POLSKA AKADEMIA NAUK

***Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej***

***im. M. Mossakowskiego PAN***

***Marek Konop***

**„Wpływ keratynowych bioopatrunków na proces gojenia ran chirurgicznych u myszy zdrowych**

**i z jatrogennie wywołaną cukrzycą”**

Rozprawa doktorska

wykonana w Zakładzie Neuropeptydów pod kierunkiem:

prof. dr hab. n med. Lidii Rudnickiej,

promotor pomocniczy dr n. med. Joanna Czuwara.

Warszawa, 2016

Streszczenie

Gojenie ran jest złożonym wieloetapowym zjawiskiem tkankowym. Rany powstają na skutek urazu, ubytku tkanki w procesach zapalnych, niedotlenienia, niedokrwienia czy zastoju żylnego. W zależności od przyczyny, rany dzieli się na ostre i przewlekłe. Na proces gojenia istotny wpływ ma ogólny stan organizmu i procesy zachodzące w pobliżu rany. Rany trudno goją się w cukrzycy, zaburzeniach immunologicznych, niedokrwieniu w przypadku niewydolności tętniczej lub żylnej i mogą stanowić źródło wtórnej infekcji. Skuteczne leczenie ran jest ogromnym wyzwaniem dla wielu specjalistów.

Obecnie dostępne metody opatrywania ran są w wielu przypadkach niewystarczające. Dlatego poszukuje się nowych sposobów zaopatrzenia ran, mających przyspieszyć gojenie
 i wykazujących biozgodność z zaopatrywaną tkanką. W tym kontekście biomateriały na bazie keratyny pozyskanej z włosów, sierści czy wełny stanowią interesujące rozwiązanie ze względu na ich naturalną kompatybilność tkankową i udowodniony wpływ keratyny
w procesie gojenia.

Głównym celem pracy było stworzenie bioopatrunków na bazie białek towarzyszących keratynie pochodzących z naturalnego surowca jakim jest sierść mysia lub włosy ludzkie oraz zbadanie ich wpływu na gojenie ran w warunkach *in vivo* na mysim modelu rany chirurgicznej.

 Metodyka badań podzielona została na dwa etapy: badania fizyko-chemiczne otrzymanych preparatów keratynowych oraz ich wykorzystanie biologiczne *in vivo* na rany
u myszy. Preparaty keratynowe uzyskano na drodze chemicznej aktywacji i enzymatycznego trawienia naturalnych substratów tj. sierści mysiej i włosów ludzkich, którą opisał
i opatentował prof. Andrzej W. Lipkowski. Etap chemicznej aktywacji usuwa zanieczyszczenia i związki tłuszczowe z powierzchni włosów. Następnie aktywowany substrat poddawany jest enzymatycznemu trawieniu enzymami proteolitycznymi. Do oceny kształtu i morfologii powierzchni otrzymanych produktów użyto skaningowego mikroskopu elektronowego.

Na wszystkie badania na zwierzętach uzyskano zgodę IV Lokalnej Komisji Etycznej do spraw doświadczeń na zwierzętach. Do badań *in vivo* użyto 200 samców myszy szczepu C57BL6/J.

Grupę kontrolną stanowiło 20 zwierząt. U 180 zwierząt z grupy badanej indukowano jatrogenną cukrzycę poprzez dootrzewnowe podanie streptozotocyny w dawce 80 mg/kg przez 5 kolejnych dni. Dawkę streptozotocyny ustalono eksperymentalnie w badaniu pilotowym. Na plecach, symetrycznie wzdłuż linii kręgosłupa (na wysokości Th3-Th5) wytworzono dwie rany chirurgiczne: kontrolną oraz badaną, na którą jednorazowo aplikowano badany opatrunek keratynowy. Na podstawie dokumentacji fotograficznej obliczono procent wygojenia rany w 4, 7 i 14 dniu eksperymentu. W tych punktach czasowych pobierano biopsje tkankowe obejmujące ranę i przyległą tkankę do barwień histochemicznych (hematoksylina i eozyna, Masson-Trichrome) i immunofluorescencyjnych (wimentyna, Hoechst, kolagen IV) do oceny których wykorzystano mikroskopię fluorescencyjną. Oceniano wpływ opatrunków keratynowych na ranę (szybkość gojenia, odczyn zapalny, stopień i charakter wysięku, wynaczynienie erytrocytów, morfologię komórek, naskórkowanie, odtwarzanie owłosienia, wielkość i kształt blizny) i podścielisko rany (układ i organizacja włókien kolagenowych, obrzęk tkanki).

Do badań *in vivo* wykorzystano siedem opatrunków na bazie białek współwystępujących z keratyną (*keratin associated proteins, KAP*), w tym pięć preparatów na bazie mysich białek (fur keratin-derived powder, FKDP), oraz dwa preparaty na bazie białek ludzkich (human hair keratin-derived powder, oznaczonych A.W.L.). Otrzymane preparaty charakteryzowały się homogenną, rozbudowaną strukturą przestrzenną pozwalającą na zaabsorbowanie na nich dodatkowych substancji mogących wpływać na proces gojenia ran (np. nanocząstki srebra, pochodne opioidów, glutation czy hydrolizat), które wykorzystano w ich modyfikacji.

Analizując proces gojenia ran opatrzonych opatrunkami keratynowymi i ich modyfikacjami u myszy zdrowych oraz myszy z jatrogennie wywołaną cukrzycą stwierdzono że:

* w grupie myszy zdrowych opatrzonych opatrunkiem z keratyną (FKDP) średnia szybkość gojenia ran była większa. W czwartym dniu eksperymentu znamiennie szybsza (p<0.05). 30% (6/20) w porównaniu do rany nieopatrzonej 21,50% (4/20) W siódmym dniu eksperymentu wygojenie w 52,66% (6/12) wobec 45,42% (5/12), a dwa tygodnie od zranienia 89,50% (11/12) wobec 80,50% (10/12)
* w grupie myszy z jatrogennie wywołaną cukrzycą, u których stosowano badany opatrunek (na bazie FKDP wraz z modyfikacjami) gojenie także było szybsze. Średnia szybkość gojenia ran w czwartym dniu eksperymentu wynosiła 40.56% (32/80) i 30,09% (25/80) dla rany nieopatrzonej. Siódmego dnia średnia szybkość gojenia ran opatrzonych wynosiła 58,66% (28/48) a nieopatrzonych 49,45% (24/48). Dwa tygodnie od zranienia rana opatrzona wygojona była w 77,14% (37/48), a nieopatrzona w 65,31% (31/48)
* cztery z siedmiu przebadanych opatrunków keratynowych istotnie statystycznie wpływały na szybkość gojenia ran u myszy z jatrogennie wywołaną cukrzycą. Były to FKDP, FKDP+0,1% bifalina, FKDP+0,1% kazomorfina i AWL+glutation. W grupie opatrzonej opatrunkiem FKDP istotne statystycznie różnice obserwowano w czwartym
i siódmym dniu eksperymentu (p<0.001). W opatrunku FKDP+0,1% bifaliny znamienne statystycznie różnice obserwowano w czwartym i czternastym dniu eksperymentu (p<0.01). Z kolei FKDP+0,1% kazomorfiny przyspieszał szybkość gojenia ran we wszystkich punktach czasowych trwania eksperymentu, dla czwartego (p<0.05), siódmego i czternastego dnia eksperymentu (p<0.001). W przypadku modyfikowanego opatrunku keratynowego na bazie włosów ludzkich (AWL+glutation) znamienne statystycznie różnice obserwowano w 4 i 7 dniu eksperymentu (p<0,001 i p<0,01, odpowiednio)
* zastosowane opatrunki keratynowe nie indukowały stanu zapalnego, ogólnych objawów nietolerancji, nie nasilały wysięku, obrzęku podścieliska, wtapiały się naturalnie
w odczyn zapalno-resorpcyjny w ranie, co potwierdzono w analizie tkanki w mikroskopie świetlnym
* rany opatrzone cechowały się lepszym uporządkowaniem struktury odtwarzającej się tkanki w porównaniu z ranami kontrolnymi. Mniejszy był neutrofilowy odczyn ropny, mniejszy wysięk, mniejsze wynaczynienie erytrocytów, a efekt końcowy charakteryzował się mniej zaciągniętą i włóknistą blizną
* barwienie Masson-Trichrome (M-T) wykazało, że rany opatrzone cechowały się rozluźnieniem kolagenowego podścieliska rany, cieńszymi włókienkami kolagenowymi, co tłumaczy kliniczny efekt mniej pozaciąganej i cieńszej blizny
* wokół keratynowego opatrunku w biopsjach obserwowano zwiększoną liczbę komórek nabłonkowych i mezenchymalnych (keratynocytów i fibroblastów) w stosunku do rany nieopatrzonej, co przemawia za tym, że opatrunek keratynowy wykorzystywany jest jako rusztowanie w migracji tych komórek i reperacji ubytku tkanki, co potwierdzono
w mikroskopie fluorescencyjnym barwieniem na kolagen typu IV i obecnością jąder komórkowych w jego pobliżu.

Otrzymane wyniki wskazują, że uzyskane opatrunki keratynowe FKDP i ich modyfikowane formuły, spełniają kryteria „idealnego opatrunku” wg kryteriów zaproponowanych przez Turnera. Preparaty keratynowe wykazują niewielką immunogenność, są naturalnie wbudowywane w strukturę rany i odtwarzającej się tkanki, zapewniają odpowiednie środowisko potrzebne w procesie przebudowo-wytwórczym rany.

Na podstawie przeprowadzonych badań można postawić następujące wnioski:

1. uzyskane i zbadane *in vivo* preparaty na bazie białek współwystępujących z keratyną pochodzenia mysiego i ludzkiego są dobrze tolerowane i wykazują biokompatybilność z tkankami zwierząt doświadczalnych;
2. opatrunki keratynowe stymulują gojenie, szybsze naskórkowanie i uporządkowaną organizację włókien kolagenowych w ranie i jej podścielisku. Efektem zastosowania opatrunków keratynowych jest gładsza, mniej zwłókniała i pozaciągana blizna;
3. opatrunki keratynowe zmniejszają odczyn neutrofilowy związany z destrukcją tkanki, stymulują odczyn surowiczy z przewagą monocytów i makrofagów, co przemawia za bardziej kontrolowanym procesem resorpcyjno-regeneracyjnym podczas gojenia
4. zastosowane bioopatrunki keratynowe wpływają na zmniejszenie ilości wynaczynionej krwi do światła rany, co może świadczyć o ich właściwościach hemostatycznych
5. opatrunki keratynowe można rozważać jako bezpieczny i skuteczny materiał pochodzenia biologicznego wspomagający w sposób naturalny gojenie poprzez regulację odczynu zapalnego, wpływ na migrację keratynocytów i fibroblastów oraz bardziej uporządkowane formowanie się podścieliska łącznotkankowego w bliźnie
i kontrolowane włóknienie.