie ECM. Ponadto w fibroblastach pobranych z ZSC są indukowane miR-34a-5p (ang. *micro-ribonucleic acid 34a-5p*, kwas mikrorybonukleinowy 34a-5p), miR-21-5p (ang. *micro-ribonucleic acid 21-5p*, kwas mikrorybonukleinowy 21-5p) i miR-145-5p (ang. *micro-ribonucleic acid 145-5p*, kwas mikrorybonukleinowy 145-5p), które odpowiadają za zaburzenie takich funkcji komórkowych jak: starzenie, hamowanie migracji i proliferacji (Liang i wsp. 2016).

1.2.5. Tworzenie włókien kolagenowych

Kolagen to główny składnik ECM organizmów zwierzęcych. Białko to występuje w większości tkanek i narządów m.in. w skórze. Do tej pory zostało wyizolowanych i opisanych aż 29 jego typów. Pełnią one odmienne funkcje, różnią się budową i miejscem występowania w organizmie. Kolagen stanowi 1/3 wszystkich białek występujących w organizmach kręgowców. Jego potrójne superhelisy są odporne na proteazy tj. trypsynę, chymotrypsynę i pepsynę. Kolagenazy to jedyne enzymy, które go degradują. Są one metaloproteinazami ECM. Kolagen jest nieustannie syntetyzowany i degradowany w przestrzeni zewnątrzkomórkowej. Zanim powstanie dojrzałe włókno najpierw tworzone są mikrowłókienka, które są przekształcane we włókienka. W skórze występuje typ: I, III i V. Typ I odpowiedzialny jest za wytrzymałość na rozciąganie tkanek, a III jest składnikiem skóry właściwej. W skórze obserwuje się współwystępowanie głównie kolagenu typu I i III. Istotny jest stosunek poszczególnych frakcji kolagenu w skórze. (Gantwerker i Hom 2012, Czubałk i Żbikowska 2014)

Tkanka ziarninująca, która zastępuje skrzep w miejscu rany jest różowa, unaczyniona i ma włókna kolagenowe. Posiada więcej kolagenu typu III w porównaniu do nieuszkodzonej

skóry. (Singh i wsp. 2017) W gojącej się ranie obserwuje się głównie występowanie kolagenu typu III i I. Typ III kolagenu jest produkowany przez fibroblasty, które proliferują, migrują i można je zlokalizować w sąsiedztwie rany i w samej ranie. Jego wydzielanie obserwuje się w fazie proliferacyjnej. Pełni on bardzo istotną funkcję, gdyż tworzy ECM w ranie. Jest to jednak przejściowa matryca. (Perini i wsp. 2015) Gdy rana jest zamknięta, nadal odbywa się odkładanie kolagenu, które trwa do 5 dnia. Jego brak może spowodować rozerwanie tkanki. (Singh i wsp. 2017)

W normalnej skórze przeważa kolagen typu I. Występuje on także w fazie przebudowy. (Perini i wsp. 2015) Obserwuje się w niej stan równowagi między powstawaniem nowych komórek a śmiercią zużytych lub uszkodzonych komórek. Rozpadowi ulegają ECM i niedojrzały kolagen typu III. Istotnym procesem w tej fazie, która trwa miesiące, a nawet lata jest powstawanie dojrzałego kolagenu typu I, który zapewnia tkance znaczną wytrzymałość. (Gantwerker i Hom 2012, Wang i wsp. 2018). Tkanka ziarninowa charakteryzująca się dużą liczbą komórek w ostatniej fazie przebudowy jest przekształcana w bliznę, która jest luźno utkana i składa się z kolagenu, a także małej liczby kapilar. W miarę gojenia się rany naczynia włosowate nie występują już tak gęsto, a ich średnica jest coraz mniejsza. Do tego chaotycznie rozrzucone włókna kolagenowe zaczynają się układać prostopadle do miejsca zranienia. Ostatecznie blizna w porównaniu do zdrowej tkanki ma bardziej chaotyczne utkanie włókien kolagenowych i posiada mniej włókien sprężystych. Obie tkanki, ta po urazie i nieuszkodzona, różnią się od siebie liczbą kapilar (Davidson i DiPietro 2006).

W gojeniu ran cukrzycowych należy zwrócić uwagę na nieenzymatyczną glikację kolagenu i zanikanie elastyny. Zaburzenie wytwarzania elastyny powoduje pogrubienie struktur okołostawowych, które wraz z glikozylacją kolagenu skutkują nieprawidłowościami strukturalnymi w obrębie stopy i ograniczoną ruchomością stawów. (Aguilar i wsp. 2012).

To hiperglikemia występująca u osób z cukrzycą powoduje nieenzymatyczną glikozylację kolagenu. Syntetyzowane białko ma zwiększone usieciowanie, a jego nieprawidłowe włókna są sztywne. Powoduje to, że skóra chorego na cukrzycę jest nieelastyczna i słaba biomechanicznie, przez co łatwo może prowadzić do obrażeń. Tworzenie tkanki ziarninowej na nieprawidłowych włóknach kolagenowych może łatwo doprowadzić do ich rozerwania. W konsekwencji czego powstanie podwyższony poziom AGEs (ang. *advanced glycation end products*, końcowe produkty glikacji). (Abas i wsp. 2020)

Nieprawidłowa zawartość kolagenu, który odpowiada za regulację aktywowanych komórek na ECM przyczynia się do wydłużenia stanu zapalnego (zaburzona fagocytoza i chemotaksja leukocytów) i dalej prowadzi do upośledzenia odkładania tego białka w ranach

cukrzycowych. Jego synteza jest zależna także od chorób naczyń występujących w cukrzycy. Tlen dostarczany naczyniami wpływa na modulację fibroblastów, które go produkują. Na jego odkładanie oddziałuje też produkcja MMPs, która jest zwiększona w ranach cukrzycowych. Część z nich (kolagenazy MMP-1 ang. *matrix metalloproteinases 1*, metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej 1, MMP-8 ang. *matrix metalloproteinases 8*, metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej 8, MMP-13 ang. *matrix metalloproteinases 13*, metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej 13 i MMP-18 ang. *matrix metalloproteinases 18*, metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej 18) odpowiada za jego bezpośredni rozkład. Ponadto powstające produkty rozpadu kolagenu stanowią duże biologiczne obciążenie, co utrudnia dalsze gojenie rany. (Abas i wsp. 2020) Jak pokazują badania Sutcliffe i wsp. 2017 zmniejszoną zawartość tego białka obserwuje się także w skórze właściwej na krawędziach rany cukrzycowej.

1.2.6. Patofizjologia modelu rany cukrzycowej

Cukrzyca zarówno u ludzi, jak i indukowana przy użyciu STZ u zwierząt wpływa na zmiany w skórze. U osób z cukrzycą tkanka ta nie zapewnia wystarczającego gojenia się ran i jest jedną z najczęstszych przyczyn upośledzających ten proces. Z kolei indukowana STZ prowadzi do takich zmian w skórze szczurów jak niski poziom ekspresji VEGF, eNOS (ang. *endothelial nitric oxide synthase*, śródbłonkowa syntaza tlenu azotu), TGF- β 1 i białek sygnalizacyjnych insuliny (Shc ang. *Src homologous and collagen protein*, białko adaptorowe homologiczne do Src i kolagenu, IRS ang. *insulin receptor substrate*, substrat dla receptora insulinowego, ERK ang. *extracellular signal regulated kinase*, kinaza aktywowana przez czynniki pozakomórkowe i Akt ang. *RAC-alpha serine/threonine-protein kinase*, kinaza serynowo-treoninowa / kinaza białkowa B), a także małej liczby naczyń krwionośnych, podwyższonego stresu oksydacyjnego, obniżonej obrony antyoksydacyjnej i podwyższonego stanu zapalnego. U szczurów obserwuje się długotrwałe zapalenie, które wyraża się dużą liczbą komórek zapalnych, obecnych także w głębszych warstwach skóry. (Andrade 2017) W ostrym modelu choroby wyindukowanej STZ obserwuje się słabe gojenie się ran, na które ma wpływ m.in. niedostateczne przyswajanie składników odżywczych. (Azevedo i wsp. 2016)

Według Huang i wsp. 2015 to szlak sygnałowy Akt/mTOR (mTOR ang. *mammalian target of rapamycin kinase*, ssacza kinaza serynowo-treoninowa hamowana przez rapamycynę) pełni istotną rolę w patogenezie ran cukrzycowych. Wiadomo, że zaburzone działanie kinazy mTOR powoduje ten rodzaj jednostki chorobowej. Kinaza mTOR jest regulowana przez sygnały wysyłane przez czynnik wzrostu, dostępność aminokwasów i glukozy. Aktywacja

Akt/mTOR zwiększa angiogenezę, syntezę kolagenu, proliferację i migrację komórek. Huang i wsp. 2015 podaje, że w prawidłowym gojeniu ran wzrasta ekspresja kluczowych białek tego szlaku. Natomiast jego wyraźne osłabienie obserwuje się zarówno w nietkniętej skórze cukrzycowej jak i w niegojących się ranach cukrzycowych. W nich poziomy fosforylacji kluczowych białek Akt/mTOR są obniżone. GM-CSF (ang. *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*, czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów) poprawia gojenie ran cukrzycowych dzięki częściowej aktywacji tego szlaku przez zwiększenie ich ekspresji. Zastosowanie GM-CSF indukuje ekspresję kolagenu i α -SMA, przyspiesza zamknięcie ran, zwiększa poziomy czynników wzrostu VEGF, bFGF (ang. *basic fibroblast growth factor*, podstawowy czynnik wzrostu fibroblastów), TGF- β (ang. *transforming growth factor β* , transformujący czynnik wzrostu β) i neowaskularyzację. Jednak jego działanie jest uzależnione od aktywacji szlaku Akt/mTOR i innych kluczowych procesów dla gojenia się rany (neowaskularyzacji, naskórkowania, odkładania kolagenu I). Ponadto może, równolegle ze wzrostem ekspresji kluczowych białek w szlaku Akt/mTOR, promować proliferację fibroblastów. (Huang i wsp. 2015)

1.3. Leczenie trudno gojących ran - kolagenaza

Maści stosowane do oczyszczania enzymatycznego oszczędzają tkanki, które nie są nekrotyczne. Ich zadaniem jest usuwanie tylko martwej części. Kolagenaza, czyli enzym proteolityczny (proteaza) służy do rozkładania materiałów kolagenowych w tkankach martwiczych. (Shi i Carson 2009) Specyficzną kolagenazę uzyskuje się od bakterii *Clostridium histolyticum*. Ta metaloproteinaza tnie kolagen (typ I, II, III, IV i V). Ma zastosowanie w owrzodzeniach cukrzycowych i tętniczych, oparzeniach trzeciego stopnia, a także w leczeniu odleżyn. (Mandl 1982) To jeden z dwóch enzymów, który jest najpowszechniej stosowany na świecie. Enzymy o takich właściwościach już od dłuższego czasu stosowane są do oczyszczania ran. Funkcją kolagenazy jest rozkładanie spiralnych włókienek kolagenowych, występujących w miejscu jego zastosowania. Jej rolą jest otrzymanie zdrowego łożyska rany. (Perini i wsp. 2015)

Literatura na temat kolagenazy oczyszczającej ranę nie jest jednak tak obszerna. (Patry i Blanchette 2017) Jej działanie obejmuje początkowe fazy gojenia, w których przygotowuje łożysko rany. Według badań Perini i wsp. 2015 maść kolagenazowa wpływa na lepsze ponowne naskórkowanie i poziom markera angiogenego. Za pomocą techniki immunohistochemicznej ocenili angiogenezę. Badali oni dystrybucję VEGF, który jest produkowany przez komórki śródbłonna. Jest to czynnik angiogeny, a jego ilość jest wysoka na początku gojenia się rany.

Według nich maść kolagenazowa wpływa na zwiększoną dystrybucję odkładającego się kolagenu, a także lepsze tworzenie się tkanki.

Maść o nazwie *iruxol@mono* zawierająca kolagenazę razem z takimi opatrunkami jak pianki (Lyofam), hydrożele (Intra Side Gel), folie transparentne, hydrokoloidy (Granuflex 2), preparaty alginowe (Fibracol) czy czynniki wzrostowe (Dermagraft) swego czasu wyparła stosowany rivanol czy płyn Dakina w leczeniu owrzodzeń stopy cukrzycowej. (Sieradzki, red. 1998)

1.4. Endogenne neuropeptydy i białka wspomagające gojenie ran

Do tej pory nie opracowano jeszcze idealnego opatrunku do leczenia trudno gojących się ran, dlatego ciągle prowadzi się badania nad opracowaniem nowych sposobów terapii. Jedną z nowszych innowacji jest opatrunek na bazie keratyny. Według badań *in vivo* opatrunki z białkiem keratynowym stymulują migrację komórek do miejsca urazu. Obecnie są już dostępne produkty lecznicze oparte na keratynie. Jednak preparaty na bazie keratyny nadal w większej mierze są dopiero na etapie badań i nie są powszechne używane.

Inny rodzaj badań nad leczeniem ran cukrzycowych to poszukiwanie substancji przyspieszających gojenie. Opóźnienie gojenia ran w cukrzycy, w przebiegu której występują neuropatie obwodowe, wskazało PNS (ang. *peripheral nervous system*, obwodowy układ nerwowy) jako znaczące dla gojenia ran. Kiełkujące neurony z PNS należą do jednej z populacji komórek, która koordynuje procesy zachodzące w gojącej się ranie obok fibroblastów w skórze właściwej, naciekających makrofagów i komórek śródbłonna z naczyniami krwionośnymi. Stąd obecne zainteresowanie badaczy, pod kątem substancji do zastosowania w leczeniu trudno gojących ran, neuropeptydami, m.in. tachykininowymi i opioidowymi. (Bigliardi-Qi i Bigliardi 2018)

1.4.1. Substancja P

Substancja P jest 11-peptydem i należy do grupy neuropeptydów tachykininowych, wykazujących powinowactwo do receptorów neurokininowych (NK-1 ang. *neurokinin-1 receptor*, receptor neurokininy-1, NK-2 ang. *neurokinin-2 receptor*, receptor neurokininy-2 i NK-3 ang. *neurokinin 3 receptor*, receptor neurokininy-3). Aktywność jednego z tych receptorów receptora NK-1 jest związana z następującymi komórkami: fibroblastami, komórkami nerwowymi, leukocytami, śródbłonkiem naczyń limfatycznych i krwionośnych. SP wpływa na rozszerzenie naczyń, angiogenezę, neurogeną odpowiedź zapalną, a także proliferację i wzrost komórek. Odgrywa też istotną rolę w patogenezie cukrzycy, a do jej

najważniejszych funkcji należy przekazywanie sygnału bólowego. (Graefe i Mohiuddin 2020) Owrzodzenie stopy cukrzycowej jest związane z obniżeniem poziomu NGF (ang. *nerve growth factor*, czynnik wzrostu nerwów), CGRP i SP odpowiadających za promowanie chemotaksji komórkowej, stymulację proliferacji komórek i indukcję produkcji czynnika wzrostu. (Guo i Dipietro 2010)

Liczne badania dotyczące roli SP w normalnych procesach gojenia ran wskazują, że ten neuropeptyd może odgrywać dużą rolę w gojeniu przewlekłych ran cukrzycowych. W skórze znajdują się liczne zakończenia neuronów czuciowych obwodowego układu nerwowego. Neurony czuciowe dzięki wydzielaniu SP mogą pełnić funkcję eferentną (odśrodkową). Wydzielanie SP może się odbywać także przez same komórki skóry, co potwierdziły badania prowadzone przez Chéret i wsp. 2014 w modelu 3D organotypowym uszkodzonej skóry ludzkiej. Ponadto umieszczenie w hodowli pierwotnych neuronów czuciowych pochodzących ze zwojów korzeni grzbietowych szczura, a także dodanie SP do fibroblastów pobranych z eksplantów pokazało, że zarówno wymieniony neuropeptyd, jak i neurony czuciowe biorą udział w procesie gojenia rany. Zarówno SP, jak i neurony czuciowe zwiększają aktywność MMPs (MMP-2, MMP-9), odpowiadają za stosunek ekspresji kolagenu I do III, wpływają na proliferację keratynocytów i fibroblastów. W przeprowadzonej hodowli SP była wydzielane dopiero po uszkodzeniu eksplantów. Działanie SP wyraźnie zależało od dawki. Okazało się, że najlepszą aktywność SP wykazywała w dawce, której wartość była zbliżona do fizjologicznej (10^{-10} M). SP promowała wówczas adhezję ludzkich fibroblastów skóry, które odpowiadają za syntezę kolagenu, wydzielanie MMPs i inhibitorów MMPs. Metaloproteinazy ECM pełnią różne funkcje: MMP-9 odgrywa rolę w migracji keratynocytów, a MMP-2 w procesie wymiany kolagenu. SP odpowiada również za różnicowanie fibroblastów w miofibroblasty. (Chéret i wsp. 2014)

Antezana i wsp. 2002 wykazali, że w skórze u osób z ranami cukrzycowymi, obserwuje się zwiększoną aktywność enzymatyczną NEP (ang. *neutral endopeptidase*, neutralna endopeptydaza), który reguluje SP. Rozkłada on SP, konkuruje z jej receptorem i jest prawdopodobnie zlokalizowany na tych samych komórkach (fibroblastach, komórkach śródbłonna, keratynocytach), co NK-1. Według badaczy zwiększona aktywność NEP i niski poziom SP prowadzą do przewlekłych owrzodzeń.

Natomiast w pracy Jiang i wsp. 2012 wykazano, że SP wykazuje również działanie przeciwzapalne. Wyniki tych badań wskazały, że dożylnie podana (i.v., ang. *intravenosus*) SP zmniejszała poziom zapalnych cytokin (IL-6 – ang. *interleukin 6*, interleukina 6, iNOS – ang. *inducible nitric oxide synthase*, indukowana syntaza tlenu azotu i TNF- α), a następnie

przesuwała makrofagi z fenotypu M1 do M2. Pojawienie się w miejscu urazu przeciwzapalnych makrofagów M2, prowadziło do regeneracji naczyń, zachowania tkanek i wzrostu aksonów. W konsekwencji stosowanie SP prowadziło do poprawy funkcjonowania szczurów z SCI (ang. *spinal cord injury*, uraz rdzenia kręgowego).

Podczas zranienia dochodzi do wydzielania SP. Zhou i wsp. 2006 badali wzajemne korelacje między NGF, SP i GDNF (ang. *glial cell-derived neurotrophic factor*, czynnik neurotroficzny pochodzenia glejowego) w rozwoju cyklu włosów. Jak się okazało po zranieniu dochodzi do wzrostu NGF, a następnie SP. Zauważono także podwyższenie GDNF. Zwiększony poziom NGF pobudzał zwiększenie ilości keratynocytów, a następnie cykl wzrostu włosów. Przypuszczalnie stymulował też nerwy skórne i produkcję przez nie SP. Jak podaje Zhou i wsp. 2006 NGF w skórze jest wydzielane przez fibroblasty, keratynocyty, komórki mięśni gładkich i naskórka.

Jednym z procesów ważnych dla prawidłowego gojenia się ran jest angiogeneza. Badania potwierdzające działanie SP na ten proces przeprowadził Ziche i wsp. 1990. Zarówno *in vivo* jak i *in vitro* SP wpływała na proliferację komórek śródbłonka, tworząc w żywym organizmie nowe naczynia włosowate. Taką zdolność wykazywali też inni selektywni agoniści NK-1. Według Ziche i wsp. 1990 SP działając na ten receptor pobudza komórki śródbłonka do neowaskularyzacji.

SP wpływa także na zwiększenie angiogenezy, co obserwowano w mysim modelu ostrej rany cukrzycowej z cukrzycą typu 2 po podskórnym podaniu SP (10 nM/kg, około 0,25 nM na jedną mysz). Ten neuropeptyd mobilizował EPC, zwiększał ich populację w szpiku kostnym, aktywował białko YAP (ang. *Yes-associated protein*, białko powiązane z białkiem Yes) w jądrach komórek skóry właściwej rany, zwiększał ponowne naskórkowanie, proliferację fibroblastów i liczbę miofibroblastów. Zadaniem EPC w łożysku rany jest różnicowanie się w komórki śródbłonka, które tworzą nowe naczynia krwionośne. Mobilizacja EPC po podaniu układowym SP nie była związana ze zranieniem, gdyż dochodziło do niej także u myszy z cukrzycą typu 2, które nie miały indukowanej rany. Natomiast w przypadku obecności rany po podaniu SP rany cukrzycowe zamykały się podobnie do ran normalnych. (Um i wsp. 2017)

Z angiogenezą są związane również fibroblasty skóry, które tracą swoje funkcje w przewlekłych ranach cukrzycowych, w tym funkcje regeneracyjne. SP moduluje właściwości i zwiększa proliferację normalnych i cukrzycowych fibroblastów skórnych zapewniając przywrócenie prawidłowych funkcji tym drugim. Wpływ SP na proliferację fibroblastów tak samo jak u Chéret i wsp. 2014 był związany z wielkością podawanej dawki neuropeptydu. SP nie miało jednak bezpośredniego wpływu na syntezę kolagenu (typu I i II), ale ostatecznie jego

wzrost mógł nastąpić przez zwiększenie proliferacji fibroblastów. Takie badania zostały przeprowadzone na pierwotnej hodowli mysich fibroblastów pobranych ze skóry właściwej normalnej i cukrzycowej. Dotyczyło ono także angiogenezy, która w ranach cukrzycowych zachodzi słabiej, dlatego że cukrzycowe fibroblasty mają mniejszą ekspresję VEGF niż normalne fibroblasty. Podanie SP zwiększyło ekspresję SDF-1 (ang. *stromal cell-derived factor-1*, czynnik pochodzenia stromalnego 1) i VEGF zapewniając utrzymanie właściwości angiogennych fibroblastów cukrzycowych. Jak się okazuje poziom ekspresji NK-1 jest taki sam w przypadku fibroblastów cukrzycowych i normalnych, co tłumaczy możliwość przywrócenia właściwości angiogennych po podaniu SP. (Jung i wsp. 2016)

1.4.2. Peptydy opioidowe

Peptydy opioidowe działają na receptory opioidowe. Wyróżnia się trzy główne typy receptorów opioidowych μ , δ i κ . Każdemu z nich odpowiadają określone endogenne ligandy: endorfiny, enkefaliny i dynorfiny.

Jak pokazują badania, receptory opioidowe mogą ulegać ekspresji w komórkach skóry. Należą do nich: melanocyty, keratynocyty, gruczoły potowe i łojowe, mieszki włosowe, włókna nerwów obwodowych, fibroblasty, napływające do skóry komórki odpornościowe. (Bigliardi i wsp. 2009)

Ze względu na udział receptorów opioidowych, jak i samych opioidów w łagodzeniu bólu, a także obecność tych pierwszych w skórze podjęte zostały badania w kierunku poznania roli receptorów opioidowych i ich endogennych ligandów w gojeniu się ran. Doświadczenia prowadzone m.in. przez Bigliardi i wsp. 2003 pokazały niską ekspresję receptorów μ na keratynocytach i wysoki poziom β -endorfiny w ranach przewlekłych. Stężenie tego opioidu wytwarzanego przez skórne keratynocyty i OUN (ośrodkowy układ nerwowy) podnosi się w ranie na skutek urazu. Jak pokazały ich badania w wyniku sprzężenia zwrotnego wysoki poziom β -endorfin zmniejsza ekspresję receptora μ . Ponadto zwiększa regulację receptora TGF- β 2 (ang. *transforming growth factor β 2*, transformujący czynnik wzrostu β 2) i ekspresję CK16 (ang. *cytokeratin 16*, cytokeratyna 16), które są zaangażowane w gojenie się ran. TGF- β wpływa na różnicowanie keratynocytów, homeostazę skóry i wzrost nabłonka. Natomiast CK16 to hiperproliferacyjny keratynocytowy marker wzorców różnicowania. Zwiększenie poziomu β -endorfiny ma pozytywny efekt. Ale w ranach przewlekłych poziom tego peptydu jest patologicznie podwyższony, co zaburza regulację między receptorem μ i β -endorfiną, w konsekwencji prowadząc do nieprawidłowego gojenia.

Badania prowadzone przez Cheng i wsp. 2008 pokazują, że receptory opioidowe (μ , δ i κ) występują na fibroblastach, keratynocytach w naskórku i skórze właściwej. Z ich doświadczeń wynika, że nadmierna ekspresja tych trzech białek prowadzi do powstania blizn przerostowych, które są efektem przesadnego gojenia ubytku skóry. Oznacza to, że receptory opioidowe odgrywają istotną rolę w gojeniu się ran.

Yang i wsp. 2020 badali wpływ na gojenie ran innego endogennego peptydu opioidowego – β -neoendorfiny. Swoje doświadczenia prowadzili na hodowli ludzkich keratynocytów i mysich embrionalnych fibroblastów. Wykazali, że β -neoendorfina przyspiesza zamykanie ran. Według nich efektem poprawy gojenia była aktywacja szlaku sygnałowego ERK 1/2 (ang. *extracellular signal-regulated kinase 1 and 2*, kinaza aktywowana przez czynniki pozakomórkowe 1 i 2) w ludzkich keratynocytach. W swoich badaniach zauważyli zwiększoną migrację tych komórek i fibroblastów, bez zmian w ich proliferacji. Wzrost nacieku keratynocytów Yang i wsp. 2020 wyjaśnili jako prawdopodobny efekt stymulacji aktywności MMP-2 i MMP-9 przez β -neoendorfina.

Peptydy opioidowe są syntetyzowane także w komórkach odpornościowych takich jak monocyty/makrofagi. Nissen i wsp. 1997 badali obecność enkefaliny w tkankach ludzkiej skóry zajętej łuszczycą, która jest chorobą zapalną. Otrzymane przez nich wyniki pokazały zwiększoną ilość zarówno enkefaliny, jak i komórek CD68 (ang. *cluster of differentiation 68*, białko błony lizosomalnej charakteryzujące makrofagi) pozytywnych w skórze właściwej. Ich badania wskazały na zaangażowanie opioidów w procesy zapalne/immunologiczne zachodzące w skórze i produkcję tych związków przez komórki odpornościowe.

Goldsmith i wsp. 2011 badając rolę agonisty receptora μ DALDA (ang. [D-Arg2,Lys4]dermorphin (1,4) amide, amid [D-Arg2, Lys4] (1-4) dermorfiny) w ostrym modelu uszkodzenia jelita u myszy wywołanym DSS (ang. *dextran sodium sulfate*, siarczan dekstranu sodu) i *in vitro*, zaobserwowali poprawę gojenia rany oraz zmniejszenie stanu zapalnego. Peptyd ten chronił przed ostrym uszkodzeniem jelita, a jego działanie było związane z aktywacją STAT3 (ang. *signal transducer and activator of transcription 3*, przekaźnik sygnału i aktywator transkrypcji 3).

1.4.2.1. Bifalina

Bifalina jest syntetycznym peptydem opioidowym, analogiem enkefaliny, który po raz pierwszy został zsyntetyzowany przez Profesora Andrzeja Lipkowskiego. Ten dimeryczny oktapeptyd posiada dwa biologicznie aktywne farmakofory enkefaliny. Bifalina ma wysokie powinowactwo do receptorów opioidowych μ , δ i mniejsze do receptora κ .

Enkefaliny będące peptydami opioidowymi wykazują działanie immunomodulujące. Działanie takie wykazuje również bifalina będąca pochodną enkefaliny. W badaniach *in vitro* z użyciem PBMC (ang. *peripheral blood mononuclear cell*, komórki jednojądrzaste krwi obwodowej) bifalina wykazała działanie zwiększające: cytotoksyczność komórek NK (ang. *natural killer*, naturalni zabójcy), proliferację ludzkich limfocytów T i chemotaksję monocytów. Bifalina wpływała również na poziom cytokin. Zwiększyła produkcję IL-2 ang. *interleukin 2*, interleukina 2 i zmniejszyła TNF- α . (Mehrotra i wsp. 2002)

W badaniach *in vivo* z użyciem mysiego modelu zapalenia okrężnicy scharakteryzowano przeciwzapalne działanie bifaliny. Komórki immunologiczne, dokładniej niektóre populacje leukocytów produkują endogenne peptydy opioidowe, w tym enkefaliny. Bifalina, która jest pochodną enkefaliny działa na receptor μ , a ten uważa się, że w znacznym stopniu odpowiada za hamowanie zapalenia. Pozbawione receptora μ myszy częściej zapadają na zapalenie okrężnicy, a agoniści tego receptora wpływają na uwalnianie związków o działaniu prozapalnym i na proliferację limfocytów. Dlatego też pochodna enkefaliny bifalina może hamować zapalenie. (Sobczak i wsp. 2014)

Z kolei w badaniach Popiolek-Barczyk i wsp. 2017 bifalina zmniejszała poziom receptora opioidowego μ w pierwotnej hodowli komórek mikrogleju pochodzących z kory mózgowej szczurów, aktywowanych LPS (ang. *lipopolysaccharide*, lipopolisacharyd). Mikroglej występuje w OUN i są to nieneuronalne komórki odpornościowe, które stanowią źródło makrofagów. Podczas stanów zapalnych OUN komórki mikrogleju są aktywowane razem z produkcją cytokin prozapalnych (m.in. IL-6, TNF- α). Mikroglej odpowiada za niszczenie różnych mikroorganizmów (takich jak wirusy) i moduluje zmienioną podczas neuropatii łączność synaptyczną. W pracy Popiolek-Barczyk i wsp. 2017 bifalina w stężeniach od 0,1 do 20 μ M nie wpływała na żywotność komórek mikrogleju. Ponadto łącząc się z receptorem μ działała neuroprotekcynie na komórki mikrogleju, zmniejszając ich nadmierną aktywację. Stwierdzono, że działanie bifaliny może odbywać się zależnie i niezależnie od receptorów opioidowych. Na komórkach mikrogleju nie występuje receptor opioidowy δ , ale są obecne receptory μ i κ . I tak w sposób zależny od receptorów opioidowych bifalina obniżyła ekspresję białka receptora μ . Natomiast w sposób niezależny od receptorów opioidowych, bifalina zmniejszyła poziom cytokin prozapalnych m.in. IL-6, TNF- α , przeciwzapalnych m.in. IL-10 (ang. *interleukin 10*, interleukina 10), fosforylację STAT3 i ERK1/2. Działanie bifaliny niezależne od receptorów opioidowych odbywało się przez receptor nocycetyny, który także jest obecny na komórkach mikrogleju. Bifalina działa w ten sposób na białko STAT3, które odgrywa istotną rolę w neuroprotekcynnej aktywacji makrofagów (mikrogleju) i jest związane

z polaryzacją tych komórek. Zmniejszenie szlaku STAT3 przez bifalinę prawdopodobnie pośredniczy w zmniejszeniu poziomu ww. cytokin. Szlaki STAT3 i ERK1/2 są związane z rozwojem zapalenia nerwów podczas neuropatii. Natomiast zastosowanie bifaliny w modelu bólu neuropatycznego u szczurów prowadzi do analgezji i jednocześnie zmniejsza stan zapalny wywołany przez mikroglej. (Popiolek-Barczyk i wsp. 2017)

Pozytywne działanie bifaliny zauważono także w gojeniu ran nabłonka rogówki. (Yildiz i wsp. 2018) Badania prowadzono na modelu ran *in vitro* w pierwotnej hodowli ludzkich komórek nabłonka rogówki. W tych badaniach bifalina nie wykazała toksycznego wpływu na komórki przy stężeniu poniżej 100 μM , za to przy stężeniu 1 μM zwiększyła zamykanie rany i migrację komórek. Natomiast nie zaobserwowano wpływu bifaliny na proliferację ludzkich komórek nabłonka rogówki w teście proliferacji Ki67.

1.4.3. Preparaty keratynowe

Keratyna jest białkiem pochodzenia naturalnego znajdującym się m.in. we włosach, wełnie, piórach. Nazwa białka powstała od greckiego słowa „kera”, które oznacza róg. Choć użycie po raz pierwszy keratyny w gojeniu ran zostało opisane w XVI wieku, to dopiero w XX wieku rozpoczęto intensywne badania nad wykorzystaniem jej jako materiału biomedycznego.

Przed rozpoczęciem badań z keratyną prowadzono doświadczenia z użyciem takich biomolekuł jak żelatyna, kolagen, fibroina, albumina, chitozan, kwas hialuronowy i alginian. (Rouse i Dyke 2010) Jednak, jak się okazało, keratyna wypada lepiej na tle kolagenu, chitozanu i alginianu w zastosowaniach medycznych. Jednym z powodów jest występowanie u ludzi naturalnych enzymów rozkładających kolagen – kolagenaz, co daje przewagę keratynie, gdyż w organizmie ludzkim nie zachodzi ekspresja keratynaz rozkładających to białko. Powoduje to, że keratyna jest bardziej stabilna, ponieważ proces jej degradacji jest wolniejszy. Z kolei alginian i chitozan same z siebie nie przyspieszają gojenia się ran, tak jak dzieje się to w przypadku keratyn. (Rajabi i wsp. 2020) Materiały pozyskane z surowców naturalnych posiadają szczególne właściwości. Z kory włókien włosa można otrzymać ekstrakty do produkcji biomateriałów, które przypominają ECM. Ponadto keratyna posiada czynniki naprawcze i strukturę jak w ludzkiej skórze, co zapobiega silnym reakcjom immunologicznym po przeszczepie zrobionym z keratyny. Te właściwości powodują, że keratyna jest coraz częściej stosowana do produkcji materiałów medycznych. (de Guzman i wsp. 2015, Sun i wsp. 2016)

Keratyna posiada wiele pozytywnych właściwości takich jak biokompatybilność, co oznacza, że nie wpływa toksycznie na tkanki gospodarza. Jest także biodegradowalna, a

zachowanie w tkance zależy od pH keratyny (keratyny kwasowe/zasadowe). (Rajabi i wsp. 2020) Ponadto wykazuje zdolność do polimeryzacji, samoorganizacji i kontroli zachowania komórek: ich przyczepiania, naciekania i proliferacji. (Rouse i Dyke 2010) Keratyna swoje zdolności do wiązania białek i komórek zawdzięcza trzem motywom wiążącym:

- RGD (ang. *arginine-glycine-aspartic acid*, arginina-glicyna-kwas asparaginowy),
- LDV (ang. *leucine-aspartic acid-valine*, leucyna-kwas asparaginowy-walina)
- EDS (ang. *glutamic acid-aspartic acid-serine*, kwas glutaminowy-kwas asparaginowy-seryna).

(Rouse i Dyke 2010, Rajabi i wsp. 2020)

W literaturze można znaleźć liczne prace na temat różnego rodzaju biomateriałów otrzymanych z keratyny, sposobów ich otrzymywania i roli tych biomateriałów w gojeniu ran. Mało jest jednak informacji na temat badań dotyczących adsorpcji związków chemicznych na powierzchni biomateriałów z keratyny i ich uwalniania do miejsca leczenia. Choć te dane literaturowe są nieliczne, pokazują, że keratyna jest cennym nośnikiem bioaktywnych cząsteczek (czynników wzrostu, witamin, antybiotyków, potencjalnych leków). (de Guzman i wsp. 2015)

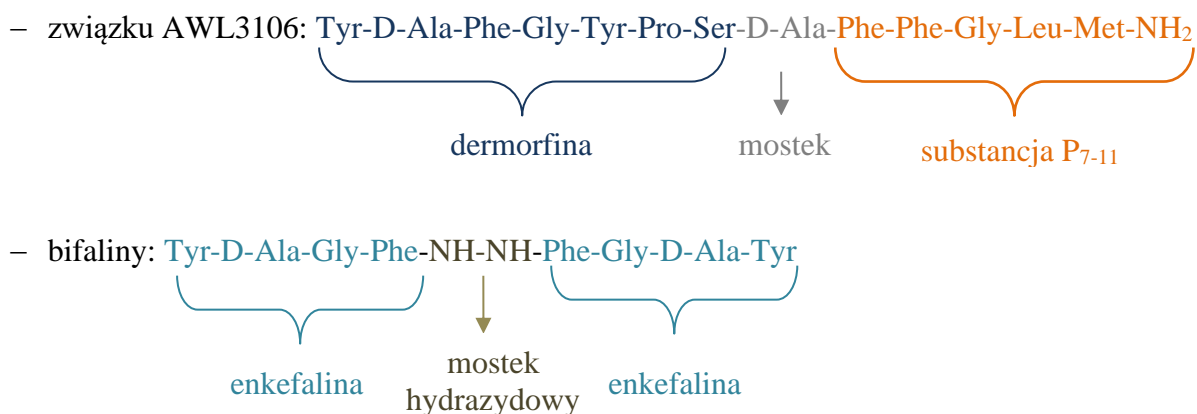
2. Założenia i cel pracy

Owrzodzenia w stopie cukrzycowej stanowią duży problem ze względu na częstość występowania i brak skutecznej metody leczenia. Kończyny pacjentów z cukrzycą cechuje neuropatia i niedokrwienie, co powoduje rozwój ZSC, kończącej się czasami amputacją kończyny. Jedynym skutecznym postępowaniem ograniczającym rozwój ZSC jest wyrównanie poziomu cukru we krwi. W przypadku powstania ZSC w zależności od przeważającego patologicznego czynnika (ilość wysięku, obecność tkanki martwiczej, sucha rana itd.), stosuje się różnego rodzaju opatrunki. Niestety obecnie dostępne opatrunki wykazują ograniczoną skuteczność, dlatego cały czas prowadzi się badania nad opracowaniem bardziej efektywnych metod leczenia.

Najważniejszy element opatrunku stanowi substancja, która wspomaga proces gojenia ran. Dlatego też w wielu grupach naukowych prowadzi się badania mające na celu opracowanie nowych preparatów przyspieszających gojenie ran. W literaturze naukowej można znaleźć przesłanki, które wskazują, że pobudzenie receptorów opioidowych i receptora tachykininowego NK-1 prowadzi do modulacji stanu zapalnego, co sprzyja przejściu gojącej się rany z fazy zapalnej do fazy proliferacyjnej i przyspieszeniu procesów zachodzących w gojącej się ranie. Z tego powodu interesującą klasą związków pod kątem użyteczności w opatrunkach stanowią peptydy hybrydowe oddziałujące z receptorami opioidowymi i receptorem tachykininowym NK-1 lub tylko z receptorami opioidowymi. Przykładem tego typu związków są peptydy badane w mojej pracy doktorskiej.

Celem mojej pracy doktorskiej była ocena wpływu na proces gojenia ran dwóch związków: peptydu hybrydowego typu opioid-neurokinina (AWL3106) i dimerycznego peptydu opioidowego (bifalina).

Sekwencja aminokwasowa:



Badane peptydy planowałam aplikować na rany w formie zaadsorbowanej na preparatach keratynowych, stanowiących pewnego rodzaju rusztowania w stosowanym opatrunku. Z tego względu konieczne było również zaplanowanie niezależnych badań wpływu na proces gojenia ran używanych do adsorpcji preparatów keratynowych.

Prace badawcze nad nowymi opatrunkami prowadzi się przy wykorzystaniu różnych modeli zwierzęcych, jednak żaden z dostępnych modeli zwierzęcych nie oddaje w pełni procesów zachodzących w ZSC u ludzi, co świadczy o tym, że opracowanie badawczego modelu owrzodzenia w stopie cukrzycowej nie jest łatwe.

W mojej pracy doktorskiej zamierzałam zastosować pewną modyfikację opisanych w literaturze modeli zwierzęcych trudno gojącej się rany cukrzycowej, polegającą na indukowaniu rany przez oparzenie skóry szczurów, u których wcześniej wywołano cukrzycę streptozotocynową. Badane opatrunki zamierzałam aplikować na ranę w formie zasypki lub maści.

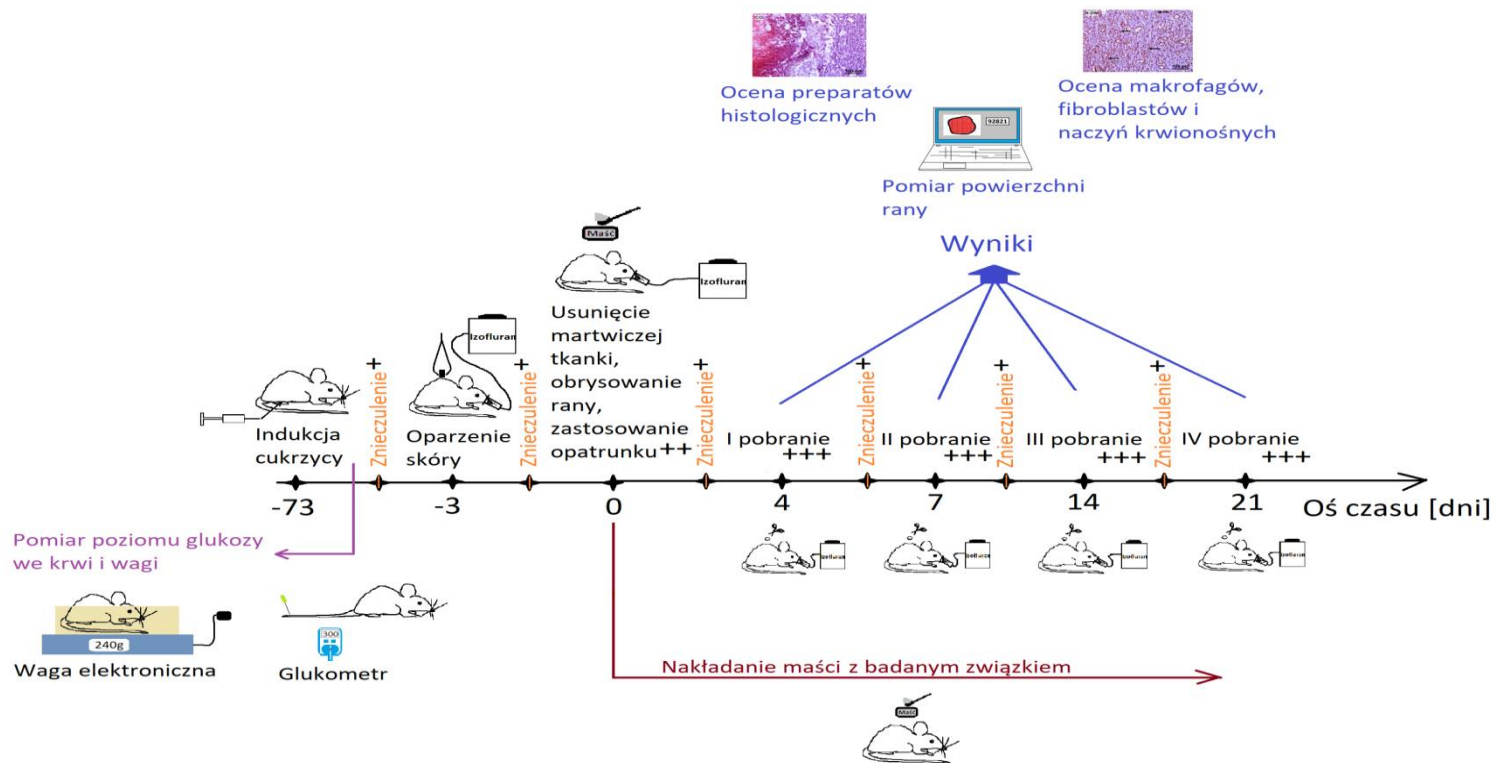
Zaplanowane przeze mnie badania obejmowały poniższe etapy:

1. Przeprowadzenie eksperymentu badawczego w szczurzym modelu gojenia ran
 - wywołanie cukrzycy u szczurów
 - wyindukowanie rany i obserwacja gojenia rany (zarastanie rany) u szczurów z wywołaną cukrzycą i szczurów kontrolnych w okresie 21 dni
 - pobieranie materiału do badań histopatologicznych i immunohistochemicznych (w dniach 4, 7, 14 i 21)
2. Badania histopatologiczne:
 - ocena grubości naskórka (poprzez barwienie hematoksyliną i eozyną)
 - ocena zawartości kolagenu i ułożenia nowych włókien kolagenowych (poprzez barwienie trichromem wg. Massona, ang. *Masson's trichrome staining*)
3. Badania immunohistochemiczne:
 - ocena liczby makrofagów (z użyciem przeciwciał charakteryzujących makrofagi)
 - ocena liczby naczyń krwionośnych (z użyciem przeciwciał charakteryzujących komórki śródbłonka naczyń)
 - ocena liczby fibroblastów (z użyciem specyficznego przeciwciała na obecność charakterystycznego dla fibroblastów białka)
4. Analiza otrzymanych wyników pod kątem oceny wpływu poszczególnych związków na procesy zachodzące w trudno gojącej się ranie

3. Materiały i metody

3.1. Zwierzęta doświadczalne

Wszystkie badania (ryc. 3.1) przeprowadzono po uzyskaniu zgody IV Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach w Warszawie (nr 77/2015). W doświadczeniach wykorzystano 6-7-tygodniowe samce szczurów stada Wistar o wadze 225,0 g ($\pm 17,5$ g), pochodzące ze Zwierzętarni Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego, PAN (Warszawa). Łącznie do badań użyto 95 szczurów. Przed rozpoczęciem eksperymentu zwierzęta podzielono na 6 grup: 3 grupy kontrolne i 3 grupy badane. Zwierzęta utrzymywano w stałej temperaturze $22\pm 1^\circ\text{C}$ i wilgotności oraz 12 godzinnym cyklu dzień/noc. Szczury miały zapewnioną standardową granulowaną paszę i wodę *ad libitum*. Badania na szczurach były prowadzone w budynku Zwierzętarni IMDiK PAN (Warszawa).



Ryc. 3.1 Schemat przedstawiający procedurę badawczą (źródło: opracowanie własne)

+ znieczulenie wziewne izofluranem, ++ nakładanie codziennie na ranę opatrunku; od dnia 0 do dnia 20 włącznie, +++ pobranie tkanki do badań histopatologicznych i oznaczenie powierzchni rany

3.1.1. Wywołanie cukrzycy u szczurów

Na potrzeby doświadczeń zwierzętom wyindukowano cukrzycę poprzez podanie dootrzewnowo STZ (Sigma-Aldrich, USA), która powoduje zniszczenie komórek β tworzących miąższ wysypek Langerhansa w trzustce, w jednorazowej dawce 80 mg/kg masy ciała, wg. zmodyfikowanej wersji procedury Wu i Huan 2008. Tuż przed iniekcją STZ była rozpuszczana w buforze cytrynianowym o pH=4,5. Poziom glukozy monitorowano za pomocą glukometru (Accu-Chek, Roche) pobierając kroplę krwi z żyły ogonowej bocznej, którą umieszczano na pasku glukometru. Po 73 dniach od podania STZ szczury z glikemią powyżej ≥ 250 mg/dL zakwalifikowano do kolejnego etapu badań. Przed każdym zabiegiem szczury były znieczulane wziewnie mieszkanką izofluranu z tlenem w dawce 0,5-3,5% (objętościowo).

3.2. Indukowanie rany i postępowanie z raną

W zaznaczonym uprzednio miejscu na grzbiecie za pomocą maszynki elektrycznej golono sierść i na 40 sekund umieszczano gorącą podstawę ciężarka o kształcie walca, o wadze 77 g i średnicy podstawy 1,9 cm, i temperaturze 100°C. Obciążnik ogrzewano we wrzącej wodzie (100°C). Miejsce oparzenia było dezynfekowane przy pomocy 70% alkoholu etylowego. Oparzenia zostały wykonane według zmodyfikowanej wersji procedury Oriana i wsp. 2013. Po wykonaniu oparzenia zwierzęta trzymano pojedynczo w klatkach. Po 3 dniach z miejsca urazu usuwano naskórek i skórę właściwą do *panniculus carnosus*.

Przez kolejne 21 dni, codziennie, na obszar rany nakładano opatrunek w postaci maści. Wyjątek stanowiła grupa badana, w której zastosowany opatrunek zawierał sam preparat keratynowy i był w postaci zasyпки. W tym przypadku opatrunek był stosowany tylko pierwszego dnia.

3.3. Badane związki i sposób ich podania

Badanymi związkami były:

- *związek AWL3106* – peptyd o charakterze agonisty receptora opioidowego typu μ , δ (pochodna dermorfiny) oraz neurokininowego typu NK-1 (pochodna SP)
- *bifalina* – peptyd o charakterze agonisty receptora opioidowego typu μ i δ (dimeryczna pochodna enkefaliny)

Skład opatrunku w zasypce:

Preparaty keratynowe

Proporcje ilościowe składników opatrunku w maści:

1) Medium na bazie lanoliny [g] : Preparaty keratynowe [g] : Peptyd AWL3106 [g]		
9	1	0,015
2) Medium na bazie lanoliny [g] : Preparaty keratynowe [g] : Peptyd bifalina [g]		
9	1	0,010

3.4. Podział szczurów na grupy

Grupy kontrolne (tab. 3.1) stanowiły:

- szczury zdrowe i z wyindukowaną raną bez opatrunku (*pozytywna kontrola*)
- szczury z cukrzycą i z wyindukowaną raną bez opatrunku (*negatywna kontrola*)
- szczury z cukrzycą i z wyindukowaną raną, na którą nakładano maść stosowaną u pacjentów z owrzodzeniami/oparzeniami – *iruxol®mono (dodatkowa kontrola)*

Grupy badane (tab. 3.1) stanowiły:

- szczury z cukrzycą i z wyindukowaną raną, na którą nakładano preparaty keratynowe w postaci zasypki
- szczury z cukrzycą i z wyindukowaną raną, na którą nakładano preparaty keratynowe z zaadsorbowanym związkiem AWL3106, w postaci maści
- szczury z cukrzycą i z wyindukowaną raną, na którą nakładano preparaty keratynowe z zaadsorbowaną bifaliną, w postaci maści

Tab. 3.1 Zastosowane kontrole i badane opatrunki

Nazwa opatrunku	Postać opatrunku	Dawkowanie
KONTROLE		
Pozytywna kontrola	-	-
Negatywna kontrola	-	-
Dodatkowa kontrola (<i>iruxol®mono*</i>)	maść	codziennie
BADANE OPATRUNKI		
Preparat keratynowy	zasypka	jednorazowo, pierwszego dnia
Preparat keratynowy z zaadsorbowanym związkiem AWL3106	maść	codziennie
Preparat keratynowy z zaadsorbowanym związkiem bifaliną	maść	codziennie

* *Iruxol®mono* zawiera w swoim składzie enzym proteolityczny – kolagenazę (klostrydiopeptydaza A), która powoduje rozpad włókien kolagenu. Pozwala to na przyspieszenie oczyszczenia rany i prowadzi do powstania pozbawionego martwicy łożyska rany (Tallis i wsp. 2013).

Tab. 3.2 Nazwy grup

Nazwa grupy	Opis
N-STZ	szczury, którym nie podano STZ
STZ	szczury po iniekcji STZ
N-DM	szczury bez cukrzycy z raną nieleczoną (pozytywna kontrola)
DM	szczury z cukrzycą z raną nieleczoną (negatywna kontrola)
CO	szczury z cukrzycą z raną traktowaną maścią stosowaną u pacjentów z owrzodzeniami/oparzeniami – <i>iruxol®mono</i> (dodatkowa kontrola)
3106	szczury z cukrzycą z raną traktowaną preparatem keratynowym z zaadsorbowanym związkiem AWL3106
BIF	szczury z cukrzycą z raną traktowaną preparatem keratynowym z zaadsorbowaną bifaliną
ALP	szczury z cukrzycą z raną traktowaną preparatem keratynowym z wełny alpaki

3.5. Ocena wpływu badanych związków na proces gojenia ran

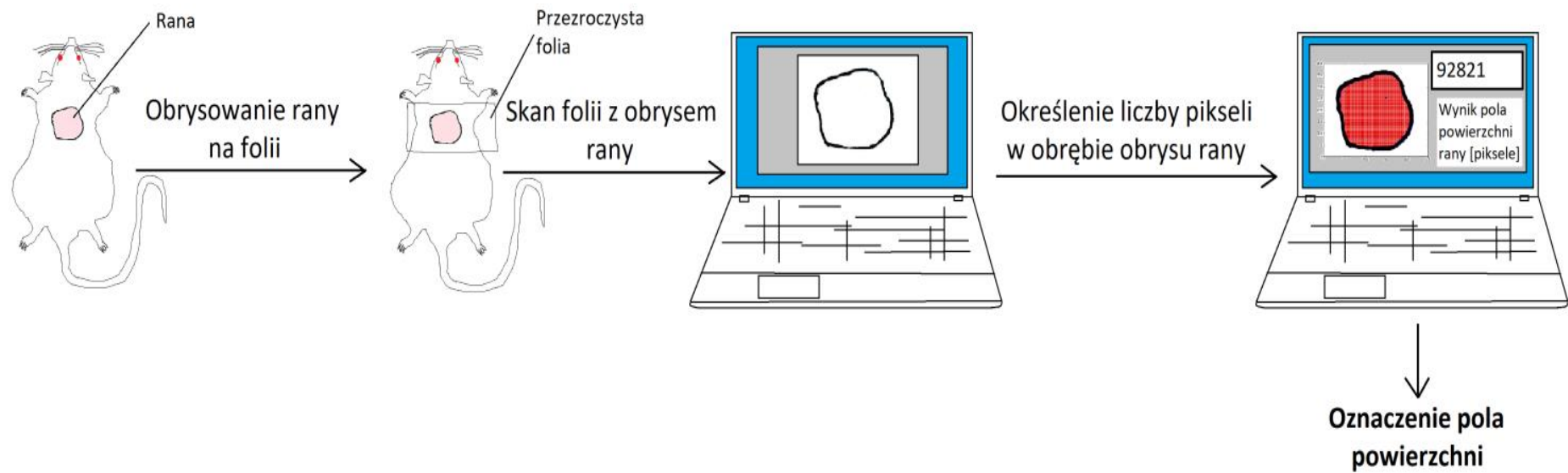
Do oceny wpływu badanych związków na proces gojenia się ran zastosowano: pomiar pola powierzchni ran, barwienie H&E (ang. *hematoxylin and eosin*, hematoksylina i eozyna), barwienie włókien kolagenowych trichromem wg. Masson'a oraz oznaczenie liczby makrofagów, fibroblastów i naczyń krwionośnych metodami immunohistochemicznymi.

W celu oceny postępującego procesu gojenia się rany po zastosowaniu wybranego preparatu (tab. 3.1) pobierano materiał do badań w ciągu 21 dni. Próbki tkanek (skóry) i niezbędne dane (obrys rany, zdjęcia) zbierano w dniach: 4, 7, 14 i 21 gojenia się rany. Było 6 grup badanych. Zbadana została maść stosowana u pacjentów z owrzodzeniami/oparzeniami o nazwie *iruxol®mono*, związek AWL3106, bifalina i preparat keratynowy. Po pobraniu materiału do badań, zwierzęta uśmiercano poprzez przedawkowanie izofluranu.

3.5.1. Pomiar pola powierzchni ran

W celu pomiaru powierzchni rany w dniach 0, 4, 7, 14 i 21 obrysowywano jej granice na przezroczystej folii, którą następnie skanowano i zapisywano w edytorze grafiki jako plik formatu *.png*. Utworzony obraz przesyłano do skryptu w języku Python, w którym liczone pole powierzchni (ryc. 3.2). Kod programu korzysta z biblioteki PIL oraz numpy. Procent zarośnięcia obszaru rany obliczano używając formuły: $\text{zarośnięcie rany (\%)} = 100\% - [(\text{obszar rany w dniu „n” w pikselach} * 100\%) / \text{obszar rany w dniu 0 w pikselach}]$; „n” - oznacza numer dnia.

Wybrana metoda służy do pomiaru pola powierzchni ran przewlekłych. Pole powierzchni rany jest liczone za pomocą algorytmu opartego na analizie koloru. Powyższy algorytm pozwala na wykrycie granicy rany i ilościowe określenie postępu w gojącej się ranie. Jest precyzyjna i pozwala uzyskać jak najmniejszy błąd przy pomiarze.



Ryc. 3.2 Schemat przedstawiający pomiar pola powierzchni ran (źródło: opracowanie własne)

3.5.2. Przygotowanie tkanek do barwień i oznaczeń immunohistochemicznych

W dniach 4, 7, 14, 21 pobierano tkankę z obszaru rany, którą utrwalano w roztworze 10% formaliny. Po utrwaleniu w formalinie tkankę przenoszono kolejno do 10%, 20% i 30% sacharozy. Ostatecznie tkanki zamrażano (w -80°C). Z tak utrwalonej tkanki przygotowywano na mikrotomie (HM550, Thermo Scientific) preparaty histopatologiczne o grubości $4\ \mu\text{m}$. Następnie otrzymane skrawki umieszczono na szkiełkach i poddano barwieniom. Każde z barwień i oznaczeń immunohistochemicznych zostało przeprowadzone zgodnie z instrukcją załączoną w zestawie z odczynnikami. Do zamykania preparatów posłużyło po barwieniach Neo-Mount® (MerckKGaA, Darmstadt, Niemcy), a po oznaczaniu immunohistochemicznym VectaMount™ (Vector Laboratories, Kalifornia, USA).

3.5.2.1. Barwienie hematoksyliną i eozyną

H&E zakupiono z MerckKGaA, Darmstadt, Niemcy. W pierwszym etapie szkiełka ze skrawkami umieszczono w hematoksylinie (3 min), następnie opłukano w 0,1% roztworze HCl (2 s). Przez kolejne 5 min szkiełka umieszczono pod bieżącą wodą. Następnie umieszczono w eozynie na 3 min, po czym spłukiwano nadmiar eozyny przez 30 s wodą. Przed zamknięciem szkiełka umieszczano kolejno w 70% (2 min), 85% (1 min) i 96% (3 min) alkoholu etylowym.

3.5.2.2. Barwienie trichromem wg. Masson'a

Odczynniki do barwienia trichromem wg. Masson'a pochodziły z firmy Diapath S.p.A, Martinengo, Włochy. Na pierwszym etapie sporządzono roztwór hematoksyliny Weigerta i inkubowano w nim skrawki przez 10 min. Następnie nadmiar odczynnika usuwano przez 5 min pod bieżącą wodą. Na kolejnym etapie skrawki umieszczono w nasyconym roztworze alkoholowym kwasu pikrynowego na 4 min, następnie szkiełka przez 30 s. przemywano w wodzie destylowanej. Kolejno skrawki inkubowano przez 4 min w pąsowej fuksynie, a jej nadmiar spłukano pod bieżącą wodą (30 s.). Kolejnym odczynnikiem, w którym inkubowano skrawki był kwas fosfomolibdenowy (4 min). Nadmiar kwasu spłukano pod bieżącą wodą. Na ostatnim etapie skrawki zanurzono na 5 minut w niebieskiej anilinie, a później odwodniono w 70%, 85% i 96% alkoholu etylowym (odpowiednio na 2 min, 1 min, 3 min) i oczyszczono za pomocą bibuły.

3.5.2.3. Oznaczenie makrofagów / naczyń krwionośnych / fibroblastów pierwszorzędowym przeciwciałem skierowanym przeciwko antygenowi CD68/CD34/wimentynie

Pierwszym etapem było blokowanie niespecyficznego wiązania za pomocą 2,5% normalnej surowicy końskiej (VECTOR, Kalifornia, USA), które trwało 50 min. Po której na skrawki nakładano 500-krotnie rozcieńczone poliklonalne królicze przeciwciała przeciwko CD68 lub CD34 (ang. *cluster of differentiation 34*, transbłonowa glikoproteina należąca do molekuł sialomucyn) (Biorbyt, Cambridge, Wielka Brytania) (1 h), lub 250-krotnie rozcieńczone monoklonalne mysie przeciwciała przeciwko wimentynie (Nordic MUBio, Susteren, Holandia) (inkubacja przez noc). Następnie w 0,1% Tween (BioShop, Burlington, Kanada) z PBS (ang. *phosphate buffered saline*, sól fizjologiczna buforowana fosforanem, Sigma Aldrich, Saint Louis USA) umieszczano skrawki na 5 min. Po czym zlewano Tween z PBS i nakładano na 30 min odpowiednio drugorzędowe przeciwciała ImmPRESS* Anti-Rabbit IgG (ang. *immunoglobulin G*, przeciwciała typu G) (made in horse) lub ImmPRESS* Anti-Mouse IgG (rat adsorbed), IgG sprzężone z enzymem peroksydazą chrzanową. Każde z przeciwciał drugorzędowych zakupiono z VECTOR, Kalifornia, USA. Później dwukrotnie przepłukano skrawki w 0,1% Tween z PBS (5 min). Do wywołania reakcji barwnej wykorzystano DAB (ang. *3,3-diaminobenzidine*, diaminobenzydyna, VECTOR, Kalifornia, USA) (5 min). Na koniec nadmiar odczynnika spłukano wodą (5 min) po czym zanurzono w hematoksylinie Mayera. Później zanurzono na 1 s w wodzie z lodówki, z której przeniesiono szkiełka ze skrawkami na 10 min pod bieżącą zimną wodę.

3.5.3. Ocena preparatów i analiza immunohistochemiczna pod mikroskopem świetlnym

Preparaty oceniono pod odwróconym mikroskopem świetlnym Eclipse Ni-U Nikon (modele Optiphot-2, Nikon, Japonia) z oprogramowaniem Image-Pro Plus przy powiększeniu 100 -, 200- lub 400-krotnym. Zdjęcia włókien kolagenowych i naczyń krwionośnych wykonano odpowiednio przy powiększeniu 400x i 100x. Zawartość kolagenu policzono w polu widzenia na podstawie intensywności koloru, a wynik wyrażono w procentach względem pozytywnej kontroli, którą potraktowano jako 100%. Naczynia krwionośne, makrofagi i fibroblasty także liczono w polu widzenia. Liczbę makrofagów i fibroblastów przeliczono na ilość wszystkich komórek w polu widzenia i podano w %. Wielkość powiększenia i ilość losowych pól, które zastosowano podczas zliczania badanych komórek i struktur przedstawiono w tab. 3.3.

Tab. 3.3 Wykaz zawierający rodzaj badanych komórek/struktur, odpowiadające im powiększenie i ilość pól

Rodzaj badanych komórek/struktur	Wielkość powiększenia obrazu	Ilość losowych pól
Makrofagi	400x	10
Fibroblasty	400x	5
Naczynia krwionośne	200x	10
Kolagen	400x	10
Naskórek	400x	3

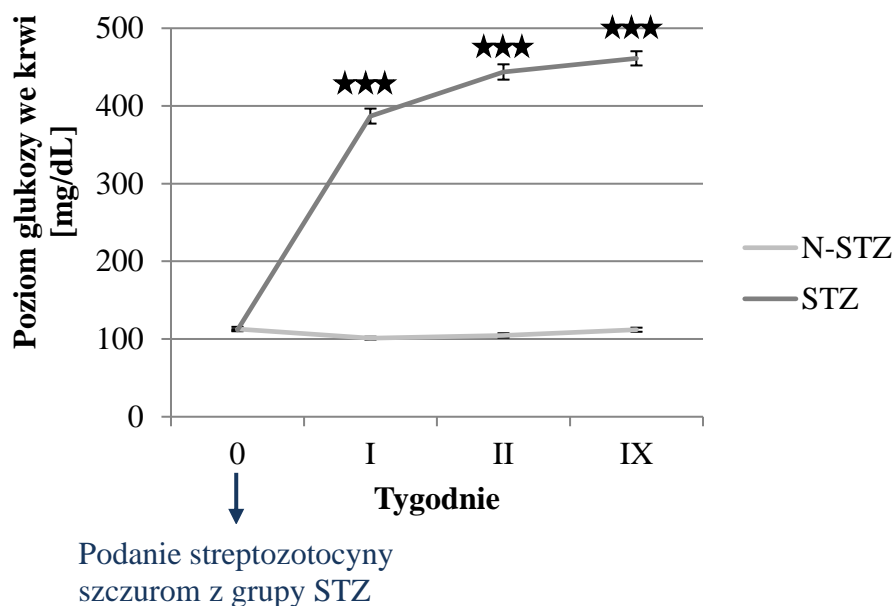
3.6. Analiza statystyczna

Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej. Na wykresach przedstawiono średnią wartość \pm SEM (ang. *standard error of measurement*, standardowy błąd pomiaru). Symbolem ‘n’ w opisie oznaczono liczbę szczurów w grupie. Przeprowadzono test *UManna-Whitney’a* i test t Studenta dla prób niezależnych odpowiednio w celu porównania poziomu glukozy we krwi i przyrostu masy ciała między grupą szczurów, którym nie podano STZ i po iniekcji STZ na poziomie istotności $***p < 0.001$. Ocenę statystyczną różnicy w zawartości włókien kolagenowych między pozytywną kontrolą i negatywną kontrolą przeprowadzono testem t Studenta na poziomie istotności $**p < 0.01$. Do oceny statystycznej różnic pomiędzy raną kontrolną i ranami badanymi zastosowano test ANOVA (ang. *analysis of variance*, analiza wariancji) wraz z testem Dunnetta do wielokrotnych porównań na poziomie istotności $*p \leq 0.05$, $**p \leq 0.01$, $***p \leq 0.001$, $****p \leq 0.0001$. Badania statystyczne objęły także grupę CO, której nie było w publikacji. Do oceny statystycznej różnic pomiędzy poszczególnymi dniami w każdej z grup zastosowano analizę wariancji z powtarzanymi pomiarami wraz z analizą post hoc z wykorzystaniem poprawki Bonferroniego na poziomie istotności $*p < 0,05$, $**p < 0,01$.

4. Wyniki

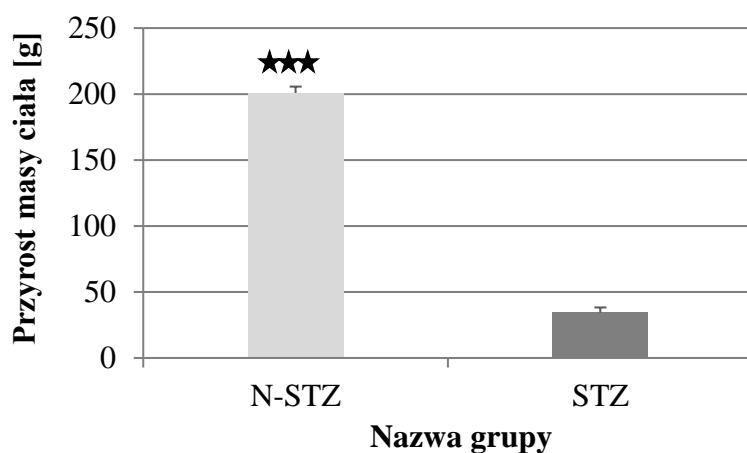
4.1. Ocena rozwoju cukrzycy wywołanej iniekcją streptozotocyny u szczurów

Badania przeprowadzone w tej pracy pokazały, że podanie streptozotocyny istotnie zwiększyło poziom glukozy we krwi u szczurów z grupy STZ w porównaniu do N-STZ ($p < 0,001$, ryc. 4.1). Poziom glukozy we krwi w STZ wynosił 386,94 mg/dL, 443,70 mg/dL i 461,24 mg/dL w pierwszym, drugim i dziewiątym tygodniu. Natomiast w N-STZ odpowiednio 101,13 mg/dL, 104,63 mg/dL i 112,00 mg/dL. W dniu 0 przed podaniem streptozotocyny poziom glukozy we krwi wynosił w grupie STZ 111,72 mg/dL, a w grupie N-STZ 112,88 mg/dL.



Ryc. 4.1 Wpływ streptozotocyny na poziom glukozy we krwi szczurów. Zwierzętom odstawiano pokarm i wodę na 4 godziny przed dokonaniem pomiaru. $n_{N-STZ}=8$, $n_{STZ}=87$. Dla istotności statystycznej $***p < 0,001$ vs N-STZ.

Innym parametrem do oceny cukrzycy był pomiar masy ciała szczurów. Jej przyrost w grupie N-STZ (200,8 g) był istotnie statystycznie większy niż w STZ (34,33 g) $p < 0,001$ (ryc. 4.2).



Ryc. 4.2 Wpływ streptozotocyny na przyrost masy ciała szczurów po 9 tygodniach od podania STZ szczurom badanym. Przed każdym pomiarem szczury miały odstawianą paszę i wodę na 4 godziny. $n_{N-STZ}=8$, $n_{STZ}=87$. Dla istotności statystycznej $***p<0.001$ vs STZ.

Ponadto u szczurów z cukrzycą wystąpiło zmętnienie soczewki oka. Pierwsze przypadki zaobserwowano po 8 tygodniach od podania streptozotocyny (ryc. 4.3).



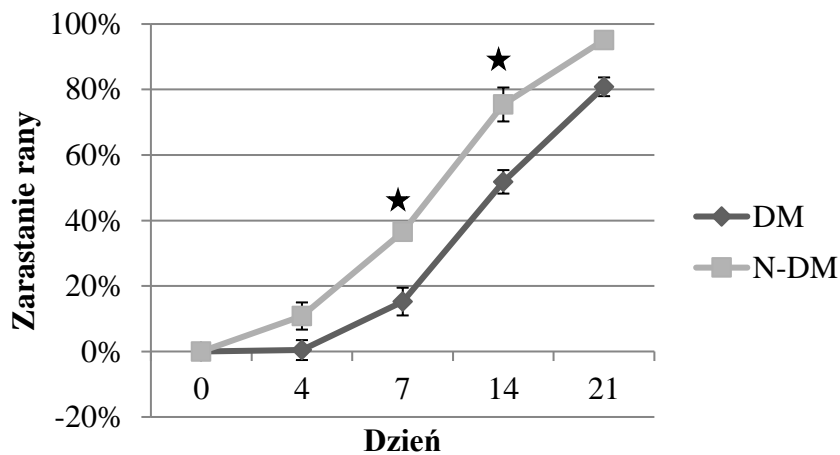
Ryc. 4.3 Zdjęcia makroskopowe zmętnienia soczewki oka u szczurów – późnego objawu cukrzycy.

4.2. Ocena gojenia się modelowego owrzodzenia

Przeprowadzono badania porównawcze gojenia się ran szczurów zdrowych (N-DM) i z wywołaną cukrzycą (DM). W obu grupach nie stosowano opatrunków.

4.2.1. Pole powierzchni rany

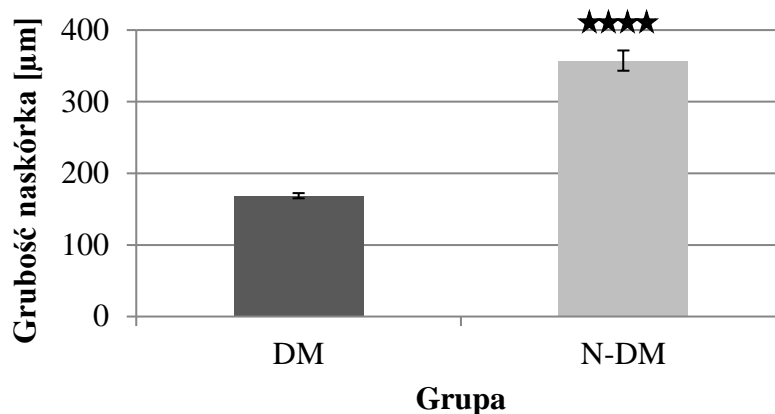
Zaobserwowano, że w 7 i 14 dniu w N-DM rany goiły się statystycznie znacznie szybciej $p \leq 0.05$, $p \leq 0.05$ w porównaniu do DM (ryc. 4.4). Pole powierzchni w 7 dniu wynosiło odpowiednio 36,56% i 15,24%. Z kolei w 14 dniu rana w N-DM była zagojona w 75,43%, a w DM w 51,81%. Uzyskane wyniki pokazały zdecydowanie szybsze zarastanie ran u szczurów zdrowych o 21,32% dla 7 dnia i 23,62% dla 14 dnia w porównaniu do cukrzycowych. W pozostałych dniach gojenie ran szczurów N-DM i DM było podobne (odpowiednio 10,83% i -0,44% dla 4 dnia, 95,13% i 80,83% dla 21 dnia).



Ryc. 4.4 Zmiana powierzchni rany w modelu owrzodzenia w stopie cukrzycowej. Wyniki wyrażono w % w stosunku do powierzchni rany w dniu 0. $n_{DM}=11$, $n_{N-DM}=6$. Dla istotności statystycznej $*p \leq 0.05$ vs DM.

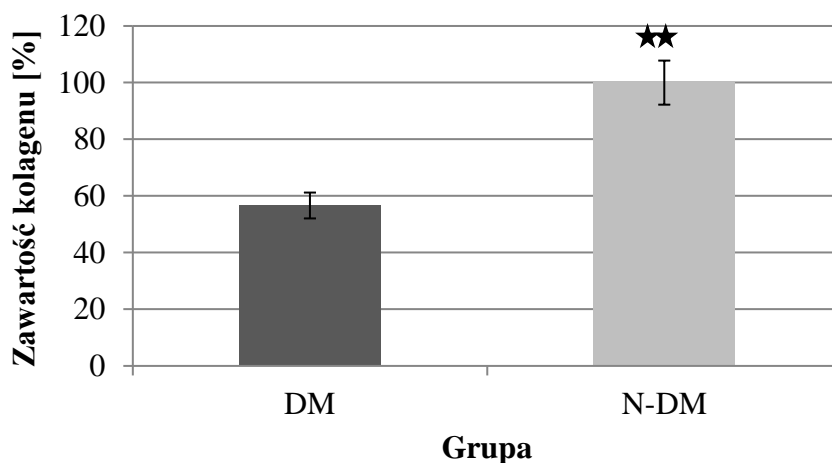
4.2.2. Badania histopatologiczne

Analiza mikroskopowa preparatów barwionych H&E wykazała statystycznie znacznie grubszy naskórek z obszaru rany szczurów zdrowych ($p \leq 0.0001$) w porównaniu do cukrzycowych (ryc. 4.5). Grubość naskórka w grupie N-DM wynosiła 357,36 μm natomiast DM 168,74 μm .



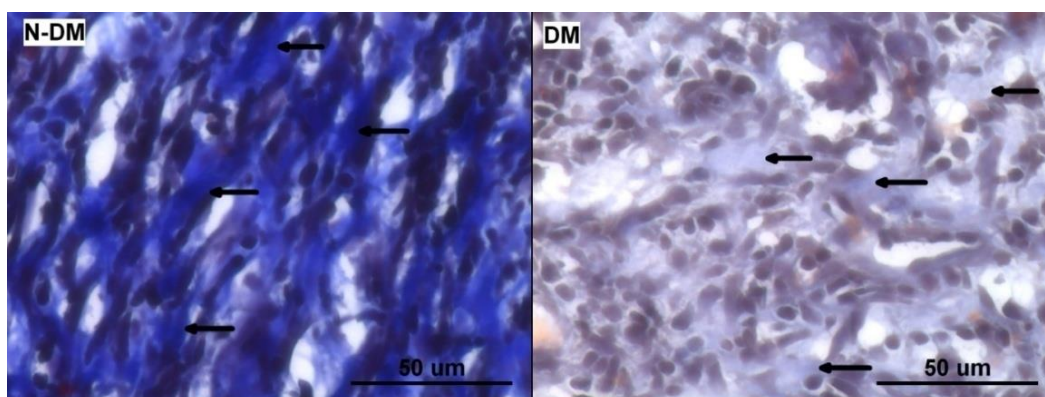
Ryc. 4.5 Grubość naskórka w modelu owrzodzenia w stopie cukrzycowej. Pomiaru dokonano w 21 dniu po zranieniu. n=3. Dla istotności statystycznej ****p<0.0001 vs DM.

Kolejne badanie histopatologiczne przeprowadzono z użyciem barwienia trichromem wg. Massona, które pozwoliło na ocenę zawartego kolagenu. Zawartość włókien kolagenowych w N-DM (100%) była istotnie statystycznie znamienna p<0,01 (p=0,002) w porównaniu do DM (56,63%) (ryc. 4.6).



Ryc. 4.6 Zawartość kolagenu w modelu owrzodzenia w stopie cukrzycowej. Pomiaru dokonano w 21 dniu po zranieniu. n=3. Dla istotności statystycznej **p<0,01 vs DM.

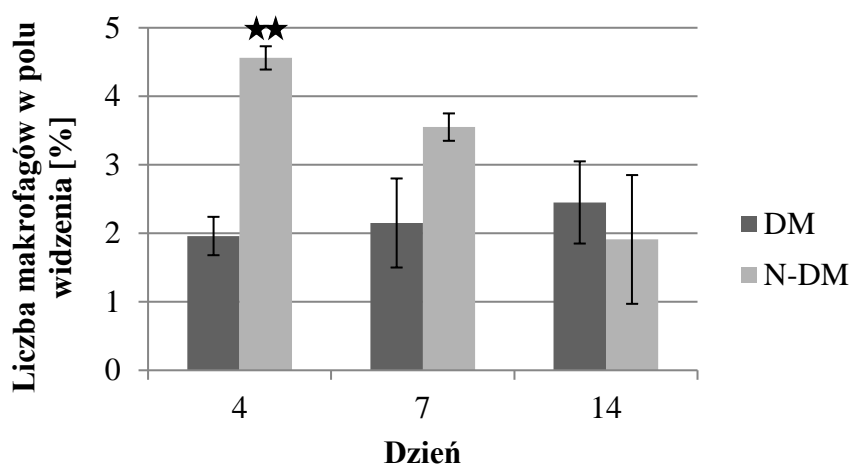
Zdjęcia mikroskopowe włókien kolagenowych w skrawkach skóry pobranej z N-DM i DM zostały pokazane na ryc. 4.7. Grupa N-DM miała więcej kolagenu, był bardziej dojrzały z grubszymi włóknami i regularnym ułożeniem. Natomiast w skrawkach skóry uzyskanej z DM cechował się nierównomiernym rozproszeniem z mniejszą zawartością białka i dojrzałością.



Ryc. 4.7 Włókna kolagenowe w skórze właściwej modelu owrzodzenia w stopie cukrzycowej. Zdjęcia mikroskopowe zrobione w 21 dniu po zranieniu. Strzałka wskazuje włókna kolagenowe.

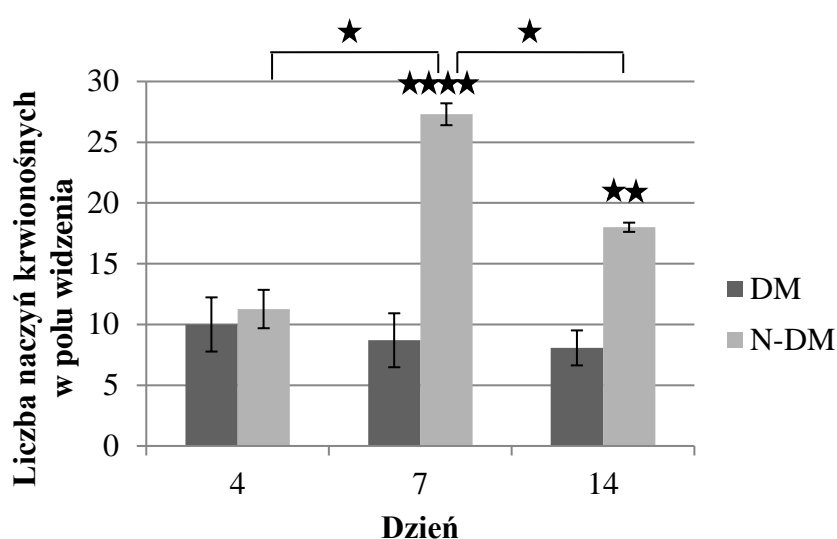
4.2.3. Badania immunohistochemiczne

Przeprowadzono analizę immunohistochemiczną preparatów z wykorzystaniem przeciwciał przeciwko CD68. W badanych preparatach dokonano pomiaru liczby makrofagów. Analiza immunohistochemiczna wykazała statystycznie znamienne procent komórek w 4 dniu gojenia się rany w N-DM $p \leq 0.01$ w porównaniu do DM (ryc. 4.8). Wynosił on 4,56% dla pierwszej grupy i 1,96% dla drugiej. Natomiast w 7 i 14 dniu liczba makrofagów w obu przypadkach była podobna (odpowiednio 3,55% i 1,91% dla N-DM, 2,15% i 2,45% dla DM).

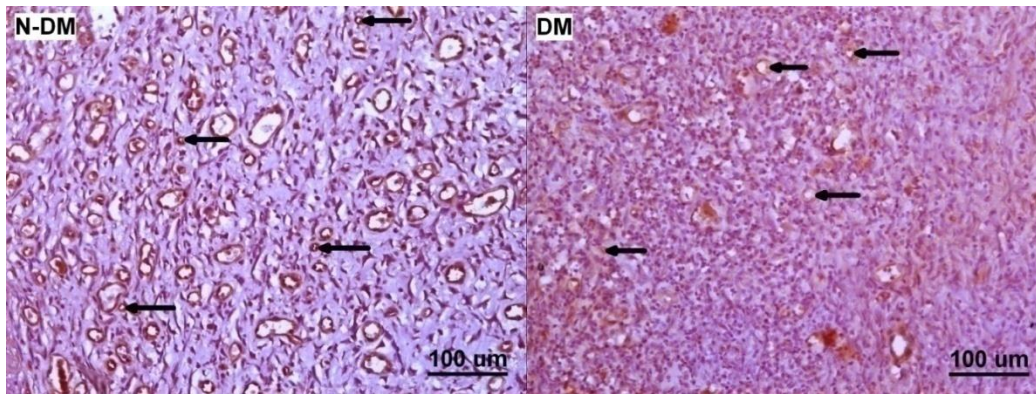


Ryc. 4.8 Zmiana liczby makrofagów w modelu owrzodzenia w stopie cukrzycowej. $n=3$. Dla istotności statystycznej $**p \leq 0.01$ vs DM.

Analizie immunohistochemicznej zostały poddane również naczynia krwionośne, których liczba w 7 i 14 dniu gojenia się rany w grupie N-DM była istotna statystycznie $p \leq 0.0001$ i $p \leq 0.01$ stosownie w porównaniu do DM (ryc. 4.9). W 7 dniu N-DM miało ich 27,30, a w 14 dniu 18 natomiast grupa DM liczyła odpowiednio 8,70 i 8,07. W 4 dniu liczba naczyń krwionośnych była podobna w obu grupach (10,00 dla DM i 11,27 dla N-DM). Z kolei ocena statystyczna w obrębie grupy szczurów zdrowych wykazała, że w 7 dniu ilość naczyń krwionośnych była istotnie wyższa $p < 0.05$ ($p = 0,006$, $p = 0,036$; 27,30) po zestawieniu jej z 4 i 14 dniem (11,27 i 18,00). Ponadto w obrazie histopatologicznym obserwowano wyraźniejsze światło i bardziej zarysowane ściany w grupie N-DM w porównaniu do DM (ryc. 4.10).

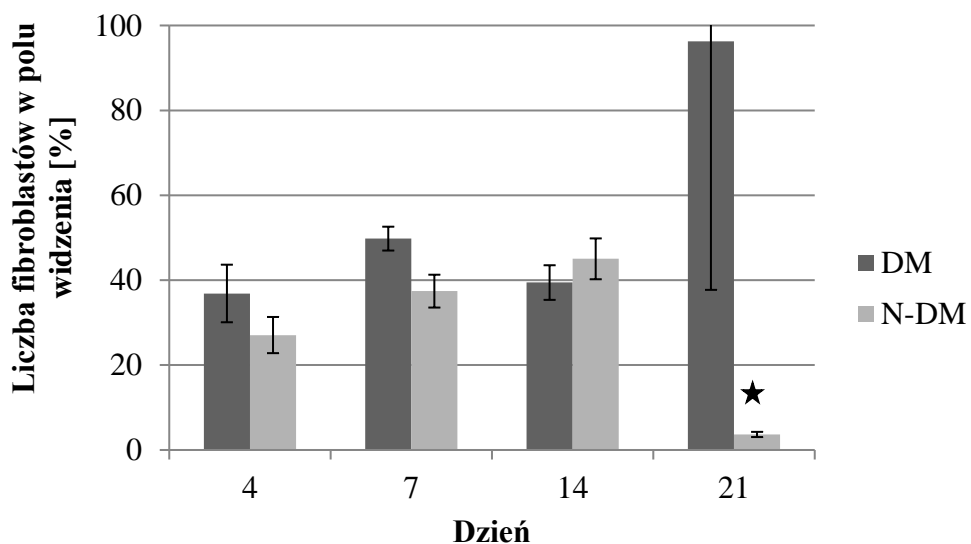


Ryc. 4.9 Zmiana liczby naczyń krwionośnych w modelu owrzodzenia w stopie cukrzycowej. $n=3$. Dla istotności statystycznej $**p \leq 0.01$, $****p \leq 0.0001$ vs DM; $*p < 0.05$ vs 4 i 14 dzień w N-DM.



Ryc. 4.10 Naczynia krwionośne w skórze właściwej modelu owrzodzenia w stopie cukrzycowej. Zdjęcia mikroskopowe z 14 dnia po zranieniu. Strzałka wskazuje naczynia krwionośne.

W badanych preparatach przy użyciu przeciwciał przeciwko wimentynie dokonano pomiaru liczby fibroblastów (ryc. 4.11). Analiza wykazała statystycznie znacznie mniejszą ich liczbę 21 dnia w N-DM $p \leq 0.05$ (3,66%) w porównaniu do DM ($96,28\% \pm 58,56\%$). W pozostałych dniach gojenia się rany w obu grupach zauważono podobną liczbę fibroblastów (odpowiednio 27,07%, 37,42%, 45,03% dla N-DM i 36,87%, 49,79%, 39,44% dla DM).



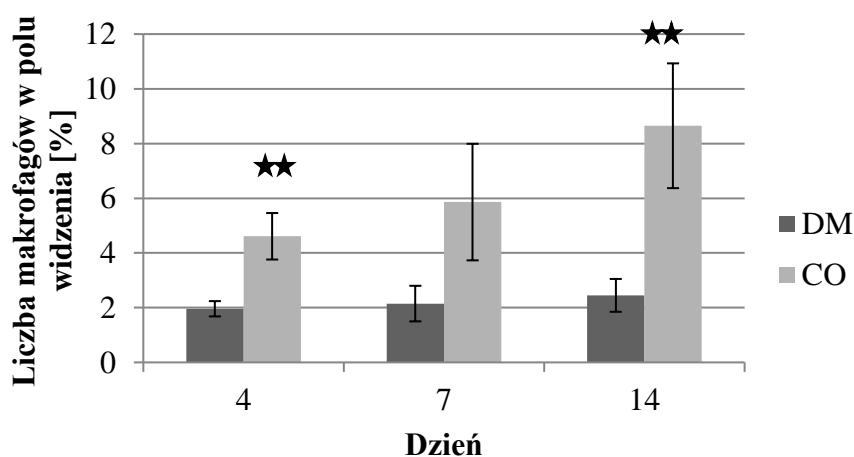
Ryc. 4.11 Zmiana liczby fibroblastów w modelu owrzodzenia w stopie cukrzycowej. $n=3$. Dla istotności statystycznej $*p \leq 0.05$ vs DM.

4.3. Ocena wpływu *iruxol®mono* na proces gojenia się trudno gojącej rany

W celu oceny skuteczności hybrydowych związków zbadano działanie maści komercyjnej o nazwie *iruxol®mono*, którą potraktowano jako dodatkową kontrolę, w szczurzym modelu owrzodzenia w stopie cukrzycowej i porównano ją do DM.

4.3.1. Wpływ *iruxol®mono* na liczbę makrofagów

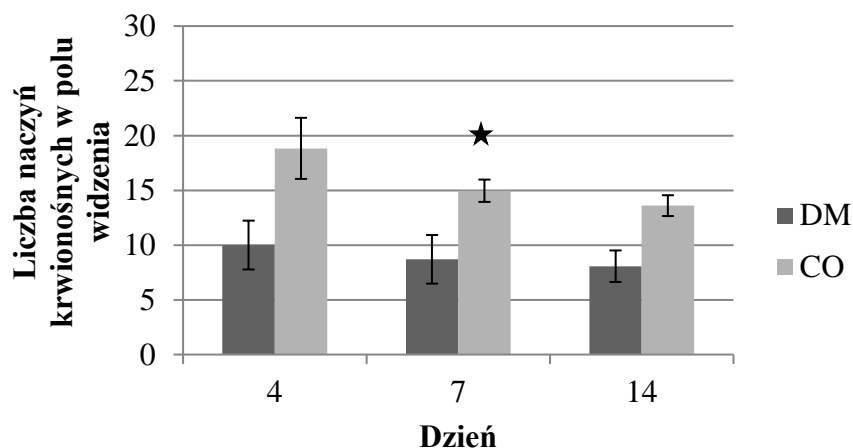
Do zbadania liczby makrofagów użyto metody immunohistochemicznej i przeciwciał CD68. W 4 i 14 dniu gojenia się rany ich liczba w CO była istotna statystycznie $p \leq 0.01$, $p \leq 0.01$ i wynosiła 4,61%, 8,65% w porównaniu do DM odpowiednio 1,96%, 2,45% (ryc. 4.12). W 7 dniu liczba makrofagów w obu grupach była podobna 5,86% ($\pm 2,13\%$) dla pierwszej grupy i 2,15% dla negatywnej kontroli.



Ryc. 4.12 Wpływ *iruxol®mono* na liczbę makrofagów. $n=3$. Dla istotności statystycznej $**p \leq 0.01$ vs DM.

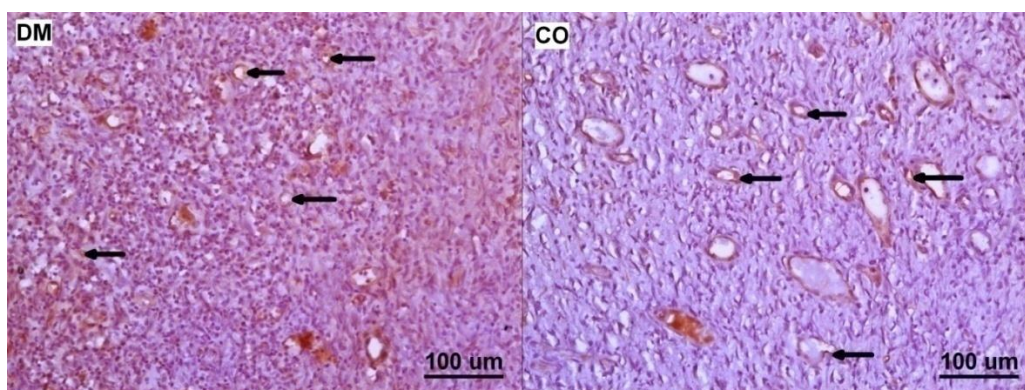
4.3.2. Wpływ *iruxol®mono* na liczbę naczyń krwionośnych

Przeprowadzono analizę immunohistochemiczną preparatów z wykorzystaniem przeciwciał przeciwko CD34. Badania pokazały, że w 7 dniu gojenia się rany liczba naczyń krwionośnych w CO wynosiła średnio 14,96 i dała wynik istotny statystycznie $p \leq 0.05$ w porównaniu do DM, w której uplasowała się na poziomie 8,70. W 4 i 14 dniu ich ilość wynosiła odpowiednio 18,83; 13,60 dla CO, 10,00; 8,07 dla DM i nie była znamienna (ryc. 4.13).



Ryc. 4.13 Wpływ *iruxol®mono* na liczbę naczyń krwionośnych. n=3. Dla istotności statystycznej * $p \leq 0.05$ vs DM.

Badania histopatologiczne w CO pokazały, że naczynia krwionośne mają wyraźne światło, a kształt ich przekroju poprzecznego jest owalny/okrągły. Natomiast w grupie DM obserwowano mało widoczne światło i nieprawidłowe zarysowanie ścianek (ryc. 4.14).

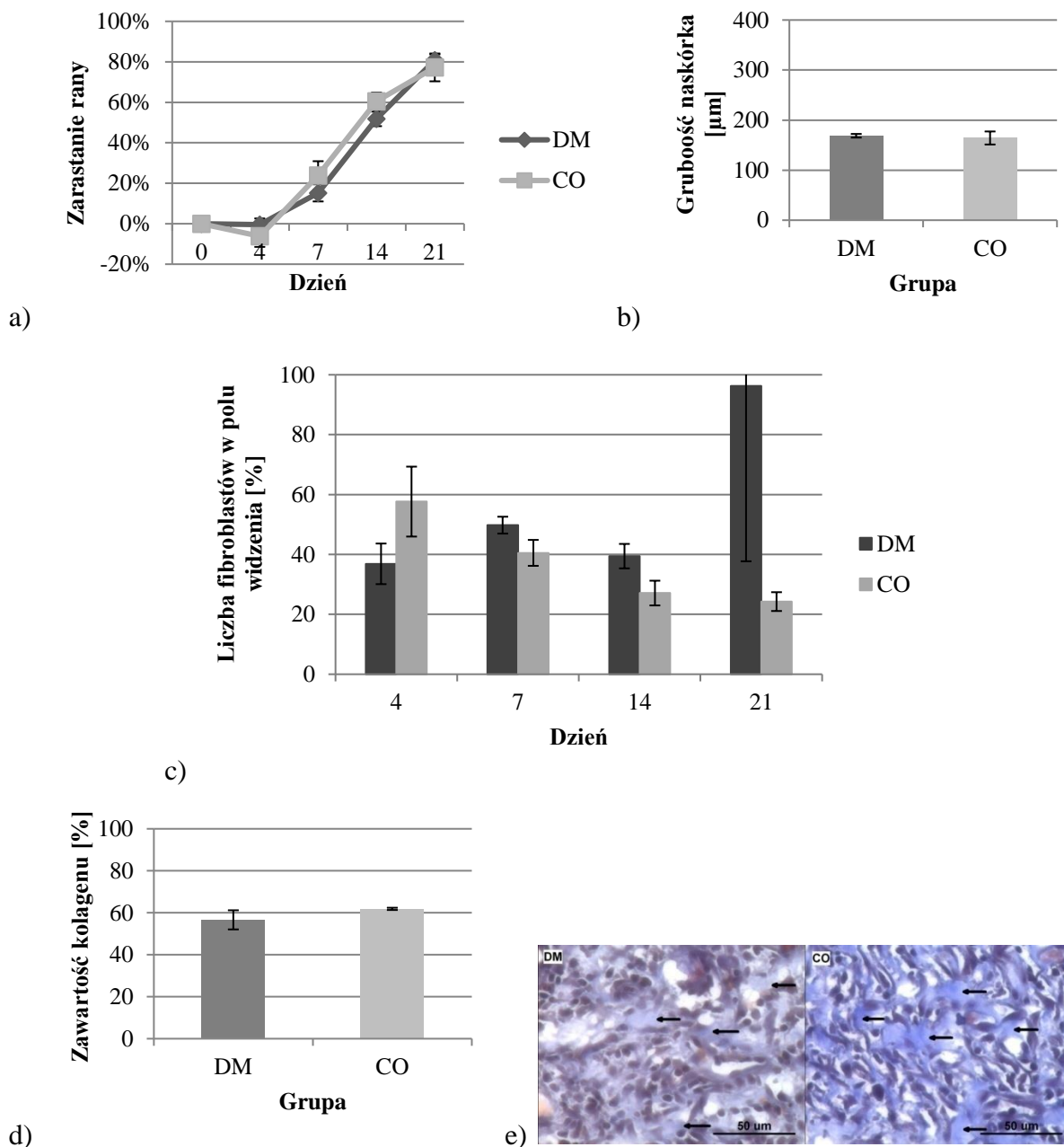


Ryc. 4.14 Liczba naczyń krwionośnych w skórze właściwej szczurów leczonych *iruxol®mono*. Zdjęcia mikroskopowe przedstawiają 14 dzień gojenia się rany. Strzałka wskazuje naczynia krwionośne.

4.3.3. Wpływ *iruxol®mono* na procesy zachodzące w ranie

Rany w CO zarastały się podobnie do DM w każdym punkcie czasowym (4, 7, 14 i 21 dzień gojenia się). W pierwszej grupie w dniu 4 pole powierzchni zwiększyło się o 6,17%, w 7 zarosło w 23,84%, w 14 w 60,55% i w 21 w 77,24% (odpowiednio w drugiej grupie zwiększyło się o 0,44%, a następnie rana zarosła w 15,24%, 51,81% i 80,83%) (ryc. 4.15 a). Działanie *iruxol®mono* zbadano także pod kątem grubości naskórka. Analiza mikroskopowa preparatów

barwionych H&E nie wykazała istotności statystycznej (164,27 μm dla CO i 168,74 μm dla DM) (ryc. 4.15 b). Jak pokazują wyniki na ryc. 4.15 c) zastosowanie *iruxol®mono* nie wpłynęło także na zmianę liczby fibroblastów. Ich liczba w 4, 7, 14 i 21 dniu gojenia się rany w grupie CO wynosił 57,65%, 40,53%, 27,11% i 24,26%, a w DM odpowiednio 36,87%, 49,79%, 39,44% i 96,28% ($\pm 58,56\%$). W obu grupach w 21 dniu zawartość kolagenu też była na podobnym poziomie (61,86% w CO i 56,63% w DM, ryc. 4.15 d), ale w obrazach mikroskopowych zaobserwowano, że *iruxol®mono* zwiększył grubość włókien kolagenowych w porównaniu do DM (ryc. 4.15 e).



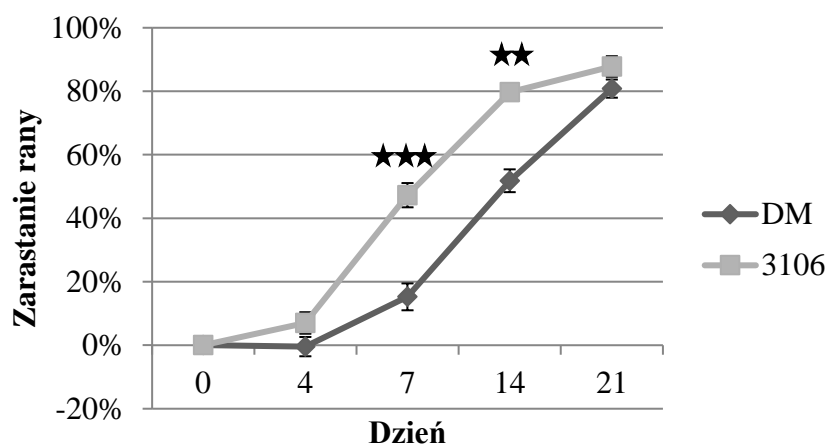
Ryc. 4.15 Wpływ *iruxol®mono* na a) zmianę powierzchni rany. Wyniki wyrażono w % w stosunku do powierzchni w dniu 0. $n_{DM}=11$, $n_{CO}=6$. b) grubość naskórka w 21 dniu po zranieniu. c) liczbę fibroblastów. d) zawartość kolagenu w ranie w 21 dniu po zranieniu. e) budowę włókien kolagenowych w skórze właściwej w 21 dniu gojenia się rany. Strzałka pokazuje włókna kolagenowe. Ryc. 4.15 b)–d) $n=3$.

4.4. Ocena wpływu związku AWL3106 na proces gojenia się trudno gojącej rany

W pracy zbadano związek AWL3106 w szczurzym modelu owrzodzenia w stopie cukrzycowej. Jego działanie porównano do DM.

4.4.1. Wpływ związku AWL3106 na zarastanie rany

Dzięki obrysom na folii i użyciu programu w języku Python zmierzono pola powierzchni ran (ryc. 4.16). W 3106 w 7 i 14 dniu gojenia zarastały one statystycznie znacznie szybciej $p \leq 0.001$ i $p \leq 0.01$ (47,26% i 79,68%) w porównaniu do DM (odpowiednio 15,24% i 51,81%). Z kolei w 4 i 21 dniu zmiana pola powierzchni była podobna w obu grupach (odpowiednio 7,01% i 87,80% dla 3106, -0,44% i 80,83% dla DM).

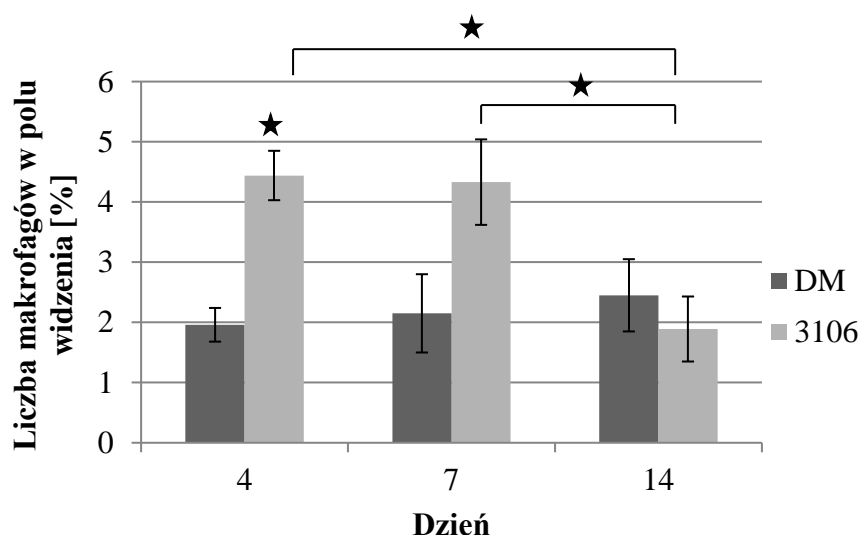


Ryc. 4.16 Wpływ preparatu keratynowego z zaadsorbowanym związkiem AWL3106 na zmianę powierzchni rany. Wyniki wyrażono w % w stosunku do powierzchni rany w dniu 0. $n_{DM}=11$, $n_{3106}=12$. Dla istotności statystycznej $**p \leq 0.01$, $***p \leq 0.001$ vs DM.

4.4.2. Wpływ związku AWL3106 na liczbę makrofagów

Preparaty oceniono pod względem stanu zapalnego. Odpowiedź zapalną określono na podstawie liczby makrofagów. W 4 dniu gojenia się rany grupa 3106 wykazała statystycznie istotnie wyższą liczbę komórek $p \leq 0.05$ w porównaniu do DM (odpowiednio 4,44% i 1,96%)

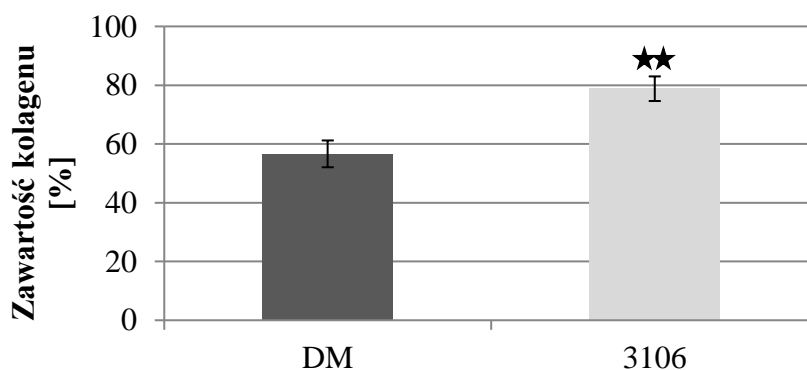
(ryc. 4.17). Natomiast liczba makrofagów w 7 i 14 dniu w obu przypadkach nie wykazała znamiennej różnicy (odpowiednio 4,33% i 1,89% dla 3106, 2,15% i 2,45% dla DM). Analiza statystyczna w obrębie samej grupy badanej pokazała istotnie większą $p < 0.05$ ($p = 0,033$ i $p = 0,049$) liczbę komórek w dniu 4 i 7 (odpowiednio 4,44% i 4,33%) w porównaniu do dnia 14 (1,89%).



Ryc. 4.17 Wpływ preparatu keratynowego z zaadsorbowanym związkiem AWL3106 na liczbę makrofagów. $n=3$. Dla istotności statystycznej $*p \leq 0.05$ vs DM, $*p < 0.05$ vs 14 dzień w 3106.

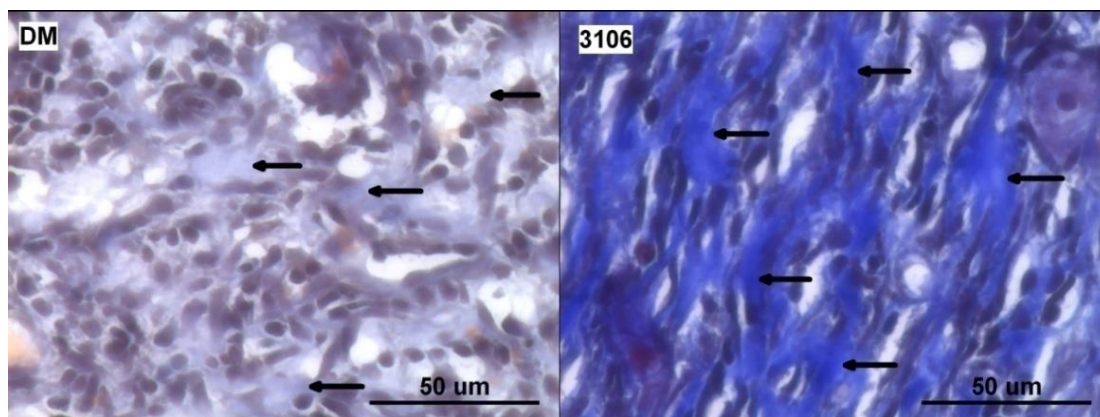
4.4.3. Wpływ związku AWL3106 na odkładanie kolagenu

W ocenie gojenia się rany jednym z analizowanych parametrów był kolagen. Badania z nim związane przeprowadzono w 21 dniu gojenia się rany. Wyniki z grupy 3106 pokazały istotnie większą zawartość białka $p \leq 0.01$ (78,80%) w porównaniu do DM (56,63%) (ryc. 4.18).



Ryc. 4.18 Wpływ preparatu keratynowego z zaadsorbowanym związkiem AWL3106 na zawartość kolagenu. Pomiar białka zrobiono w 21 dniu po zranieniu. $n=3$. Dla istotności statystycznej $**p \leq 0.01$ vs DM.

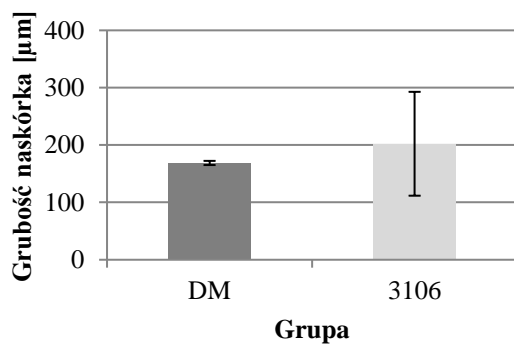
Skrawki tkanki z 3106 pokazały grubsze, równoległe i luźno ułożone włókna kolagenowe (ryc. 4.19). Natomiast w DM były one rozproszone, nierównomiernie rozmieszczone i niedojrzałe.



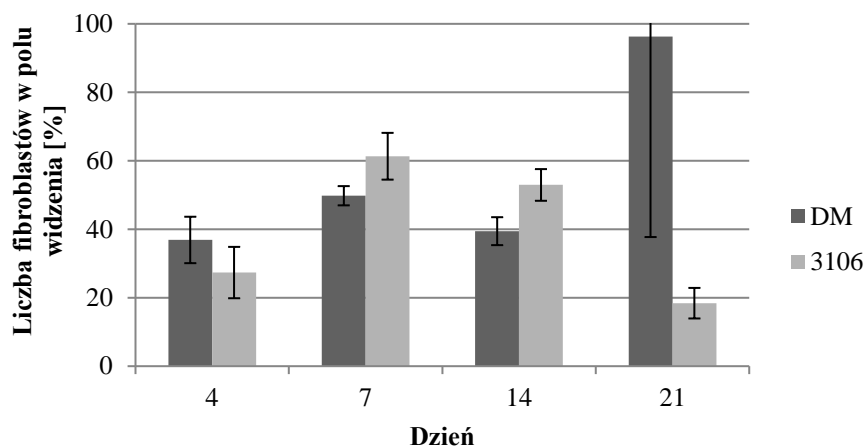
Ryc. 4.19 Włókna kolagenowe w ranie skóry właściwej szczurów leczonych preparatem keratynowym z zaadsorbowanym związkem AWL3106. Zdjęcia mikroskopowe zrobione w 21 dniu po zranieniu. Strzałka wskazuje włókna kolagenowe.

4.4.4. Wpływ związku AWL3106 na procesy zachodzące w ranie

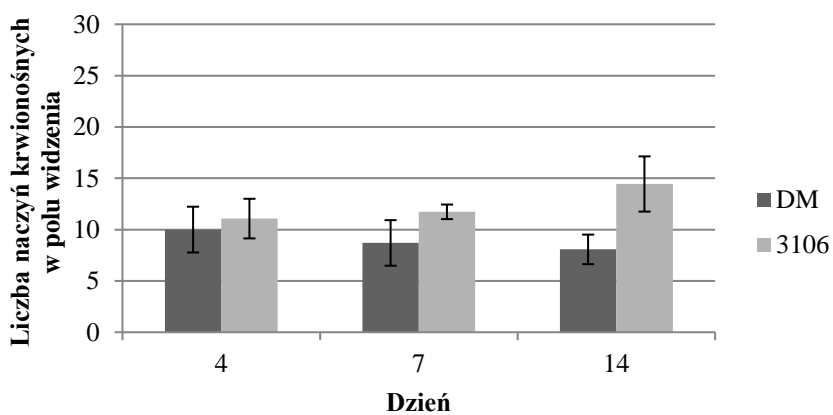
Analiza mikroskopowa preparatów wykazała podobną grubość naskórka w 3106 w porównaniu do DM (151,92 μm vs 168,74 μm) (ryc. 4.20 a). Jak pokazały wyniki grupa badana miała nieznamienne liczbę fibroblastów (27,35%, 61,32%, 52,94% i 18,40%) w porównaniu do kontrolnej (36,87%, 49,79%, 39,44% i 96,28% \pm 58,56%) odpowiednio w 4, 7, 14 i 21 dniu gojenia się rany (ryc. 4.20 b). Dodatkowo jednak zaobserwowano nieznaczny spadek tych komórek w 21 dniu w porównaniu do 14 w 3106 zestawiając z DM (odpowiednio 52,94% i 18,40% vs 39,44% i 96,28% \pm 58,56%). Znamiennego wyniku nie zaobserwowano w liczbie naczyń krwionośnych w 4 i 7 dniu w 3106 (11,07 i 11,73) w porównaniu do DM (odpowiednio 10,00 i 8,70) (ryc. 4.20 c). Natomiast nieznacznie wyższa ich ilość była w 14 dniu w grupie badanej (14,44) zestawiając z kontrolą (8,07). W obrazie histopatologicznym w przekroju poprzecznym obserwowano w 3106 bardziej owalne/okrągłe naczynia krwionośne z wyraźnym światłem i większą średnicą w porównaniu z DM. W tej drugiej grupie światło było rozmyte, a ścianki miały nieprawidłowe zarysowanie. (ryc. 4.20 d)



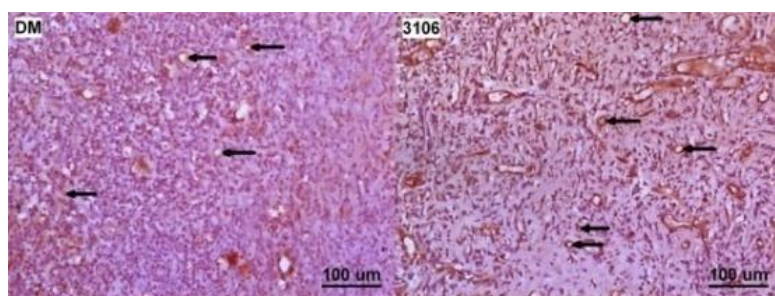
a)



b)



c)



d)

Ryc. 4.20 Wpływ preparatu keratynowego z zaadsorbowanym związkiem AWL3106 na a) grubość naskórka w 21 dniu po zranieniu. b) liczbę fibroblastów. c) liczbę naczyń

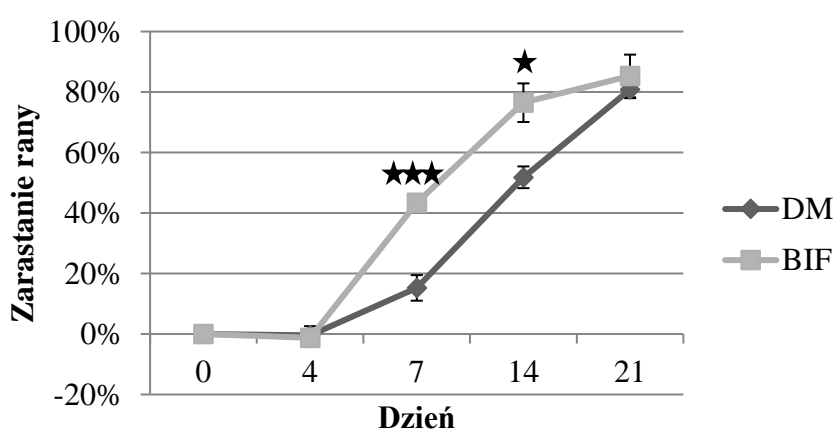
krwionośnych. d) budowę naczyń krwionośnych w skórze właściwej w 14 dniu po zranieniu. Strzałka wskazuje naczynia krwionośne. Ryc. 4.20 a)–c) n=3.

4.5. Ocena wpływu bifaliny na proces gojenia się trudno gojącej rany

Kolejnym badanym związkami w modelu owrzodzenia w stopie cukrzycowej była bifalina, której działanie porównano do DM.

4.5.1. Wpływ bifaliny na zarastanie rany

Jednym z parametrów branych pod uwagę przy ocenie gojących się ran było ich zarastające pole powierzchni. Pomiaru wielkości dokonywano w 4, 7, 14 i 21 dniu gojenia. W 4 dniu w BIF powierzchnia nieznacznie zwiększyła się o 1,26%, a w DM o 0,44%, co dało wynik nieistotny statystycznie (ryc. 4.21). W 7 i 14 dniu rany w grupie badanej goiły się znacznie szybciej $p \leq 0.001$ i $p \leq 0.05$ (43,35% i 76,48%) w porównaniu do DM (odpowiednio 15,24% i 51,81%). Natomiast w 21 dniu w obu grupach szybkość zarastania była podobna (odpowiednio 85,31% i 80,83%).

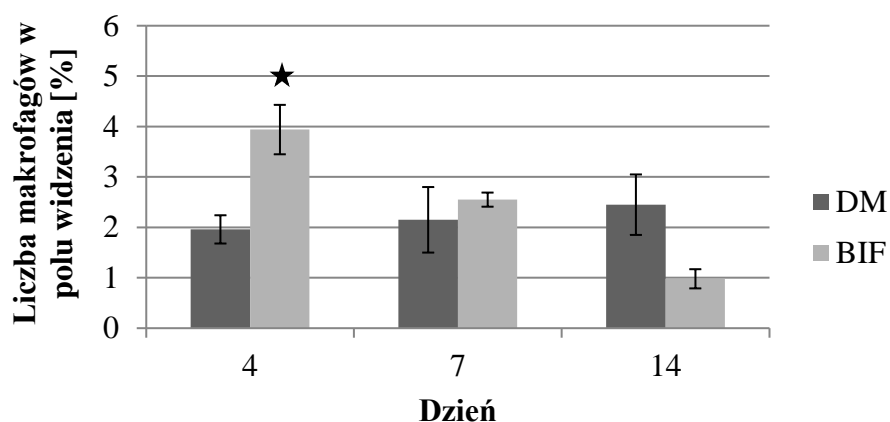


Ryc. 4.21 Wpływ preparatu keratynowego z zaadsorbowaną bifaliną na zmianę powierzchni rany. Wyniki wyrażono w % w stosunku do powierzchni w dniu 0. $n_{DM}=11$, $n_{BIF}=12$. Dla istotności statystycznej * $p \leq 0.05$, *** $p \leq 0.001$ vs DM.

4.5.2. Wpływ bifaliny na liczbę makrofagów

Działanie preparatu keratynowego z zaadsorbowaną bifaliną zostało ocenione pod względem liczby makrofagów (ryc. 4.22). Badanie to w BIF pokazało, że w 4 dniu gojąca się rana miała ich 3,94%, co w porównaniu do DM (1,96%) dało wynik istotny statystycznie

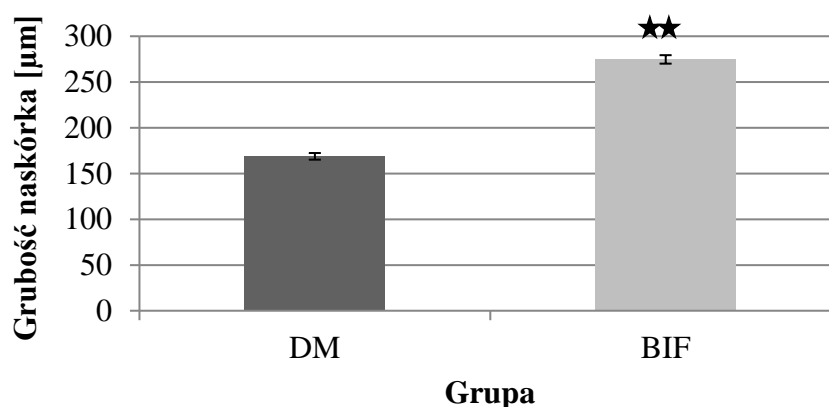
$p \leq 0.05$. W 7 i 14 dniu w obu grupach liczba makrofagów była podobna (odpowiednio 2,55% i 0,98% dla BIF, 2,15% i 2,45% dla DM).



Ryc. 4.22 Wpływ preparatu keratynowego z zaadsorbowaną bifaliną na liczbę makrofagów. n=3. Dla istotności statystycznej * $p \leq 0.05$ vs DM.

4.5.3. Wpływ bifaliny na grubość naskórka

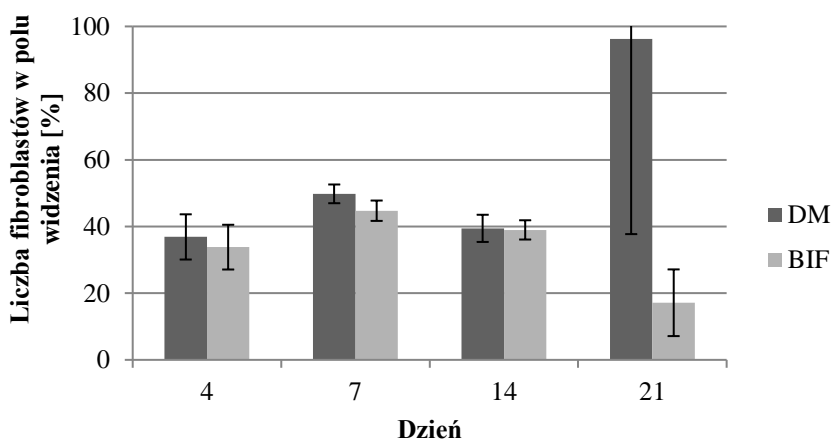
Podczas badań dokonano także pomiaru grubości naskórka. Analiza mikroskopowa preparatów barwionych H&E wykazała, że był on statystycznie znacznie grubszy $p \leq 0.01$ w BIF (274,70 μm , ryc. 4.23) w porównaniu do DM (168,74 μm). Naskórek zwiększył się o około 100 μm po zaaplikowaniu bifaliny.



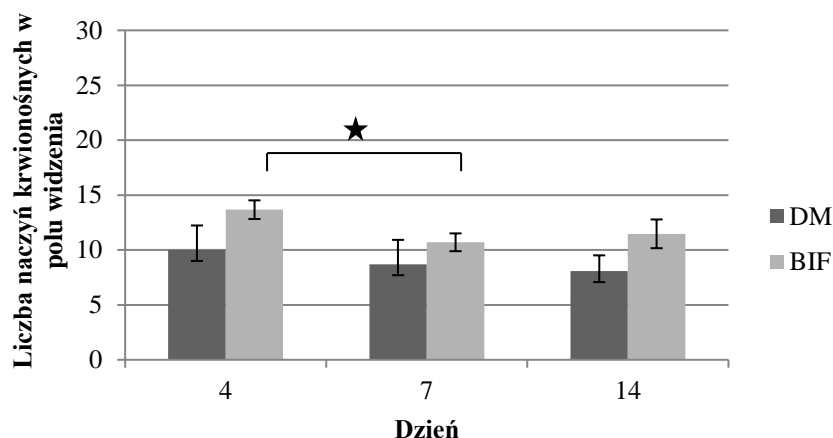
Ryc. 4.23 Wpływ preparatu keratynowego z zaadsorbowaną bifaliną na grubość naskórka. Wykres przedstawia 21 dzień gojenia się rany. n=3. Dla istotności statystycznej ** $p \leq 0.01$ vs DM.

4.5.4. Wpływ bifaliny na procesy zachodzące w ranie

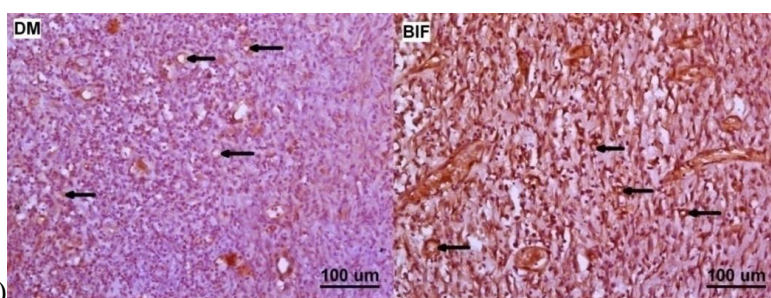
Fibroblasty liczone w 4, 7, 14 i 21 dniu gojenia się rany (ryc. 4.24 a). W BIF ich liczba była podobna (33,81%, 44,73%, 38,98% i 17,13%) do DM (odpowiednio 36,87%, 49,79%, 39,44% i $96,28\pm 58,56\%$). Zauważono jednak, że w 21 dniu w grupie badanej zmniejszyła się (bez istotności statystycznej) w porównaniu do wcześniejszych dni podobnie, jak miało to miejsce w przypadku ran w N-DM (27,07%, 37,42%, 45,03% i 3,66%). W kolejnym badaniu liczone naczynia krwionośne w 4, 7 i 14 dniu po zranieniu (ryc. 4.24 b). Dla obu grup (BIF i DM) średnie były podobne. W BIF liczba ta wynosiła 13,67; 10,70; 11,47 natomiast w DM odpowiednio 10,00; 8,70 i 8,07. Z kolei analiza statystyczna w obrębie grupy badanej pokazała, że było ich istotnie więcej $p < 0,01$ ($p = 0,009$) w 4 dniu (13,67) w porównaniu do 7 dnia (10,70). W obrazie mikroskopowym skrawków skóry pobranych z grupy badanej obserwowano lepiej zarysowane ściany naczyń krwionośnych z większą średnicą w porównaniu do negatywnej kontroli (ryc. 4.24 c). Ocenianym parametrem był także kolagen. Wyniki pokazały, że rany z BIF zawierały go 64,82%, co dało podobny wynik do DM 56,63% (ryc. 4.24 d). W obrazie mikroskopowym preparatów z grupy badanej wydawało się więcej włókien kolagenowych, były one grubsze, bardziej zwarte i regularniej ułożone w porównaniu do kontroli (ryc. 4.24 e).



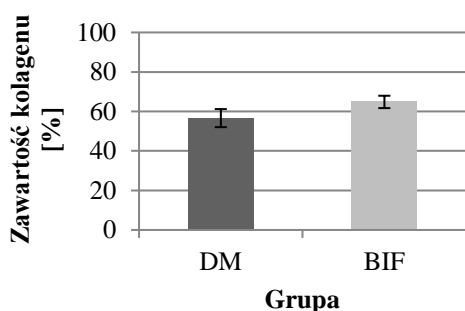
a)



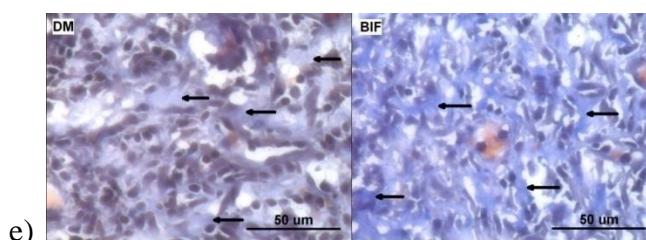
b)



c)



d)



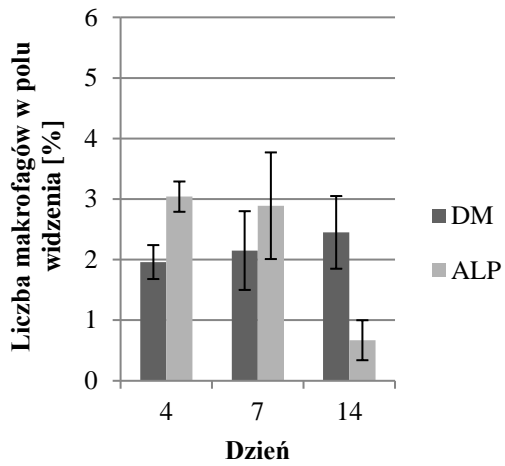
e)

Ryc. 4.24 Wpływ preparatu keratynowego z zaadsorbowaną bifaliną na a) liczbę fibroblastów. b) liczbę naczyń krwionośnych. Dla istotności statystycznej $**p < 0.01$ vs 7 dzień w BIF. c) budowę naczyń krwionośnych w skórze właściwej w 14 dniu po zranieniu. Naczynia są wskazane strzałką. d) zawartość kolagenu. Jego zawartość policzono w 21 dniu gojenia się rany. e) budowę i rozmieszczenie włókien kolagenowych w skórze właściwej w 21 dniu gojenia się rany. Strzałka pokazuje włókna kolagenowe. Ryc. 4.24 a), b) i d) $n=3$.

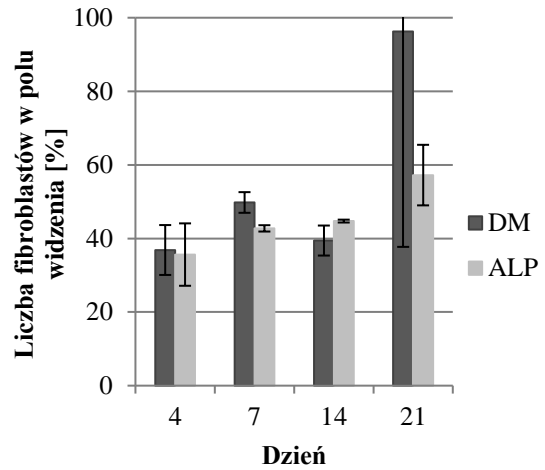
4.6. Ocena wpływu preparatu keratynowego na proces gojenia się trudno gojącej rany

Przeprowadzono badania z użyciem nieinkrystowanego preparatu keratynowego w szczurzym modelu owrzodzenia w stopie cukrzycowej. Jego działanie porównano do negatywnej kontroli. Preparaty keratynowe posłużyły w tej pracy jako rusztowania dla związków hybrydowych.

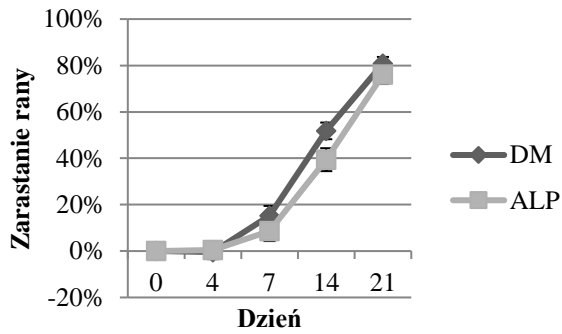
W 4, 7 i 14 dniu gojenia się rany liczba makrofagów w ALP (3,04%, 2,89% i 0,67%) była podobna do DM (odpowiednio 1,96%, 2,15% i 2,45%, ryc. 4.25 a). W obu grupach analizowano również liczbę fibroblastów w 4, 7, 14 i 21 dniu. Zastosowanie badanego opatrunku nie wpłynęło na liczbę tych komórek (36,87%, 49,79%, 39,44%, 96,28%±58,56%), która pozostała podobna do kontroli (odpowiednio 35,63%, 42,75%, 44,73%, 57,23%, ryc. 4.25 b). Wyniki pokazały, że rany z ALP goiły się podobnie do DM w każdym z mierzonych punktów czasowych (4, 7, 14 i 21 dzień, ryc. 4.25 c). Zarastanie ran w badanej grupie wynosiło 0,40%, 8,66%, 39,40%, 76,05% w porównaniu do kontroli, gdzie na początku nastąpiło zwiększenie ich powierzchni o 0,44%, a następnie rany zarosły w 15,24%, 51,81% i 80,83%. W 21 dniu gojenia się rany w obu grupach naskórek miał podobną grubość (166,72 μm dla ALP i 168,74 μm dla DM, ryc. 4.25 d). Policzono także naczynia krwionośne. Po zastosowaniu preparatu keratynowego ich liczba była podobna w 4, 7 i 14 dniu (9,37, 8,77 i 4,87) do DM (odpowiednio 10,00; 8,70 i 8,07, ryc. 4.25 e). W badanej grupie miały one bardziej zarysowane ściany i wyraźniejsze światło w porównaniu do grupy kontrolnej (ryc. 4.25 f). W ALP obserwowano statystycznie istotnie mniej włókien kolagenowych $p \leq 0.01$ w porównaniu do DM (odpowiednio 30,35% vs 56,63%, ryc. 4.25 g) w 21 dniu. Na zdjęciach mikroskopowych w obu grupach było widać niedojrzały kolagen rozproszony po tkance (ryc. 4.25 h).



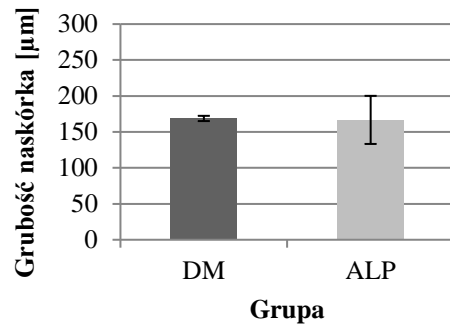
a)



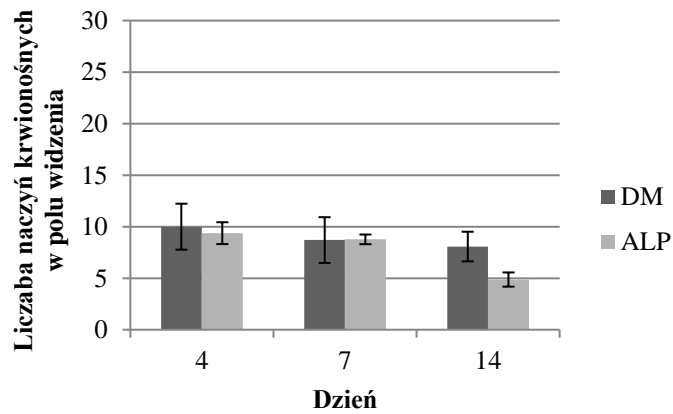
b)



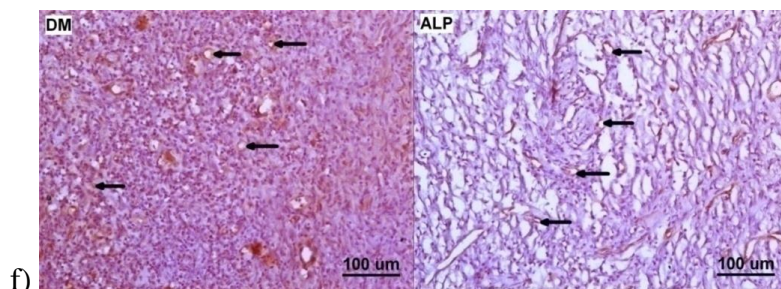
c)

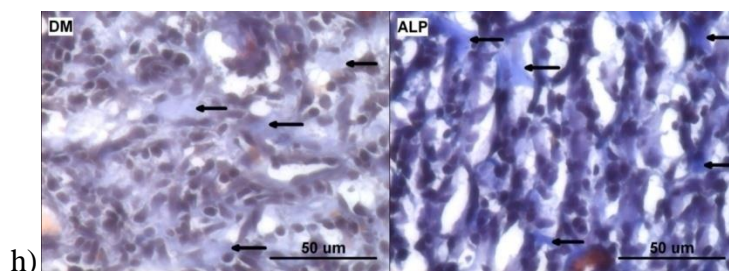
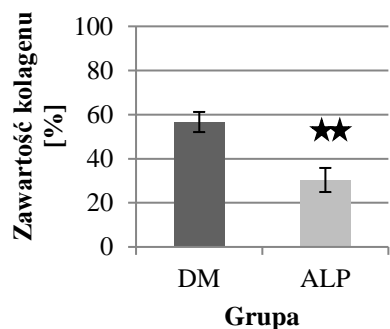


d)



e)





g)

h)

Ryc. 4.25 Wpływ preparatu keratynowego na a) liczbę makrofagów. b) liczbę fibroblastów. c) zmianę powierzchni rany. Wyniki wyrażono w % w odniesieniu do 0 dnia. $n_{DM}=11$, $n_{ALP}=23$. d) grubość naskórka w 21 dniu po wyindukowaniu rany. e) liczbę naczyń krwionośnych. f) budowę naczyń krwionośnych w ranie skóry właściwej 14 dni po zranieniu. Strzałka pokazuje naczynia krwionośne. g) zawartość kolagenu w 21 dniu gojenia. h) włókna kolagenowe w ranie skóry właściwej 21 dni po zranieniu. Strzałka pokazuje włókna kolagenowe. Ryc. 4.25 a), b), d), e) i g) $n=3$. Dla istotności statystycznej $**p \leq 0.01$ vs DM.

5. Dyskusja

Rany cukrzycowe należą do najgroźniejszych powikłań cukrzycy, a opracowanie skutecznych metod ich leczenia stanowi jedno z wyzwań współczesnej medycyny. Moja praca doktorska, której celem było zbadanie dwóch peptydów będących pochodnymi opioidowymi i SP lub tylko pochodnymi opioidowymi (AWL3106 i bifalina) pod kątem ich wpływu na proces gojenia trudno gojącej rany, włącza się w pewnym zakresie w tę tematykę.

Badane peptydy były adsorbowane na preparacie keratynowym otrzymanym z wełny alpaki i takie „inkrustowane” preparaty były aplikowane na rany oparzeniowe w szczurzym modelu trudno gojącej się rany, opracowanym na potrzebę moich doświadczeń.

Moja praca jest kontynuacją wcześniejszych badań prowadzonych w Zakładzie Neuropeptydów IMDiK PAN dotyczących opracowania opatrunków do leczenia rany cukrzycowej, które podjął przed laty Profesor Andrzej Lipkowski. Zapoczątkowane przez niego badania dotyczyły sposobu przygotowania preparatów keratynowych z różnego rodzaju naturalnego materiału (włosów ludzkich, sierści mysiej itp.), a następnie wykorzystania tak przygotowanych materiałów do regeneracji trudno gojących się ran.

Pierwsze badania z wykorzystaniem materiału keratynowego prowadzono w Zakładzie Neuropeptydów na mysim modelu cukrzycy z wyindukowaną raną chirurgiczną (Konop – rozprawa doktorska 2016).

Ponieważ rana chirurgiczna goi się bardzo szybko, dlatego w obecnej pracy doktorskiej opracowano model z wytworzoną raną oparzeniową. We wstępie literaturowym przedstawiłam zalety takiego modelu badawczego, jako lepiej odpowiadającego ranom cukrzycowym u ludzi.

W swoich badaniach zastosowałam model streptozotocynowy opisany w rozdziale Materiały i metody. W skrócie model zastosowany w pracy opiera się na farmakologicznie wywołanej u szczurów cukrzycy związkiem STZ i wytworzeniu trudno gojącej rany przez oparzenie grzbietowej skóry szczura (ryc. 3.1 str. 55).

Przegląd literaturowy wskazał, że najczęściej stosowane do modelowania ran powstałych przez oparzenie skóry zwierzęcia z cukrzycą wyindukowaną STZ są szczury. Wyjątkiem jest praca Hamed i wsp. 2017, w której pracowano na świniami. Badania były prowadzone na różnych stadach szczurów: Wistar (Wang i wsp. 2008, Bairy i wsp. 2014, Fantinati i wsp. 2016, Ranjbar i Takhtfooladi 2016, Azevedo i wsp. 2016), które wykorzystałam w swoich badaniach lub SD (Tian i wsp. 2016). Do modeli rany stosowane są zarówno samce (tak jak w mojej pracy) i samice (Fantinati i wsp. 2016, Hamed i wsp. 2017) lub jedne i drugie jednocześnie (Bairy i wsp. 2014). W badaniach stosuje się różne dawki STZ za pomocą, których wywoływana jest cukrzyca: wielkość dawki waha się od 30 mg/kg (Bairy i wsp. 2014) do 200

mg/kg (Ranjbar i Takhtfooladi 2016). STZ podawana jest głównie dootrzewnowo lub dożylnie jak u Azevedo i wsp. 2016. W mojej pracy dawka STZ wynosiła 80 mg/kg i podano ją dootrzewnowo.

Opisane w literaturze modele różnią się także odstępem czasu pomiędzy podaniem STZ a wyindukowaniem rany. Najkrótszy czas to 7 dni (Bairy i wsp. 2014, Azevedo i wsp. 2016). W swojej pracy zastosowałam okres, który wynosił 70 dni, ponieważ dzięki długotrwałemu działaniu hiperglikemii w organizmie zachodzą zmiany, które utrudniają gojenie, a więc wytworzona rana przypomina w dużym stopniu ranę cukrzycową. Uważam, że czas pomiędzy podaniem STZ a wyindukowaniem jest niezwykle istotnym parametrem przy konstrukcji modelu doświadczalnego rany trudno gojącej. Widoczne zmiany wywołane długotrwałym działaniem hiperglikemii w organizmie w mojej pracy były obserwowane w 8 tygodniu jako zmętnienie soczewki oka (ryc. 4.3 str. 66).

Modele różniły się też metodami używanymi do indukcji oparzenia skóry. Do tego celu stosowano: gorący wosk (Bairy i wsp. 2014), zanurzenie skóry w gorącej wodzie (Tian i wsp. 2016, Fantinati i wsp. 2016) czy przyłożenie rozgrzanego przedmiotu tak jak w większości prac również w mojej pracy. Opisane powyżej modele ran służyły następnie do badania wpływu: hormonów insuliny (Bairy i wsp. 2014, Azevedo i wsp. 2016) i erytropoetyny (Hamed i wsp. 2017), gąbki kolagenowej usieciowanej chitozaniem z FGF (ang. *fibroblast growth factor*, czynnik wzrostu fibroblastów) (Wang i wsp. 2008), lasera (Ranjbar i Takhtfooladi 2016) i ultradźwięków (Fantinati i wsp. 2016) na gojenie trudnych ran czy badania funkcji neutrofilii i mechanizmów leżących u podstaw dysfunkcji tych komórek w takim modelu gojenia się ran (Tian i wsp. 2016). Zastosowany przeze mnie model ma najwięcej cech wspólnych z modelem opisanym przez Wang i wsp. 2008. Podstawową różnicą jest wybór innego stada szczurów. W tej pracy użyto szczurów Wistar, a w cytowanej pracy badania prowadzono na stadzie SD. U Wang i wsp. 2008 szczurom wywoływano dwie rany na grzbiecie, a w mojej pracy jedną ranę. Indukcja jednej rany miała na celu wykluczyć wpływ badanego opatrunku na gojenie rany kontrolnej czy innych badanych ran znajdujących się na tym samym zwierzęciu.

Długotrwała cukrzyca (10 tygodni) wyindukowana w moich badaniach doprowadziła do zaawansowanych zmian w skórze, mechanizmie naprawy i możliwie najbardziej utrudniła gojenie ran. Najbardziej zasadne było wykorzystanie w tym celu szczurów stada Wistar, u których rany na skórze są dobrze widoczne, co pozwoliło dokonać dokładnych pomiarów ich zarastania. W dodatku szczury te należą do łagodnego stada, co pomaga w doświadczeniach z ich użyciem. Badania z użyciem szczurów Wistar są prowadzone w Zakładzie Neuropeptydów od wielu lat, co pozwoliło poznać je pod względem biologicznym, fizycznym i behawioralnym.

Jest to stado szczurów wykorzystywane do doświadczeń nie tylko w Zakładzie Neuropeptydów, ale również w innych ośrodkach w Polsce. Istotny był także wybór płci. Wybór samców wynikał z większych szans na wyindukowanie cukrzycy STZ i wolniejszego gojenia ran w porównaniu do samic, co jest dodatkowym atutem tych zwierząt.

Opracowany model naśladujący owrzodzenie u osób z cukrzycą posłużył do zbadania peptydów hybrydowych. Taki model powinien być powtarzalny i tani, dlatego dobrze nadawały się do uzyskania eksperymentalnej cukrzycy szczury Wistar i związek STZ. Na tym modelu można pracować w laboratoriach badawczych nieposiadających specjalistycznego sprzętu. Podanie szczurom STZ wywołało u nich objawy typowe dla cukrzycy: zwiększony poziom glukozy we krwi, niewielki przyrost masy ciała, polidypsję, poliurię i ślepotę. Model do mojej pracy został tak opracowany, żeby stosować go do testowania różnych opatrunków. Wprowadzono ograniczoną liczbę zmiennych/parametrów podlegających kontroli eksperymentatora, za pomocą których oceniano skuteczność opatrunku. Do oceny postępu gojenia rany stosuje się różne parametry, ponieważ jest to proces złożony. Gupta i Kumar 2015 wskazują na jakie z nich, należy zwrócić uwagę. W mojej pracy skupiono się tylko na parametrach najbardziej istotnych dla procesu gojenia się rany. Wśród nich na pierwszy plan wysuwają się zapalenie, angiogeneza, proliferacja fibroblastów, włóknienie, ponowne naskórkowanie i zarastanie ubytku skóry. Najważniejszą i najbardziej obiektywną zmienną jest powierzchnia rany, którą należało zmierzyć. Indukcja rany modelującej owrzodzenie u człowieka powinna brać pod uwagę jego przewlekły charakter, a co za tym idzie martwicę tkanki skóry i podskórnej wywołaną jej całkowitym niedokrwieniem i odnerwieniem. Stąd rana oparzeniowa (niedokrwienie, odnerwienie, martwica) najlepiej oddaje ranę/owrzodzenie u pacjenta chorego na cukrzycę. Wycięcie martwej skóry po 3 dniach ograniczyło wielkość rany do zaplanowanej powierzchni. Zapobiegło rozprzestrzenianiu się nekrozy i innych skutków termicznego urazu poziomo na sąsiednie tkanki. Opracowany model można dodatkowo uzupełniać o nowe parametry (angiogenne, zapalne, neurogenne) i poddawać go modyfikacjom utrudniającym jeszcze bardziej gojenie ran, chociażby za pomocą już wspomnianych związków chemicznych np. hydrokortyzonu.

W mojej pracy zbadano wybrane procesy gojenia modelu rany u szczura zdrowego i porównano je do ich przebiegu u szczura cukrzycowego. W ranie szczurów cukrzycowych zaobserwowano słabą odpowiedź zapalną i angiogenezę. Ściany naczyń krwionośnych były słabo zarysowane. Zaobserwowano mniejszą zawartość zsyntetyzowanego kolagenu w miejscu rany, a włókna były niedojrzałe i nierównomiernie rozproszone w tkance. Z kolei rana szczurów zdrowych miała szybką odpowiedź zapalną, po której zaobserwowano wzmożony proces

angiogenezy, a wzrastający odsetek fibroblastów znacząco zmalał 21 dnia, w którym obserwowano dużą zawartość odłożonego kolagenu i gruby naskórek. W mojej pracy wyniki pokazały, że farmakologiczne wywołanie cukrzycy spowodowało spowolnienie zarastania rany i dało cieńszy naskórek. Zbadanie wybranych parametrów pozwoliło stwierdzić, że model odzwierciedla owrzodzenie u ludzi z cukrzycą, a parametry są odpowiednie do oceny opatrunków na trudno gojące rany i wskazują, jakie zmiany patologiczne zachodzą w gojącej się ranie u samców szczurów stada Wistar z wywołaną cukrzycą. Analizy porównawcze nieleczonych ran szczurów zdrowych i cukrzycowych określiły prawidłowy zakres każdego z parametrów. Ich poznanie i ustalenie dla zaproponowanego modelu pozwoliło przystąpić do oceny wpływu badanych opatrunków. Wykorzystanie szczura z cukrzycą wyindukowaną streptozotocyną i z wikłającą raną oparzeniową spełniło oczekiwania stawiane mu podczas ustawiania go do moich badań.

Opracowany model posłużył do zbadania wpływu peptydów: pochodnej opioidowo-neurokininowej AWL3106 i dimerycznego opioidu bifaliny na proces gojenia ran. Peptydy były adsorbowane na preparatach keratynowych uzyskanych z wełny alpaki i aplikowane w postaci maści na bazie dostępnego komercyjnie, obojętnego podłoża z lanoliny. Użycie maści zapewniło codzienne stosowanie opatrunku przez cały proces gojenia ran. Same preparaty keratynowe zostały także zbadane pod względem ewentualnego wpływu na proces gojenia ran. Preparaty keratynowe stosowano w postaci zasyпки przez pierwsze dni gojenia się rany. Forma opatrunku – zasyпка aplikowana przez pierwsze dni gojenia rany zapewniła przyczepność preparatom keratynowym do łożyska rany i utrzymanie opatrunku na ranie, ale uniemożliwiła aplikację kolejnych dawek preparatów keratynowych.

Podsumowując dane literaturowe opisane w rozdziale Wstęp i ww. w Dyskusji można stwierdzić, że zastosowany w pracy model rany oddaje upośledzony charakter owrzodzenia. Model cukrzycy STZ z wyindukowanym oparzeniem zastosowany w mojej pracy różni się od każdego modelu z osobna opisanego powyżej w Dyskusji np. rodzajem zastosowanego stada, liczbą ran na jednym osobniku, sposobem indukcji oparzenia czy wielkością dawki, przez co można stwierdzić, że jest oryginalnym modelem. W chwili podjęcia przeze mnie badań w literaturze była opisana tylko jedna praca z wykorzystaniem rany oparzeniowej.

W opracowanym modelu badano wpływ peptydów na procesy zachodzące w gojącej się ranie. Poniżej omówiono zasadność zastosowania wybranych metod do oceny tych procesów. Badania zostały przeprowadzone zgodnie z wcześniej przygotowanym protokołem, który obejmował: opracowanie modelu trudno gojącej rany, schemat opatrywania ran i obróbkę materiału z zastosowaniem wybranych metod (ryc. 3.1 str. 55). Wyniki otrzymano przy użyciu

m.in. takiej metody jak barwienie H&E, które jest szybkim barwieniem przeglądowym, najczęściej używanym w histopatologii. Stosuje się ją m.in. do oceny naskórkowania (Kotian i wsp. 2015). Podczas oceny ponownego naskórkowania bierze się pod uwagę pomiar grubości naskórka (van Neck i wsp. 2017), co wykorzystano w mojej pracy. Innym stosowanym wskaźnikiem jest pomiar długości naskórka (Noguchi i wsp. 2014).

Przy pomocy innego barwienia trichromem wg. Massona oceniane jest tworzenie, odkładanie i rozmieszczenie kolagenu (Kotian i wsp. 2015, Demirci i wsp. 2015, Solmaz i wsp. 2016, Thangavel i wsp. 2017). Postęp zdrowienia skóry ocenia się na podstawie przekształcenia ziarniny z dużą liczbą naczyń krwionośnych w tkankę bogatą w kolagen. I z tego względu w mojej pracy przeprowadzono badanie kolagenu. Zawartość kolagenu jest liczona na podstawie intensywności zabarwienia (de Souza 2017). W ocenie włókien tego białka bierze się pod uwagę ich ułożenie, grubość, gęstość i dojrzałość. Kolagen jest też oznaczany z podziałem na typ III i I (Azevedo i wsp. 2016). Typ III to kolagen, który pojawia się wcześniej i z czasem jest zastępowany przez typ I. O taką bardziej szczegółową analizę można rozszerzyć w przyszłości wyniki badań dla peptydu AWL3106, który zwiększył ilość odłożonego kolagenu w miejscu rany.

Efekt gojenia się w dużej mierze zależy od przebiegu procesu zapalnego. Jest on przewlekłe utrzymywany w ranie cukrzycowej. Ważną rolę pełnią w nim makrofagi. Zarówno SP i opioidy zgodnie z danymi literaturowymi wpływają na stan zapalny, co wpłynęło na oznaczenie tych komórek w moich badaniach. Wiadome jest, że poprawa stanu zapalnego pozwala przyspieszyć gojenie rany i przejść jej do kolejnej fazy. Stan zapalny w miejscu rany można oznaczyć przy użyciu przeciwciała skierowanego przeciwko antygenowi CD68 (Miao i wsp. 2012, van Neck i wsp. 2017, Thangavel i wsp. 2017). Zastosowanie tego markera pokazuje przebieg odpowiedzi zapalnej. Istnieje także inna metoda oznaczania makrofagów. Wśród makrofagów rozróżnia się fenotyp M1 i M2. Badając stan zapalny można wziąć pod uwagę obie te grupy. Pierwsze z nich działają prozapalnie, drugie przeciwzapalnie. Makrofagi zbadane w mojej pracy prawdopodobnie należały do fenotypu M1 ze względu na to, że SP wpływa na przesunięcie fenotypu M1 do M2 (Jiang i wsp. 2012, Leal i wsp. 2015) Peptyd AWL3106 jest pochodną tego neuropeptydu nieopioidowego. Ponadto zapalenie można monitorować także poziomem cytokin prozapalnych takich jak TNF- α , IL-6, iNOS (Jiang i wsp. 2012, Kant i wsp. 2015) czy przeciwzapalnych np. IL-10 (Kim i wsp. 2019).

Kolejnym badanym parametrem była intensywność angiogenezy, której zadaniem jest dostarczanie składników odżywczych i odprowadzanie ubocznych produktów przemiany materii. Jest ona osłabiona w ranach cukrzycowych, dlatego często bada się wpływ opatrunku

na ten proces. Do wizualizacji naczyń krwionośnych stosowany jest marker komórek śródbłonna CD34 (Busuioc i wsp. 2013, Liu i wsp. 2015, van Neck i wsp. 2017). Pozwala on ocenić wpływ badanych związków na angiogenezę. CD31 jest także używany przy badaniu tego procesu (Demirci i wsp. 2015). Na tle metod służących do oznaczania naczyń krwionośnych wybór CD34 wydaje się bardziej odpowiedni. Istnieją różne metody oceny angiogenezy: przez opis histopatologiczny tkanek wybarwionych H&E, oznaczenie struktur przeciwciałami (CD31/PECAM-1 ang. *platelet endothelial cell adhesion molecule 1*, cząsteczka adhezji komórkowej płytek i śródbłonna 1, CD34, α -SMA, itd.) lub zbadanie poziomu VEGF. Zastosowanie przeciwciał jest bezpośrednią oceną angiogenezy, a oznaczenie cytokin angiogennych jest metodą pośrednią. Dobrze jest zastosować wszystkie, gdyż wymienione markery nie wykazują specyficzności komórkowej i tylko wtedy uzyska się pełen obraz angiogenezy, ale mało jest prac z użyciem kilku metod oznaczania naczyń krwionośnych. CD34, CD31 oraz czynnik von Willebrandta to antygeny specyficzne dla śródbłonna naczyń. Można dzięki nim oznaczyć lokalizację, długość i powierzchnię naczynia. CD34 pojawia się na początku formowania naczynia, bierze udział w koordynowaniu migracji komórek w czasie dojrzewania naczyń i można ją wykryć podczas różnicowania naczynia. Ze względu na wysokie stężenie markeru CD34 bez trudności można określić jego położenie, przez co jest lepszym markerem od czynnika von Willebrandta. (Kurzyk 2015) Przeprowadzenie moich badań miało charakter przesiewowy w celu ustalenia, na jakie procesy gojącej się rany wpływają badane peptydy. Ograniczyło to liczbę zastosowanych metod i dlatego do analizy intensywności angiogenezy wybrano tylko marker CD34, który wydawał się najbardziej odpowiedni na tle innych sposobów pomiaru angiogenezy.

Kolejnym parametrem badanym w gojeniu ran obok naczyń krwionośnych i makrofagów były fibroblasty. Odpowiadają one za produkcję kolagenu. Z fibroblastów powstają też miofibroblasty, które mają zdolność kurczenia się. W owrzodzeniach u ludzi proliferacja i migracja fibroblastów są upośledzone. Nieprawidłowości widać też w ich funkcjonowaniu. W przeprowadzonych badaniach do oznaczenia fibroblastów użyto wimentyny, która była stosowana m.in. przez Huang i wsp. 2015, Jung i wsp. 2016.

Podczas gojenia owrzodzenia stopy cukrzycowej pierwszym parametrem, na który zwraca się uwagę jest zarastanie rany. (Jhamb i wsp. 2016) Pomiar jej pola powierzchni to głównie stosowany parametr i jeden z podstawowych w ocenie działania preparatu. Na ryc. 3.2 str. 61 przedstawiono schemat pomiaru powierzchni rany stosowany w mojej pracy. Do pomiaru pola powierzchni rany używa się fotografii, linijki, przezroczystych folii i programów komputerowych (Papazoglou i wsp. 2010, Chang i wsp. 2011). W mojej pracy ranę obrysowano

na przezroczystej folii, a pomiaru pola powierzchni dokonano za pomocą programu komputerowego. Opatrunek powinien przyspieszać zarastanie rany, bo właśnie niezarastające owrzodzenia są jednym z największych powikłań cukrzycy.

Zbadanie wybranych procesów w gojącej się ranie pozwoliło ocenić skuteczność zastosowanych peptydów. Poniżej przedstawiono dyskusję na temat wpływu peptydu AWL3106 i bifaliny na procesy zachodzące w trudno gojącej się ranie. Pierwszy ze związków AWL3106 składa się z fragmentu SP i dermorfiny, a bifalina to peptyd opioidowy składający się z dwóch fragmentów enkefaliny. Ich zastosowanie w leczeniu ran jest poparte wieloma doniesieniami literaturowymi na temat pozytywnego wpływu SP i peptydów opioidowych na ten proces (rozdział Wstęp). Zastosowanie tych dwóch peptydów było podyktowane obecnością receptorów tych związków w skórze. Działanie receptora NK-1 wiąże się z fibroblastami, leukocytami, komórkami śródbłonna naczyń krwionośnych i keratynocytami (Antezana i wsp. 2002, Graefe i Mohiuddin 2020), a receptory opioidowe ulegają ekspresji w keratynocytach, fibroblastach i monocytach/makrofagach (Nissen i wsp. 1997, Cheng i wsp. 2008, Bigliardi i wsp. 2009). Zarówno peptydy opioidowe, jak i SP biorą udział w patogenezie cukrzycy. Otrzymane wyniki pokazały, że oba zastosowane peptydy AWL3106 i bifalina wykazują działanie wspomagające gojenie poprzez przyspieszenie zarastania rany, wzmocnienie odpowiedzi zapalnej, skrócenie czasu jej trwania, zwiększenie odkładania kolagenu i grubości naskórka.

Zarówno SP i peptydy opioidowe wzmagają zarastanie rany, na co wskazują też najnowsze prace (Leal i wsp. 2015, Kant i wsp. 2015, Kim i wsp. 2018, 2019, Yang i wsp. 2020). Są także doniesienia literaturowe, że zarastanie rany przyspiesza peptyd opioidowy – bifalina (Konop – rozprawa doktorska 2016, Yildiz i wsp. 2018) stosowany w mojej pracy. Jest to zgodne z wynikami otrzymanymi w mojej pracy, kiedy to po zastosowaniu peptydów AWL3106 i bifaliny zarastanie rany cukrzycowej przypominało zarastanie rany zdrowej.

Egzogenne zastosowanie SP poprawia odpowiedź zapalną (Leal i wsp. 2015). Zmniejsza stan zapalny, na co wskazuje obniżenie poziomu TNF- α produkowanej w przeważającej mierze przez makrofagi M1, które są prozapalne (Jiang i wsp. 2012, Kant i wsp. 2015, Kim i wsp. 2019). Działanie przeciwzapalne SP potwierdzają też dane literaturowe, które wskazują na: zmniejszenie masy śledziony, IL-6, iNOS, zwiększenie IL-10 i poziomu M2 (Jiang i wsp. 2012, Kim i wsp. 2019) po jej zastosowaniu. Peptydy opioidowe jak w przypadku amidu [D-Arg2, Lys4] (1-4) dermorfiny także zmniejszają stan zapalny (Goldsmith i wsp. 2011). Peptyd AWL3106 będący pochodną SP i dermorfiny podobnie do ww. zwiększył odpowiedź zapalną i skrócił czas jej trwania. Prawdopodobnie zmniejszanie liczby makrofagów

w kolejnych dniach wynika ze zmiany fenotypu z M1 na M2. Można, więc przypuszczać, że peptyd AWL3106 zwiększył liczbę M1 na początku gojenia, a następnie przyczynił się do zmiany fenotypu komórek na M2. Prawdopodobnie bifalina w podobny sposób wpływa na fenotypy makrofagów. Działanie przeciwzapalne peptydu opioidowego bifaliny zostało potwierdzone w modelu zapalenia okrężnicy (Sobczak i wsp. 2014) i hodowli komórek mikrogleju (Popiolek-Barczyk i wsp. 2017). Wyniki otrzymane w mojej pracy pokazały, że bifalina także wpływa na stan zapalny w trudno gojącej ranie. Jak stwierdził Nissen i wsp. 1997 peptydy opioidowe są zaangażowane w procesy zapalne. Ponadto są produkowane przez monocyty/makrofagi, które w nich uczestniczą. Rany trudno gojące po zastosowaniu obu badanych peptydów AWL3106 i bifaliny miały podobną odpowiedź zapalną do ran zdrowych.

Peptyd AWL3106 i bifalina nie wpłynęły na liczbę naczyń krwionośnych. Opioidy jednak mogą działać proangiogenicznie, jak po miejscowym użyciu morfiny czy fentanylu (Gupta i wsp. 2002, 2015) lub antyangiogenicznie przy długotrwałym podawaniu dootrzewnowo tej pierwszej (Lam i wsp. 2008). Ziche i wsp. 1990 wykazał, że SP pobudza komórki śródbłonna, na których znajdują się jej receptory NK-1 (Antezana i wsp. 2002). Częściowo te dane literaturowe wyjaśniają wyniki badań histopatologicznych w mojej pracy. W obrazach mikroskopowych zauważono, że naczynia krwionośne w grupie 3106 i BIF miały większą średnicę, wyraźniejsze światło i były bardziej owalne/okrągłe w porównaniu do grupy DM. Zastosowanie tylko CD34 jako parametru angiogenezy nie pozwala porównać wyników z mojej pracy do badań Rook i wsp. 2008, 2009.

Kolejne wyniki badań pokazały, że bifalina zwiększyła grubość naskórka. Dane literaturowe pokazują, że działa ona stymulująco na migrację keratynocytów *in vitro* (Yildiz i wsp. 2018). Takie obserwacje poczyniono też z innymi egzogennymi opioidami (Bigliardi i wsp. 2009, Charbaji i wsp. 2012). Aplikacja tych związków skutkuje grubszymi warstwami żywych keratynocytów. Bifalina jest zbudowana aż z dwóch tych samych fragmentów peptydu opioidowego – enkefaliny. W przypadku peptydu AWL3106 nie zaobserwowano tego zjawiska, prawdopodobnie dlatego, że ma inną budowę od bifaliny. Jest pochodną nie tylko peptydu opioidowego – dermorfiny, ale i fragmentu SP. Jednym z mechanizmów, który tłumaczy ponowne naskórkowanie w wyniku działania peptydów opioidowych jest mechanizm opisujący działanie met-enkefaliny, która pobudza receptory δ znajdujące się na keratynocytach (Cheng i wsp. 2008, Bigliardi i wsp. 2009, 2015) prowadząc do rozluźnienia połączeń komórkowych nazywanych desmosomami, w wyniku czego komórki naskórka zaczynają migrować (Bigliardi i wsp. 2015). Kolejne badania również wskazują na udział peptydów opioidowych w odtwarzaniu naskórka. Przy nadmiernej ekspresji μ , δ i κ na

keratynocytach dochodzi do powstania blizn przerostowych (Cheng i wsp. 2008). Jak się okazuje ekspresję μ reguluje podwyższony poziom β -endorfiny, która obniża go w wyniku sprzężenia zwrotnego. Peptyd opioidowy równocześnie zwiększa regulację receptora TGF- β wpływającego na wzrost nabłonka. (Bigliardi i wsp. 2003). W literaturze można znaleźć opisy procesów i szlaków, w których biorą udział peptydy opioidowe. Takie prace wskazują kierunek badań, którym w przyszłości powinna zostać poddana bifalina. Na przykład badanie leu-enkefaliny i β -neoendorfiny pokazało, że wpływają one na aktywację ERK 1/2, P90^{RSK} (ang. *90 kDa ribosomal protein S6 kinase*, kinaza rybosomalna s6), Elk-1 (ang. *Ets-like protein-1*, czynnik transkrypcyjny z rodziny ETS), zaburzenie pracy hemidesmosomów (HDs, ang. *hemidesmosomes*) i zwiększenie poziomu MMP-2 i MMP-9 w ludzkich keratynocytach, co prowadzi do pobudzenia migracji tych komórek bez zmian w ich proliferacji i przebudowy macierzy pozakomórkowej (Yang i wsp. 2016, 2020).

W ostatniej fazie gojenia się rany – przebudowy zaobserwowano, że peptyd AWL3106 zwiększył zawartość kolagenu w tkance. Włókna białka były też grubsze i bardziej regularnie ułożone po zastosowaniu obu badanych peptydów. Podobne obserwacje po zastosowaniu bifaliny poczynił też w swojej pracy Konop – rozprawa doktorska 2016. W moich badaniach wzrost zawartości kolagenu korelował ze zmniejszonym odsetkiem fibroblastów w fazie przebudowy. Taka zależność jest charakterystyczna dla rany zdrowej. SP stosowana w różnych modelach literaturowych zwiększała odkładanie, orientację i zawartość kolagenu oraz migrację i proliferację fibroblastów. Ponadto wpływała na regenerację skóry właściwej, lepsze uformowanie tkanki ziarninowej, zwiększenie jej ilości, o czym świadczył też obniżony przez nią poziomu MMP-9 odpowiedzialnej za rozkład macierzy pozakomórkowej. (Kant i wsp. 2015, Kim i wsp. 2018, 2019) Badania na zwierzętach pokazują, że aktywność enzymu kolagenazy i proteazy rośnie w hiperglikemii (Baltzis i wsp. 2014). Zwiększenie ilości kolagenu po zastosowaniu SP może tłumaczyć obecnością receptora NK-1 na powierzchni fibroblastów i produkcją przez nie tego białka. (Antezana i wsp. 2002). μ , δ i κ również znajdują się na tych komórkach i ulegają w nich ekspresji (Cheng i wsp. 2008, Bigliardi i wsp. 2009), a badania z peptydem opioidowym β -neoendorfiną pokazują, że zwiększa ona ich migrację (Yang i wsp. 2020).

Leczenie ran cukrzycowych jest trudne. Łożyska ran różnią się dominującym czynnikiem (nadmierny wysięk, zakażenie bakteryjne itd.), od którego uzależniony jest wybór opatrunku. Pomimo ciągłych starań nie ma obecnie idealnego preparatu, który byłby w pełni skuteczny w leczeniu ran cukrzycowych, dlatego często dochodzi do amputacji kończyny. Z tego powodu w mojej pracy trzeba było zastosować jako kontrolę preparat, który jest

sprawdzony w leczeniu ran. Użyto, więc maści o nazwie *iruxol®mono*. Zawiera on kolagenazę. Jest to enzym proteolityczny uzyskany z *Clostridium histolyticum*, którego funkcją jest rozkładanie naturalnego kolagenu. Występuje ona w maściach na rany, a jej zadaniem jest przyspieszenie gojenia poprzez oczyszczenie z tkanki martwiczej po miejscowym zastosowaniu. (Schultz i wsp. 2003) Działanie tego enzymu polega na rozbijaniu kolagenu do małych peptydów, które mają zdolność przyciągania do siebie: prekursorowych monocytów, makrofagów, fibroblastów i neutrofilów. Kolagenaza *Clostridium A* nie tylko rozkłada fibrylarne białko, ale także sprzyja gojeniu oparzeń, tych o częściowej grubości. (Dokumcu i wsp. 2008) Zgodnie z badaniami Özcan i wsp. 2002 leczenie nią jest tak samo pomyslane jak zabiegi chirurgiczne. Jej pozytywny wpływ na oczyszczanie łożyska jest dokumentowany od lat 90-tych. (Dokumcu i wsp. 2008) Komercyjna maść z kolagenazą została zastosowana pomimo braku pełnej kontroli (nie może być traktowana wprost jako kontrola procesu gojenia rany oparzeniowej u szczurów hiperglikemicznych), ale ma szerokie spektrum działania i jest używana zarówno w owrzodzeniach (praca Palmieri i Magri 1998) jak i oparzeniach (praca Kaźmierski i wsp. 2007). W mojej pracy gojenie trudno gojących ran nie będzie przebiegało tak samo jak gojenie oparzenia u osoby bez cukrzycy czy gojenie owrzodzenia u osoby z tą jednostką chorobową. Ze względu na to, że wpływ opatrunku sprawdza się pod kątem parametrów takich jak: powierzchnia rany (stały parametr) i zmiennych (liczba naczyń krwionośnych, makrofagów, keratynocytów, cytokin, poziom ekspresji genów itd.) można było porównać działanie *iruxol®mono* do badanych przeze mnie peptydów. Są to czynniki w gojącej się ranie, które mają wpływ na czas jego trwania. Na ich podstawie stwierdzana jest skuteczność użytego opatrunku. W różnych pracach stosuje się odmienne parametry do oceny działania *iruxol®mono*. Warto podkreślić, że tak samo jak opioidy i neurokininy główne działanie wykazuje w I i II fazie gojenia. Ponadto zarówno *iruxol®mono*, opioidy i neurokininy są stosowane na rany dopiero po uprzednim zastosowaniu środków przeciwbakteryjnych / zwalczaniu zakażenia. Jednak w szczurzym modelu rany cukrzycowej takie zakażenie występuje tylko po celowym wprowadzeniu bakterii np. gronkowca złocistego (łac. *Staphylococcus aureus*), tak jak w pracy Ranjbar i Takhtfooladi 2016, dlatego w badaniach prowadzonych do tej pracy nie stosowano antybiotyków.

Podany *iruxol®mono* podobnie do badanych peptydów zwiększył odpowiedź zapalną. Po jego zastosowaniu naczynia krwionośne i włókna kolagenowe wyglądem przypominały te po użyciu peptydu AWL3106 i bifaliny. *Iruxol®mono* zwiększył także intensywność angiogenezy, co jest zgodne z doniesieniami literaturowymi (Perini i wsp. 2015). Stosowanie go po oczyszczeniu łożyska rany (14 dzień od rozpoczęcia leczenia) doprowadziło do wzrostu

stanu zapalnego, co było skutkiem zbyt długiego czasu aplikacji. Zauważono także, że działanie badanych peptydów podobnie do *iruxol®mono* odbywało się w fazie zapalnej i proliferacyjnej.

Działanie kolagenazy *Clostridium A* może być także negatywne, jak donoszą niektóre badania. Dokumcu i wsp. 2008 prowadzili doświadczenia nad systemową odpowiedzią zapalną tego enzymu w szczurzym modelu oparzenia drugiego stopnia. Podjęcie przez nich takich badań wynikało z obserwacji, jakie poczynili u poparzonych pacjentów, u których występowała: gorączka, tachykardia, podwyższony poziom CRP (ang. *C-reactive protein*, białka C-reaktywnego) w surowicy, leukocytopenia i leukocytoza. W dodatku w wymazach z ran nie było widocznej infekcji. W swoich badaniach zauważyli, że *Clostridium A* pogarszała ogólnoustrojową reakcję zapalną u szczurów z oparzeniami o częściowej grubości. Badania Dokumcu i wsp. 2008 pokazują, że leki stosowane na rany mają też swoje ograniczenia. Jak już wcześniej wspomniano kolagenaza jest często stosowana w walce z przewlekłymi owrzodzeniami i oparzeniami. Niemniej jednak jej stosowanie wymaga pełnej znajomości właściwości tego enzymu.

W badaniach Chéret i wsp. 2014, Jung i wsp. 2016, Um i wsp. 2017, Popiołek-Barczyk i wsp. 2017, Yildiz i wsp. 2018 zwrócono szczególną uwagę na wielkość stosowanej dawki SP i opioidów, bo to od niej zależy skuteczność i toksyczność badanego peptydu. W roku 2017 ukazała się praca Shanmugam i wsp., która obejmowała dużą grupę chorych z przewlekłymi owrzodzeniami (450 osób). Pacjenci uczestniczący w badaniu przyjmowali opioidy ze względu na odczuwany przez nich ból. Badacze zauważyli, że rana zaczyna się goić w momencie, gdy dolegliwość jej towarzysząca zaczyna ustępować. Dlatego zostały przez nich podjęte badania kliniczne w kontekście wpływu opioidów na gojenie. Według badań Shanmugam i wsp. 2017 w dawce > 10 mg/dobę spowalniały zdrowienie ran.

Celem przedstawionej pracy było zbadanie wpływu dwóch peptydów pochodnych opioidowych i SP lub będących tylko pochodnymi opioidowymi. *Iruxol®mono* zastosowany w mojej pracy jako kontrola jest środkiem leczniczym aplikowanym od lat 90-tych w terapii rany cukrzycowej. Może także peptydy AWL3106 i bifalina, które w porównaniu do *iruxol®mono* wykazały swoją skuteczność w modelu trudno gojącej rany, choć w niewielkim stopniu przyczynią się także do rozwoju terapii rany cukrzycowej. Otrzymane wyniki pochodzą z doświadczeń przeprowadzonych z użyciem modelu rany cukrzycowej zwierzęcia laboratoryjnego i wymagają dalszych badań.

6. Podsumowanie i wnioski

W mojej pracy doktorskiej zbadalam wpływ peptydu hybrydowego AWL3106 (liganda receptorów opioidowych i tachykininowego NK1) i peptydu dimerycznego bifaliny (liganda receptorów opioidowych) na proces gojenia ran.

Do badania nowych opatrunków zawierających badane związki wykorzystałam zmodyfikowany model zwierzęcy trudno gojącej się rany cukrzycowej. Polegał on na indukowaniu rany oparzeniowej u szczurów, u których wcześniej wywołano cukrzycę streptozotocynową. Zastosowany model owrzodzenia w stopie cukrzycowej charakteryzował się wolniejszym zarastaniem rany, wydłużonym stanem zapalnym, osłabioną angiogenezą i proliferacją fibroblastów, cieńszym naskórkiem i mniejszą syntezą kolagenu w porównaniu do prawidłowo gojącej się rany. Model ten dobrze oddawał upośledzenie najważniejszych procesów zachodzących w gojącej się ranie cukrzycowej i pozwolił mi na ocenę skuteczności peptydu hybrydowego AWL3106 i peptydu dimerycznego bifaliny w trudno gojących się ranach.

Badane związki adsorbowałam na preparatach keratynowych i aplikowałam na rany w formie maści na bazie lanoliny, a nieinkrustowane preparaty keratynowe aplikowałam na rany w formie zasypki.

Przeprowadzone badania histopatologiczne materiału pobranego w trakcie gojenia ran (barwienie H&E oraz trichromem wg. Massona) i immunohistochemiczne (z użyciem przeciwciał charakteryzujących makrofagi, komórki śródbłonka naczyń i przeciwciał na obecność białka charakterystycznego dla fibroblastów) pozwoliły ocenić badane związki.

Wyniki otrzymane dla poszczególnych związków analizowałam pod kątem ich wpływu na procesy w gojącej się ranie. Oba badane związki w sposób istotny przyspieszały zarastanie rany, wpłynęły pozytywnie na skrócenie stanu zapalnego, ponowne naskórkowanie i zwiększyły wytrzymałość blizny.

Działanie badanych związków porównałam do działania komercyjnej maści *iruxol®mono*, która jest od dawna stosowana w owrzodzeniach stopy cukrzycowej. Oba badane peptydy AWL3106 i bifalina wykazały większy wpływ na poprawę gojenia się rany w porównaniu do maści komercyjnej *iruxol®mono*.

W poniższej tabeli zestawiałam otrzymane wyniki wpływu badanych związków na proces gojenia się ran pod względem istotności statystycznej.

Nazwa grupy Parametr	Pozytywna kontrola – szczury bez cukrzycy	Preparat keratynowy	Preparat keratynowy z zaadsorbowanym peptydem AWL3106	Preparat keratynowy z zaadsorbowanym peptydem bifalinalą	Maść komercyjna <i>iruxol®mono</i>
Zarastanie rany	1	brak wpływu	2	2	brak wpływu
Naciek makrofagów	1	brak wpływu	1	1	1
Grubość naskórka	2	brak wpływu	brak wpływu	1	brak wpływu
Angiogeneza	2	brak wpływu	brak wpływu	brak wpływu	1
Proliferacja fibroblastów	1	brak wpływu	brak wpływu	brak wpływu	brak wpływu
Nowo powstałe włókna kolagenowe	3	brak wpływu	3	brak wpływu	brak wpływu
Suma punktów	10	0	6	4	2

1 pkt. – wykazuje pozytywny (statystycznie znamienne, $*p \leq 0.05$, $**p \leq 0.01$) wpływ na zachodzący proces

2 pkt. – wykazuje pozytywny (statystycznie znamienne, $***p \leq 0.001$, $****p \leq 0.0001$) wpływ na zachodzący proces

3 pkt. – ostateczny wygląd tkanki (zawartość włókien kolagenowych powyżej 75%)

Podsumowując powyższe wyniki stwierdziłam, że:

1. Peptyd hybrydowy AWL3106: zwiększył zarastanie rany, zwiększył i skrócił czas nacieku makrofagów oraz zwiększył zawartość nowo powstałego kolagenu.
2. Peptyd dimeryczny bifalina zwiększył zarastanie rany, grubość naskórka oraz zwiększył naciek makrofagów.
3. Preparat keratynowy nie wykazywał wpływu na gojenie się ran.
4. Badane peptydy (AWL3106 i bifalina) wykazały podobnie, jak maść *iruxol®mono* większy naciek makrofagów.

Piśmiennictwo

1. Abas, M., El Masry, M., Elgharably, H., 2020. Chapter 19 - Collagen in diabetic wound healing. *Wound Healing, Tissue Repair, and Regeneration in Diabetes*, 393-401. doi: 10.1016/B978-0-12-816413-6.00019-8
2. Abdullahi, A., Amini-Nik, S., Jeschke, M.G., 2014. Animal models in burn research. *Cellular and Molecular Life Sciences*. doi:10.1007/s00018-014-1612-5
3. Aguilar, F., Teran Soto, J.M., la Pen, J.E. de, 2012. The Pathogenesis of the Diabetic Foot Ulcer: Prevention and Management, in: *Global Perspective on Diabetic Foot Ulcerations*. InTech. doi:10.5772/30325
4. Akbarzadeh, A., Norouzian, D., ... Lame Rad, B., 2007. Induction of diabetes by Streptozotocin in rats. *Indian Journal of Clinical Biochemistry* 22, 60–64. doi:10.1007/BF02913315
5. Andrade, T.A.M., 2017. Skin changes in streptozotocin-induced diabetic rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 490, 1154–1161. doi:10.1016/j.bbrc.2017.06.166
6. Antezana, M.A., Sullivan, S.R., ... Olerud, J.E., 2002. Neutral endopeptidase activity is increased in the skin of subjects with diabetic ulcers. *Journal of Investigative Dermatology* 119, 1400–1404. doi:10.1046/j.1523-1747.2002.19618.x
7. Azevedo, F., Pessoa, A., ... Lima, M.H., 2016. Effect of Topical Insulin on Second-Degree Burns in Diabetic Rats. *Biological Research for Nursing* 18, 181–192. doi:10.1177/1099800415592175
8. Bairy, K.L., Abhinav, R., Satyam, S.M., 2014. Evaluation of burn wound healing activity of topical regular insulin in non-diabetic and streptozocin-induced diabetic rats. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 6, 127–130.
9. Baltzis, D., Eleftheriadou, I., Veves, A., 2014. Pathogenesis and Treatment of Impaired Wound Healing in Diabetes Mellitus: New Insights. *Advances in Therapy*. doi:10.1007/s12325-014-0140-x
10. Bigliardi, P.L., Neumann, C., ... Bigliardi-Qi, M., 2015. Activation of the δ -opioid receptor promotes cutaneous wound healing by affecting keratinocyte intercellular adhesion and migration. *British Journal of Pharmacology*. doi:10.1111/bph.12687
11. Bigliardi, P.L., Sumanovski, L.T., ... Bigliardi-Qi, M., 2003. Different expression of μ -opiate receptor in chronic and acute wounds and the effect of β -endorphin on transforming growth factor β type II receptor and cytokeratin 16 expression. *Journal of Investigative Dermatology* 120, 145–152. doi:10.1046/j.1523-1747.2003.12018.x

12. Bigliardi, P.L., Tobin, D.J., ... Bigliardi-Qi, M., 2009. Opioids and the skin - Where do we stand? *Experimental Dermatology*. doi:10.1111/j.1600-0625.2009.00844.x
13. Bigliardi-Qi, M., Bigliardi, P., 2018. The roles of opioid receptors in cutaneous wound healing, in: *Handbook of Experimental Pharmacology*. Springer New York LLC, pp. 335–345. doi:10.1007/164_2017_14
14. Busuioc, C.J., Mogoşanu, G.D., ... Mogoantă, L., 2013. Phases of the cutaneous angiogenesis process in experimental third-degree skin burns: Histological and immunohistochemical study. *Romanian Journal of Morphology and Embryology* 54, 163–171.
15. Chang, A.C., Dearman, B., Greenwood, J.E., 2011. A comparison of wound area measurement techniques: visitrak versus photography. *Eplasty* 11, e18.
16. Charbaji, N., Schäfer-Korting, M., Küchler, S., 2012. Morphine stimulates cell migration of oral epithelial cells by delta-opioid receptor activation. *PLoS ONE* 7. doi:10.1371/journal.pone.0042616
17. Cheng, B., Liu, H.W., ... Li, J.F., 2008. Coexistence and upregulation of three types of opioid receptors, mu, delta and kappa, in human hypertrophic scars. *British Journal of Dermatology* 158, 713–720. doi:10.1111/j.1365-2133.2008.08449.x
18. Chéret, J., Lebonvallet, N., ... Le Gall-Ianotto, C., 2014. Influence of sensory neuropeptides on human cutaneous wound healing process. *Journal of Dermatological Science* 74, 193–203. doi:10.1016/j.jdermsci.2014.02.001
19. Czubak, K.A., Żbikowska, H.M., 2014. Struktura, funkcja i znaczenie biomedyczne kolagenów. *Ann. Acad. Med. Siles.* 68, 245–254.
20. Davidson, J. M., DiPietro, L., 2006. *The Wound-Healing Process. The Diabetic Foot*, pp. 59-82. doi.org/10.1007/978-1-59745-075-1_4.
21. De Guzman, R.C., Tsuda, S.M., ... Van Dyke, M.E., 2015. Binding interactions of keratin-based hair fiber extract to gold, Keratin, and BMP-2. *PLoS ONE* 10. doi:10.1371/journal.pone.0137233
22. Deeds, M.C., Anderson, J.M., ... Kudva, Y.C., 2011. Single dose streptozotocin-induced diabetes: Considerations for study design in islet transplantation models. *Laboratory Animals*. doi:10.1258/la.2010.010090
23. Demirci, S., Doğan, A., ... Sahin, F., 2015. Boron and Poloxamer (F68 and F127) Containing Hydrogel Formulation for Burn Wound Healing. *Biological Trace Element Research* 168, 169–180. doi:10.1007/s12011-015-0338-z

24. Depre, C., Young, M.E., ... Taegtmeier, H., 2000. Streptozotocin-induced changes in cardiac gene expression in the absence of severe contractile dysfunction. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 32, 985–996. doi:10.1006/jmcc.2000.1139
25. de Souza, Á. do P.B., 2017. The in vivo effect of L-arginine on skin elasticity in mice. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 53. doi:10.1590/s2175-97902017000300045
26. Dokumcu, Z., Ergun, O., ... Celik, A., 2008. Clostridial collagenase aggravates the systemic inflammatory response in rats with partial-thickness burns. *Burns* 34, 935–941. doi:10.1016/j.burns.2008.01.001
27. Dorsett-Martin, W.A., Wysocki, A.B., 2008. Rat models of skin wound healing, in: *Source Book of Models for Biomedical Research*. Humana Press, pp. 631–638. doi:10.1007/978-1-59745-285-4_65
28. Drzewoski, J., 2010. *Podręczny leksykon diabetologiczny*. Wydanie II. Poznań: Termedia.
29. Fantinati, M.S., Mendonça, D.E. O., ... Lino Júnior, R.de S., 2016. Low intensity ultrasound therapy induces angiogenesis and persistent inflammation in the chronic phase of the healing process of third degree burn wounds experimentally induced in diabetic and non-diabetic rats. *Acta Cirurgica Brasileira* 31, 463–471. doi:10.1590/s0102-865020160070000006
30. Feezor, R.J., Paddock, H.N., ... Mazingo, D.W., 2004. Temporal patterns of gene expression in murine cutaneous burn wound healing. *Physiological Genomics* 16, 341–348. doi:10.1152/physiolgenomics.00101.2003
31. Fortunati, E., Aluigi, A., ... Puglia, D., 2015. Keratins extracted from Merino wool and Brown Alpaca fibres: Thermal, mechanical and biological properties of PLLA based biocomposites. *Materials Science and Engineering C* 47, 394–406. doi:10.1016/j.msec.2014.11.007
32. Fröde, T.S., Medeiros, Y.S., 2008. Animal models to test drugs with potential antidiabetic activity. *Journal of Ethnopharmacology*. doi:10.1016/j.jep.2007.10.038
33. Gantwerker, E.A., Hom, D.B., 2012. Skin: Histology and physiology of wound healing. *Clinics in Plastic Surgery*. doi:10.1016/j.cps.2011.09.005
34. Goldsmith, J.R., Uronis, J.M., Jobin, C., 2011. Mu opioid signaling protects against acute murine intestinal injury in a manner involving Stat3 signaling. *American Journal of Pathology* 179, 673–683. doi:10.1016/j.ajpath.2011.04.032
35. Graefe, S., Mohiuddin, S.S., 2020. *Biochemistry, Substance P*. StatPearls Publishing.

36. Guo, S., Dipietro, L.A., 2010. Factors affecting wound healing. *J Dent Res.*, 89(3):219–229. doi:10.1177/0022034509359125
37. Gupta, K., Kshirsagar, S., ... Hebbel, R.P., 2002. Morphine stimulates angiogenesis by activating proangiogenic and survival-promoting signaling and promotes breast tumor growth. *Cancer Research* 62, 4491–4498.
38. Gupta, A., Kumar, P., 2015. Assessment of the histological state of the healing wound. *Plastic and Aesthetic Research* 2, 239. doi:10.4103/2347-9264.158862
39. Gupta, M., Poonawala, T., ... Gupta, K., 2015. Topical fentanyl stimulates healing of ischemic wounds in diabetic rats. *Journal of Diabetes* 7, 573–583. doi:10.1111/1753-0407.12223
40. Hamed, S., Ullmann, Y., ... Liu, P.Y., 2017. Topical erythropoietin treatment accelerates the healing of cutaneous burn wounds in diabetic pigs through an aquaporin-3-dependent mechanism. *Diabetes* 66, 2254–2265. doi:10.2337/db16-1205
41. Howarth, F.C., Jacobson, M., ... Adeghate, E., 2005. Long-term effects of streptozotocin-induced diabetes on the electrocardiogram, physical activity and body temperature in rats. *Experimental Physiology* 90, 827–835. doi:10.1113/expphysiol.2005.031252
42. Huang, H., Cuic, W., Qiu, W., Zhua, M., Zhao, R., Zeng, D., Dong, Ch., Wang, X., Guo, W., Xing, W., Lia, X., Lia, L., Tana, Y., Wua, X., Chena, L., Fud, X., Luoe, D., Xua, X., 2015. Impaired wound healing results from the dysfunction of the Akt/mTOR pathway in diabetic rats. *Journal of Dermatological Science*. doi.org/10.1016/j.jdermsci.2015.06.002
43. Jackson, D.M.G., 1953. The diagnosis of the depth of burning. *British Journal of Surgery* 40, 588–596. doi:10.1002/bjs.18004016413
44. Jenkins, G.W., Tortora, G.J., Kemnitz, C.P. 2006. *Anatomy and physiology: from science to life*. New York: J. Wiley and Sons, p. 148–71. Chapter: 5.
45. Jhamb, S., Vangaveti, V.N., Malabu, U.H., 2016. Genetic and molecular basis of diabetic foot ulcers: Clinical review. *Journal of Tissue Viability*. doi:10.1016/j.jtv.2016.06.005
46. Jiang, M.H., Chung, E., ... Son, Y., 2012. Substance P induces M2-type macrophages after spinal cord injury. *NeuroReport* 23, 786–792. doi:10.1097/WNR.0b013e3283572206

47. Jung, N., Yu, J., ... Park, KiS., 2016. Substance P modulates properties of normal and diabetic dermal fibroblasts. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 13, 155–161. doi:10.1007/s13770-016-9085-2
48. Kant, V., Kumar, D., ... Tandan, S.K., 2015. Topical application of substance P promotes wound healing in streptozotocin-induced diabetic rats. *Cytokine* 73, 144–155. doi:10.1016/j.cyto.2014.12.015
49. Kaźmierski, M., Mańkowski, P., ... Harasymczuk, J., 2007. Comparison of the results of operative and conservative treatment of deep dermal partial-thickness scalds in children. *European Journal of Pediatric Surgery* 17, 354–361. doi:10.1055/s-2006-924646
50. Kim, D.J., 2018. A novel substance P-based hydrogel for increased wound healing efficiency. *Molecules* 23. doi:10.3390/molecules23092215
51. Kim, S., Piao, J., ... Hong, H.S., 2019. Substance P accelerates wound repair by promoting neovascularization and preventing inflammation in an ischemia mouse model. *Life Sciences* 225, 98–106. doi:10.1016/j.lfs.2019.04.015
52. King, A.J.F., 2012. The use of animal models in diabetes research. *British Journal of Pharmacology*. doi:10.1111/j.1476-5381.2012.01911.x
53. Koh, T.J., DiPietro, L.A., 2011. Inflammation and wound healing: the role of the macrophage. *Expert reviews in molecular medicine*. doi:10.1017/S1462399411001943
54. Konop M. Wpływ keratynowych bioopatrunków na proces gojenia ran chirurgicznych u myszy zdrowych i z jatrogennie wywołaną cukrzycą (rozprawa doktorska, 2016), Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN, Warszawa
55. Kotian, S.R., Pai, K.S. R., ... Bhat, K.M., 2015. Biomechanical, biochemical and histological evidences for wound healing properties of Indian traditional medicines. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 7, 163–171.
56. Kubota, T., Miyake, K., Hirasaw, T., 2013. The Mechanisms of Epigenetic Modifications During DNA Replication, in: *The Mechanisms of DNA Replication*. InTech. doi:10.5772/51592
57. Kurzyk, A., 2015. Angiogeneza - możliwości, problemy, perspektywy. *Postepy biochemii*.
58. Lam, C.F., Chang, P.J., ... Tsai, YuC., 2008. Prolonged use of high-dose morphine impairs angiogenesis and mobilization of endothelial progenitor cells in mice. *Anesthesia and Analgesia* 107, 686–692. doi:10.1213/ane.0b013e31817e6719

59. Le May, C., Chu, K., ... Mauvais-Jarvis, F., 2006. Estrogens protect pancreatic beta-cells from apoptosis and prevent insulin-deficient diabetes mellitus in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103, 9232–9237. doi:10.1073/pnas.0602956103
60. Le, N.N., Rose, M.B., ... Klitzman, B., 2011. Implant healing in experimental animal models of diabetes, in: *Journal of Diabetes Science and Technology*. SAGE Publications Inc., pp. 605–618. doi:10.1177/193229681100500315
61. Leal, E.C., Carvalho, E., ... Veves, A., 2015. Substance P promotes wound healing in diabetes by modulating inflammation and macrophage phenotype. *American Journal of Pathology* 185, 1638–1648. doi:10.1016/j.ajpath.2015.02.011
62. Lenzen, S., 2008. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*. doi:10.1007/s00125-007-0886-7
63. Liang, L., Stone, R.C., ... Tomic-Canic, M., 2016. Integrative analysis of miRNA and mRNA paired expression profiling of primary fibroblast derived from diabetic foot ulcers reveals multiple impaired cellular functions. *Wound Repair and Regeneration* 24, 943–953. doi:10.1111/wrr.12470
64. Lipkowski, A. W., Gajkowska, B., Grabowska, A., Kurzepa, K., 2009. Keratin-associated protein micromaterials for medical and cosmetic applications. *Polimery/Polymers*.
65. Liu, Z., Benard, O., ... Chi, Y., 2015. Inhibition of prostaglandin transporter (PGT) promotes perfusion and vascularization and accelerates wound healing in non-diabetic and diabetic rats. *PLoS ONE* 10. doi:10.1371/journal.pone.0133615
66. Magier, Z., Jarzyna, R., 2013. Rola transporterów glukozy w regulacji metabolizmu człowieka. *Postępy Biochemii* 70–82.
67. Maione, A.G., Brudno, Y., ... Garlick, J.A., 2015. Three-dimensional human tissue models that incorporate diabetic foot ulcer-derived fibroblasts mimic in vivo features of chronic wounds. *Tissue Engineering - Part C: Methods* 21, 499–508. doi:10.1089/ten.tec.2014.0414
68. Mandl, I., 1982. Bacterial collagenases and their clinical applications. *Arzneimittel-Forschung/Drug Research* 32, 1381–1384.
69. McLennan, S., Yue, D.K., Twigg, S.M., 2006. Molecular aspects of wound healing in diabetes. *Primary Intention* 14, 8–13.
70. Mehrotra, S., Prajapati, R.K., ... Singh, V.K., 2002. Immunomodulation by biphalin, dimeric synthetic opioid peptide, and its analog. *Immunopharmacology and Immunotoxicology* 24, 83–96. doi:10.1081/IPH-120003405

71. Mendonça, R., 2012. Angiogenesis in Wound Healing. *Tissue Regeneration - From Basic Biology to Clinical Application*, Jamie Davies, IntechOpen, doi: 10.5772/26279.
72. Miao, M., Niu, Y., ... Lu, S., 2012. Diabetes-impaired wound healing and altered macrophage activation: A possible pathophysiologic correlation. *Wound Repair and Regeneration* 20, 203–213. doi:10.1111/j.1524-475X.2012.00772.x
73. Mu, L., Tang, J., ... Lai, R., 2014. A potential wound-healing-promoting peptide from salamander skin. *FASEB Journal* 28, 3919–3929. doi:10.1096/fj.13-248476
74. Muhammad Ibrahim, A., 2019. Diabetic Foot Ulcer: Synopsis of the Epidemiology and Pathophysiology. *International Journal of Diabetes and Endocrinology* 3, 23. doi:10.11648/j.ijde.20180302.11
75. Nissen, J.B., Lund, M., ... Kragballe, K., 1997. Enkephalin-like immunoreactivity in human skin is found selectively in a fraction of CD68 - positive dermal cells: Increase in enkephalin-positive cells in lesional psoriasis. *Archives of Dermatological Research* 289, 265–271. doi:10.1007/s004030050191
76. Noguchi, F., Nakajima, T., ... Itami, S., 2014. Alteration of skin wound healing in keratinocyte-specific mediator complex subunit 1 null mice. *PLoS ONE* 9. doi:10.1371/journal.pone.0102271
77. Nunan, R., Harding, K.G., Martin, P., 2014. Clinical challenges of chronic wounds: searching for an optimal animal model to recapitulate their complexity. *Disease Models & Mechanisms* 7, 1205–1213. doi:10.1242/dmm.016782
78. Obońska, K., Grąbczewska, Z., Fisz, J., Kubica, J., 2011. Cukrzyca i dysfunkcja śródbłonna — krótkie spojrzenie na złożony problem. *Cardiology Journal*, 6(2), 109–116.
79. Okizaki, S.I., Ito, Y., ... Majima, M., 2016. Vascular Endothelial Growth Factor Receptor Type 1 Signaling Prevents Delayed Wound Healing in Diabetes by Attenuating the Production of IL-1 β by Recruited Macrophages. *American Journal of Pathology* 186, 1481–1498. doi:10.1016/j.ajpath.2016.02.014
80. Oliver, T.I., Mutluoglu, M., 2020. *Diabetic Foot Ulcer*. StatPearls Publishing.
81. Oriana, S., Guendalina, L., ... Annamaria, O., 2013. Delayed wound healing in aged skin rat models after thermal injury is associated with an increased MMP-9, K6 and CD44 expression. *Burns* 39, 776–787. doi:10.1016/j.burns.2012.09.013
82. Otto-Buczowska, E., 2014. „Pamięć metaboliczna” — znaczenie w cukrzycy. *Forum Medycyny Rodzinnej* 8, 51–55.

83. Özcan, C., Ergün, O., ... Özok, G., 2002. Enzymatic debridement of burn wound with collagenase in children with partial-thickness burns. *Burns* 28, 791–794. doi:10.1016/S0305-4179(02)00191-2
84. Palmieri, B., Magri, M., 1998. A new formulation of collagenase ointment (Irujol® mono) in the treatment of ulcers of the lower extremities. A randomised, placebo-controlled, double-blind study. *Clinical Drug Investigation* 15, 381–387. doi:10.2165/00044011-199815050-00002
85. Papazoglou, E.S., Zubkov, L., ... Weingarten, M.S., 2010. Image analysis of chronic wounds for determining the surface area. *Wound Repair and Regeneration* 18, 349–358. doi:10.1111/j.1524-475X.2010.00594.x
86. Pastar, I., Ojeh, N., ... Tomic-Canic, M., 2018. Physiology and Pathophysiology of Wound Healing in Diabetes. pp. 109–130. doi:10.1007/978-3-319-89869-8_7
87. Patry, J., Blanchette, V., 2017. Enzymatic debridement with collagenase in wounds and ulcers: a systematic review and meta-analysis. *International Wound Journal* 14, 1055–1065. doi:10.1111/iwj.12760
88. Perini, J.A., Angeli-Gamba, T., ... Machado, D.E., 2015. Topical application of Acheflan on rat skin injury accelerates wound healing: A histopathological, immunohistochemical and biochemical study. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 15. doi:10.1186/s12906-015-0745-x
89. Polish Pat. Appl. P380011 (2006) Lipkowski, A.W., Jurga, M., Domańska-Janik, K., Łukomska, B., Nośnikowy preparat białkowy, sposób jego otrzymywania oraz zastosowanie
90. Polish Pat. Appl. P381103 (2006) Lipkowski, A.W., Grabowska, A., Kurzepa, K., Szczucińska, A., Mikrostrukturalny preparat białkowy zawierający związki biologicznie czynne.
91. Poonawala, T., Levay-Young, B.K., ... Gupta, K., 2005. Opioids heal ischemic wounds in the rat. *Wound Repair and Regeneration* 13, 165–174. doi:10.1111/j.1067-1927.2005.130207.x
92. Popiolek-Barczyk, K., Piotrowska, A., ... Mika, J., 2017. Biphalin, a Dimeric Enkephalin, Alleviates LPS-Induced Activation in Rat Primary Microglial Cultures in Opioid Receptor-Dependent and Receptor-Independent Manners. *Neural Plasticity* 2017. doi:10.1155/2017/3829472

93. Rajabi, M., Ali, A., ... Cabral, J., 2020. Keratinous materials: Structures and functions in biomedical applications. *Materials Science and Engineering C*. doi:10.1016/j.msec.2019.110612
94. Rakieten, N., Rakieten, M.L., Nadkarni, M.V., 1963. Studies on the diabetogenic action of streptozotocin (NSC-37917). *Cancer chemotherapy reports* 29, 91–8.
95. Ramirez, H.A., Liang, L., ... Tomic-Canic, M., 2015. Comparative genomic, microRNA, and tissue analyses reveal subtle differences between non-diabetic and diabetic foot skin. *PLoS ONE* 10. doi:10.1371/journal.pone.0137133
96. Ranjbar, R., Takhtfooladi, M.A., 2016. The effects of low level laser therapy on *Staphylococcus aureus* infected third-degree burns in diabetic rats. *Acta Cirurgica Brasileira* 31, 250–255. doi:10.1590/s0102-865020160040000005
97. Rook, J.M., Hasan, W., McCarson, K.E., 2008. Temporal effects of topical morphine application on cutaneous wound healing. *Anesthesiology* 109, 130–136.
98. Rook, J.M., Hasan, W., McCarson, K.E., 2009. Morphine-induced early delays in wound closure: Involvement of sensory neuropeptides and modification of neurokinin receptor expression. *Biochemical Pharmacology* 77, 1747–1755. doi:10.1016/j.bcp.2009.03.003
99. Rouse, J.G., Van Dyke, M.E., 2010. A review of keratin-based biomaterials for biomedical applications. *Materials*. doi:10.3390/ma3020999
100. Rowan, M.P., Cancio, L.C., ... Chung, K.K., 2015. Burn wound healing and treatment: Review and advancements. *Critical Care*. doi:10.1186/s13054-015-0961-2
101. Schultz, G.S., Sibbald, R.G., ... Vanscheidt, W., 2003. Wound bed preparation: A systematic approach to wound management. *Wound Repair and Regeneration*. doi:10.1046/j.1524-475X.11.s2.1.x
102. Shanmugam, V.K., Couch, K.S., ... Amdur, R.L., 2017. Relationship between opioid treatment and rate of healing in chronic wounds. *Wound Repair and Regeneration* 25, 120–130. doi:10.1111/wrr.12496
103. Sharma, R., Dave, V., ... Yadav, S., 2013. Experimental Models on Diabetes: A Comprehensive Review. *International Journal of Advances in Pharmaceutical Sciences* 4, 1–8.
104. Shi, H., 2019. A health needs assessment of adults with diabetic foot disease in the US. *Diabetes and Metabolic Syndrome: Clinical Research and Reviews* 13, 2152–2157. doi:10.1016/j.dsx.2019.05.008

105. Shi, L., Carson, D., 2009. Collagenase santyl ointment: A selective agent for wound debridement. *Journal of Wound, Ostomy and Continence Nursing* 36. doi:10.1097/WON.0b013e3181bfdd1a
106. Sieradzki, J., red. 1998. *Przewlekłe powikłania cukrzycy*. Wydanie II. Kraków: Fundacja Rozwoju Diagnostyki Laboratoryjnej.
107. Singh, S., Young, A., McNaught, C.E., 2017. The physiology of wound healing. *Surgery (United Kingdom)*. doi:10.1016/j.mpsur.2017.06.004
108. Sobczak, M., Pilarczyk, A., ... Fichna, J., 2014. Anti-inflammatory and antinociceptive action of the dimeric enkephalin peptide biphalin in the mouse model of colitis: New potential treatment of abdominal pain associated with inflammatory bowel diseases. *Peptides* 60, 102–106. doi:10.1016/j.peptides.2014.08.005
109. Solmaz, A., Bahadir, E., ... Yeşen, B., 2016. Nesfatin-1 improves oxidative skin injury in normoglycemic or hyperglycemic rats. *Peptides* 78, 1–10. doi:10.1016/j.peptides.2015.12.006
110. Šoltésová, D., Herichová, I., 2014. On the mechanisms of diabetogenic effects of alloxan and streptozotocin. *Diabetologie* 3, 130–138.
111. Sorg, H., Tilkorn, D.J., ... Mirastschijski, U., 2017. Skin Wound Healing: An Update on the Current Knowledge and Concepts. *European Surgical Research*. doi:10.1159/000454919
112. Sterling, J.P., Heimbach, D.M., Gibran, N.S., 2010. Management of the burn wound. *ACS Surgery: Principles and Practice* 1–13. doi:10.2310/7800.S07C15
113. Sun, K., Guo, J., ... Wang, R.M., 2016. Fabrication of dual-sensitive keratin-based polymer hydrogels and their controllable release behaviors. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* 27, 1926–1940. doi:10.1080/09205063.2016.1239955
114. Sutcliffe, J.E., Thrasivoulou, C., ... Becker, D.L.S., 2017. Changes in the extracellular matrix surrounding human chronic wounds revealed by 2-photon imaging. *International Wound Journal* 14, 1225–1236. doi:10.1111/iwj.12789
115. Szkudelski, T., 2001. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiological research* 50, 537–46.
116. Tallis, A., Motley, T.A., ... Slade, H.B., 2013. Clinical and economic assessment of diabetic foot ulcer debridement with collagenase: Results of a randomized controlled study. *Clinical Therapeutics* 35, 1805–1820. doi:10.1016/j.clinthera.2013.09.013

117. Thangavel, P., Ramachandran, B., ... Muthuvijayan, V., 2017. Accelerated Healing of Diabetic Wounds Treated with L-Glutamic acid Loaded Hydrogels Through Enhanced Collagen Deposition and Angiogenesis: An in Vivo Study. *Scientific Reports* 7. doi:10.1038/s41598-017-10882-1
118. Tian, M., Qing, C., ... Lu, S., 2016. The relationship between Inflammation and impaired wound healing in a diabetic rat burn model. *Journal of Burn Care and Research* 37, e115–e124. doi:10.1097/BCR.0000000000000171
119. Tripathi, V., Verma, J., 2014. Different models used to induce diabetes: A comprehensive review. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*.
120. Turner, N.J., Badylak, S.F., 2014. The Use of Biologic Scaffolds in the Treatment of Chronic Nonhealing Wounds. *Advances in Wound Care* 4, 490–500. doi:10.1089/wound.2014.0604
121. Um, J., Yu, J., Park, K.S., 2017. Substance P accelerates wound healing in type 2 diabetic mice through endothelial progenitor cell mobilization and Yes-associated protein activation. *Molecular Medicine Reports* 15, 3035–3040. doi:10.3892/mmr.2017.6344
122. Van Neck, J.W., Tuk, B., ... Tong, M., 2017. Hyperbaric oxygen therapy for wound healing in diabetic rats: Varying efficacy after a clinically-based protocol. *PLoS ONE* 12. doi:10.1371/journal.pone.0177766
123. Wang, P.H., Huang, B.S., ... Chen, YiJ., 2018. Wound healing. *Journal of the Chinese Medical Association*. doi:10.1016/j.jcma.2017.11.002
124. Wang, W., Lin, S., ... Li, X., 2008. Acceleration of diabetic wound healing with chitosan-crosslinked collagen sponge containing recombinant human acidic fibroblast growth factor in healing-impaired STZ diabetic rats. *Life Sciences* 82, 190–204. doi:10.1016/j.lfs.2007.11.009
125. Watkins, P.J., 2004. ABC cukrzycy. Wydanie II. Gdańsk: Via Medica.
126. Wei, M., Ong, L., ... Brown, L., 2003. The streptozotocin-diabetic rat as a model of the chronic complications of human diabetes. *Heart Lung and Circulation* 12, 44–50. doi:10.1046/j.1444-2892.2003.00160.x
127. Wu, J., Yang, J., ... Mu, L., 2018. A frog cathelicidin peptide effectively promotes cutaneous wound healing in mice. *Biochemical Journal* 475, 2785–2799. doi:10.1042/BCJ20180286
128. Wu, K.K., Huan, Y., 2008. Streptozotocin-induced diabetic models in mice and rats. *Current Protocols in Pharmacology*. doi:10.1002/0471141755.ph0547s40

129. Yang, D.J., Lee, K.S., ... Kim, Ki W., 2016. Leucine-enkephalin promotes wound repair through the regulation of hemidesmosome dynamics and matrix metalloprotease. *Peptides* 76, 57–64. doi:10.1016/j.peptides.2015.12.010
130. Yang, D.J., Moh, S.H., ... Kim, Ki W., 2020. β -neoendorphin enhances wound healing by promoting cell migration in keratinocyte. *Molecules* 25. doi:10.3390/molecules25204640
131. Yıldız, E., Totuk, Ö.M. G., ... Şahin, A., 2018. Effects of Biphalin on Corneal Epithelial Wound Healing. *Proceedings* 2, 1552. doi:10.3390/proceedings2251552
132. Zhou, Z., Kawana, S., ... Suzuki, H., 2006. Dynamic changes in nerve growth factor and substance P in the murine hair cycle induced by depilation. *Journal of Dermatology* 33, 833–841. doi:10.1111/j.1346-8138.2006.00191.x
133. Ziche, M., Morbidelli, L., ... Maggi, C.A., 1990. Substance P stimulates neovascularization in vivo and proliferation of cultured endothelial cells. *Microvascular Research* 40, 264–278. doi:10.1016/0026-2862(90)90024-L