

! Artykuł jest dostępny na zasadzie dozwolonego użytku osobistego. Dalsze rozpowszechnianie (w tym umieszczanie w sieci) jest zabronione i stanowi poważne naruszenie przepisów prawa autorskiego oraz grozi sankcjami prawnymi.

BEATA MROZIKIEWICZ-RAKOWSKA¹ | MATEUSZ MIECZKOWSKI¹ | TOMASZ J. SIWKO¹ | MAGDALENA I. BUJALSKA-ZADROŻNY² | ANNA E. DE CORDE² | EMILIA GAŚIŃSKA² | KAMILA KULIK² | TOMASZ GRZELA³ | ALICJA KREJNER³ | RAFAŁ DULSKI⁴ | TADEUSZ PIĄTKOWSKI⁴ | ADRIANA NOWAK¹ | JANUSZ KRZYMIEN¹

NOWY MODEL RAN PRZEWLEKŁYCH W CUKRZYCY – BADANIE PILOTAŻOWE U SZCZURÓW RASY WISTAR

NEW MODEL OF CHRONIC WOUNDS IN WISTAR RATS – PILOT STUDY

STRESZCZENIE: W celu oceny modelu terapeutycznego wpływającego na gojenie ran w przebiegu cukrzycy, potrzebny jest powtarzalny zwierzęcy model rany przewlekłej. Dotychczas nie stworzono takiego uniwersalnego zwierzęcego modelu posiadającego warunki jak najbardziej zbliżone do warunków obserwowanych podczas gojenia u ludzi z wieloletnią cukrzycą. Celem badania była ocena przydatności stworzonego modelu rany przewlekłej u szczurów z cukrzycą streptozotocynową przy zastosowaniu insulinoterapii w warunkach względnej normoglikemii. Zarówno sposoby dokonywania pomiarów, jak i standaryzacja metod tworzenia oraz zaopatrywania rany były podobne do metod gojenia w warunkach klinicznych u ludzi.

SŁOWA KLUCZOWE: cukrzyca, insulina, rana, streptozotocyna, szczury, Wistar

ABSTRACT: To evaluate the therapeutic models of wound healing in diabetes, we need repeatable animal model of chronic wound. There has not been yet created a universal model similar to conditions observed during wound healing in humans with long history of diabetes. The aim of the study was to evaluate the usefulness of the created model of chronic wound in rats with streptozotocin induced diabetes, using insulin at a relative normoglycemia. Methods of measuring as well as standardized methods for creating and obtaining the wound brings us closer to healing conditions observed in clinical practice in humans.

KEY WORDS: diabetes, insulin, rats, streptozotocin, Wistar, wound

- 1 Katedra i Klinika Gastroenterologii i Chorób Przemiany Materii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego
- 2 Zakład Farmakodynamiki Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego
- 3 Katedra i Zakład Histologii i Embriologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego
- 4 Zakład Techniki Podczerwieni i Termowizji Instytutu Optoelektroniki Wojskowej Akademii Technicznej w Warszawie

✉ BEATA MROZIKIEWICZ-RAKOWSKA
Katedra i Klinika Gastroenterologii i Chorób Przemiany Materii,
Warszawski Uniwersytet Medyczny,
ul. Banacha 1a, 02-097 Warszawa,
Tel.: (22) 599 28 38, Fax: (22) 599 13 38,
e-mail: rakowskab123@gmail.com

Wpłynęło: 10.03.2015

Zaakceptowano: 08.04.2015

DOI: dx.doi.org/10.15374/LR2015004

WSTĘP

Proces gojenia ran u chorych z cukrzycą jest w znacznym stopniu upośledzony w stosunku do analogicznego procesu u osób bez cukrzycy. Trwa znacznie dłużej, a ponadto stwarza ryzyko powikłań, takich jak: zapalenie kości i szpiku kostnego, posocznica, konieczność resekcji ogniska zapalnego (w tym amputacji), a nawet zgon chorego [1–3]. W celu oceny przydatności różnych modeli terapeutycznych mających wpływ na proces gojenia rany w cukrzycy, ważne jest stworzenie powtarzalnego zwierzęcego modelu rany przewlekłej. Zrozumienie patomechanizmów gojenia rany z zastosowaniem różnych substancji optymalizujących poszczególne fazy gojenia u zwierząt doświadczalnych powinno poprzedzać wdrożenie tych preparatów u ludzi [4].

Dotychczas nie stworzono uniwersalnego modelu zwierzęcego rany przewlekłej, zbliżonego najbardziej do warunków obserwowanych podczas gojenia ran u ludzi

z wieloletnią cukrzycą [5, 6]. Wynika to z trudności odzworowania warunków generowania przewlekłych powikłań o charakterze mikro- i makroangiopatii w warunkach laboratoryjnych. Poza poszukiwaniem najbardziej homogennych gatunków zwierząt, standaryzacją tworzenia oraz zaopatrywania rany, ważne jest także uzyskanie optymalnego rachunku ekonomicznego [7].

W niniejszej pracy dążono do stworzenia modelu spełniającego powyższe założenia. Dokonując jego oceny, jako metodę farmakologicznego wyrównywania glikemii u badanych szczurów zastosowano insulinoterapię. Dotychczasowe dane z piśmiennictwa wskazują na konieczność dążenia do normoglikemii w celu poprawy warunków gojenia rany. Ma to znaczenie dla optymalnego czasu utrzymywania się poszczególnych faz gojenia, redukcji ryzyka narastania cech stanu zapalnego czy indukcji zagrażających życiu powikłań, takich jak: ryzyko zapalenia kości i szpiku kostnego, posocznicy, a nawet zgonu [8–11].

! Artykuł jest dostępny na zasadzie dozwolonego użytku osobistego. Dalsze rozpowszechnianie (w tym umieszczanie w sieci) jest zabronione i stanowi poważne naruszenie przepisów prawa autorskiego oraz grozi sankcjami prawnymi.

Celem badań była ocena przydatności stworzonego modelu rany przewlekłej u szczurów z cukrzycą streptozotocynową w warunkach względnej normoglikemii.

MATERIAŁ I METODY

Badanie przeprowadzono po uzyskaniu zgody II Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach w Warszawie.

W doświadczeniach wykorzystano szczury rasy Wistar, out-bred, płci męskiej, wagi około 300 g (± 30 g). W celu wywołania cukrzycy zwierzęta otrzymały domięśniowo streptozotocynę w dawce 38 mg/kg masy ciała (firmy Sigma-Aldrich) [12]. Poziom glukozy w krwi żyłnej szczurów (żyła ogonowa) monitorowano za pomocą glukometru Accu-Chek® Active (Roche). Po 28 dniach od podania streptozotocyny wybrano 14 zwierząt, które w największym stopniu spełniały kryteria średnio ciężkiej cukrzycy (glikemia w granicach 250–350 mg/dl).

Rozwojowi cukrzycy towarzyszyło pojawienie się neuropatii. Stopień uszkodzenia nerwów oceniano poprzez pomiar progu czucia bodźca mechanicznego według modyfikacji metody Randall-Selitto w 7., 14., 21. i 28. dobie od podania streptozotocyny [13]. Zmiany progu czucia bodźca mechanicznego badano przy użyciu analgezymetru Ugo Basile (typ 7200, Comerio-Varese). Bodziec mechaniczny o narastającej sile nacisku, działający na zewnętrzną powierzchnię tylnej kończyny szczura, był wyzwalany z analgezymetru, aż do momentu pojawienia się reakcji drgnięcia lub wycofania kończyny. Wyniki uzyskane w gramach przeliczano na wartości procentowe w odniesieniu do otrzymanych w czasie „0” (przed podaniem streptozotocyny), dla każdego szczura zgodnie ze wzorem:

$$\% \text{ analgezji} = \frac{(100 \times B)}{(A - 100)}$$

gdzie:

A: nacisk [g] w czasie „0”, przed podaniem streptozotocyny;

B: nacisk [g] w kolejnych dobach po podaniu streptozotocyny.

Procent analgezji obliczony z przedstawionego wzoru dla poszczególnych zwierząt były następnie wykorzystywane do obliczenia średnich wartości i analiz statystycznych.

Szczury wybrane na podstawie opisanych kryteriów zostały podzielone na dwie grupy po 7 osobników każda. Zwierzęta w grupie I otrzymywały przez 21 dni 2×dzienne iniekcje podskórne insuliny NPH w dawce 5 j.m./kg masy ciała. Szczurom z grupy II (grupa kontrolna) podawano w tym samym schemacie czasowym podskórne iniekcje soli fizjologicznej. Dawki leków były ustalone na podstawie piśmiennictwa tak, aby stężenia glukozy we krwi

u zwierząt otrzymujących insulinę mieściły się w granicach 80–150 mg/dl [14, 15]. W trakcie doświadczenia szczury miały nieograniczony dostęp do wody oraz pożywienia.

W celu wytworzenia ran szczury poddano anestezji z użyciem dootrzewnowych wstrzyknięć mieszaniny ketaminy (87 mg/ml) z ksylazyną (13 mg/ml). Skaryfikacje wykonano na grzbietowej powierzchni skóry, po uprzednim ogoleniu sierści na zaplanowanym miejscu golarką elektryczną. Do skaryfikacji użyto skalpela, za pomocą którego usunięto z grzbietu cienką warstwę naskórka i skóry właściwej o grubości 0,3 mm–0,5 mm (do poziomu *panniculus carnosus*) oraz powierzchni 1,5 cm×2,5 cm [16–18]. Pobrano także wycinki z brzeźnych fragmentów odciętej zdrowej skóry, które następnie umieszczono w formalinie. W celu bezinwazyjnego odczytu ukrwienia oraz wykonania pomiarów planimetrycznych rany, zwierzęta poddano analizie w obiektywie kamery termowizyjnej. W każdej grupie rany zostały dodatkowo powierzchniowo ostrzyknięte 0,2 ml roztworu lipopolisacharydu otrzymanego z *Pseudomonas aeruginosa* (firmy Sigma-Aldrich), o stężeniu 5 mg/ml, dla wytworzenia przewlekłego stanu zapalnego [19]. Ubytki zabezpieczono nowoczesnym opatrunkiem aktywnym (piankowym) Allevyn™ Adhesive 5×5 cm (Smith&Nephew), a następnie bandażem ograniczającym ryzyko przesunięcia się opatrunku (opaska Mollelast® haft 4 cm×4 m, Lohmann&Rauscher). Opaskę Mollelast® haft założono sposobem ósemkowym wokół kończyn górnych i ¼ górnych tułowia. Bandaż nacinano w newralgicznych miejscach (wokół stawu ramiennego) narażonych na powikłania kompresji (niedokrwienie, ostra neuropatia), tworząc swoisty rękaw. Miejsca zakończenia opaski zabezpieczano przylepcem. Przez kolejne 21 dni kontynuowano pomiary glikemii oraz podawano insulinę (grupa I) lub sól fizjologiczną (grupa II).

Opatrunki zabezpieczające zmieniano co trzy dni. W tych dniach pobierano kolejne wycinki z obrzeża ubytku, a także przeprowadzano jego ocenę przy użyciu kamery termowizyjnej. Rejestrowała ona rany z odległości 15 cm na specjalnie do tego celu przygotowanym statywie.

Do badań wykorzystano kamerę pracującą w bliskiej podczerwieni od 0,8 μ m do 2,5 μ m. Skorzystano z układów oświetlających z diodami LED, emitujących promieniowanie od 800 nm do 930 nm. Zakres ten nie interferuje z innymi urządzeniami oraz jest bezpieczny dla obiektów żywych [20, 21].

Wycinki z obrzeża rany zebrane podczas badania zostały ocenione pod względem histologicznym. Materiał biopsyjny utrwalono w roztworze 2% formaldehydu i poddano standardowej procedurze, tj. preparaty o grubości 10 μ m barwiono hematoksyliną i eozyną, a następnie oceniano w mikroskopie świetlnym przy powiększeniu 100- i 400-krotnym.

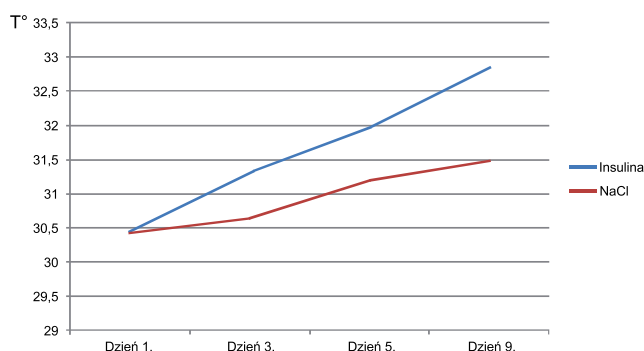
! Artykuł jest dostępny na zasadzie dozwolonego użytku osobistego. Dalsze rozpowszechnianie (w tym umieszczanie w sieci) jest zabronione i stanowi poważne naruszenie przepisów prawa autorskiego oraz grozi sankcjami prawnymi.



Ryc. 1. Proces gojenia rany u szczura leczonego insuliną (grupa I).



Ryc. 2. Proces gojenia rany u szczura z grupy kontrolnej.



Ryc. 3. Zmiana temperatur na powierzchni rany.

WYNIKI

Po wywołaniu cukrzycy u szczurów obserwowano zwiększone zapotrzebowanie na wodę, wzrost spożycia paszy, większe wydalanie moczu, a także stopniowy spadek progu czucia bodźca mechanicznego: o 14,73%±1,3 w 7. dniu od podania streptozotocyny, o 39,10%±1,1 w 14. dniu, 42,09%±1,0 w 21. dniu oraz 42,95%±1,4 w 28. dniu w stosunku do wartości wyjściowych (przed wywołaniem cukrzycy).

U szczurów obserwowano również stopniowy wzrost poziomu glukozy we krwi. Po 28 dniach od podania streptozotocyny średnie wartości glikemii w poszczególnych grupach ustabilizowały się i wynosiły: 349,8±12,2 (grupa I – otrzymująca insulinę) i 343,2±12,9 (grupa II – kontrola).

Po rozpoczęciu podawania insuliny w grupie I obserwowano stopniowy spadek poziomu glikemii (w porównaniu do grupy kontrolnej). Średnie stężenia glukozy wynosiły odpowiednio dla grupy I i grupy II:

- w 7. dobie od wdrożenia podaży insuliny – 285,6±12,8 i 346,6±8,7;
- w 14. dobie – 216,8±9,8 i 344,4±14,5;
- w 21. dobie – 120,4±9,2 i 339,8±9,7.

Następnie w grupie otrzymującej insulinę (grupa I) wartości utrzymywały się na podobnym poziomie (tj. około 120 mg/dl), który był znacznie niższy niż wartości glikemii w grupie kontrolnej (średnio 340 mg/dl).

W celu oceny stopnia gojenia rany brano pod uwagę wielkość ubytku (pole powierzchni), temperaturę na jej powierzchni i obrzeżu oraz makroskopowo widoczne cechy stanu zapalnego.

Na Ryc. 1 i 2 przedstawiono makroskopowy wygląd ran wybranych szczurów z grupy I i II. Zaobserwowano, że u zwierząt leczonych insuliną, pomimo początkowego powiększenia powierzchni rany, w dalszym okresie nastąpiło jej szybsze (w porównaniu do grupy kontrolnej) gojenie. W konsekwencji podczas ostatniego pomiaru wielkość ubytku okazała się najmniejsza. Średnia powierzchnia rany w grupie I w 12. dniu od jej wytworzenia wynosiła 3808 pikseli (px), a w grupie II – 13104 px. Procentowy stosunek powierzchni końcowej rany do początkowej w grupie I wyniósł 8%, a w grupie II – 23%. Szczegółowe wyniki analizy dynamiki zmian powierzchni ran przedstawiono w Tabeli 1. Analiza termograficzna wykazała, że temperatura na powierzchni ubytku ulegała zmianom w trakcie procesu gojenia. Pod koniec badania wykazano, że u zwierząt otrzymujących insulinę temperatura w obrębie rany była wyższa o 1,37°C w stosunku do temperatury w grupie kontrolnej (Ryc. 3).

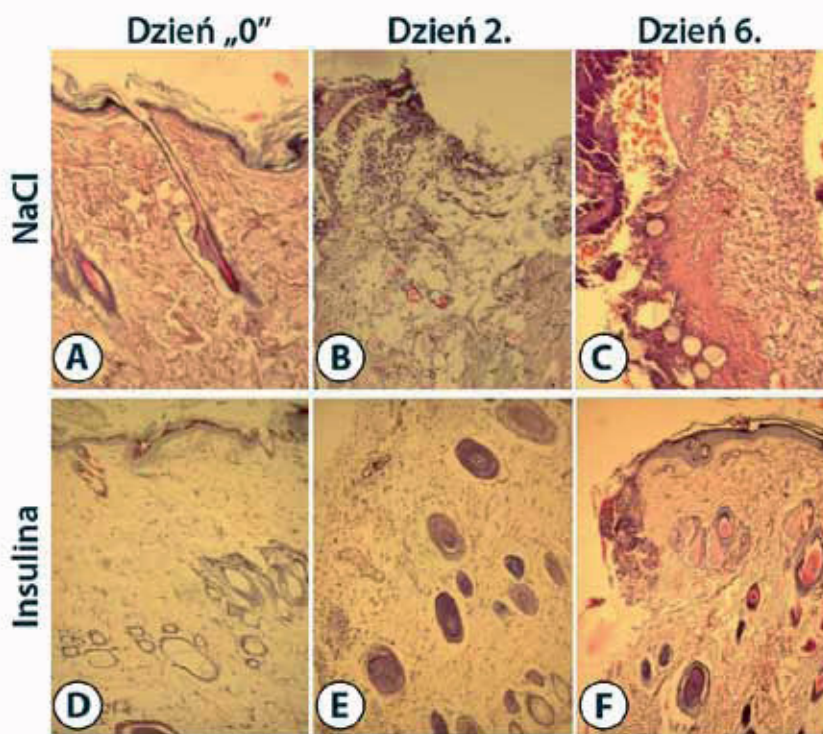
Rany oceniane makroskopowo różniły się szybkością ustępowania cech stanu zapalnego (Ryc. 4, 5). Biopsje pobrane w pierwszym dniu (biopsja kontrolna) wykazywały

! Artykuł jest dostępny na zasadzie dozwolonego użytku osobistego. Dalsze rozpowszechnianie (w tym umieszczanie w sieci) jest zabronione i stanowi poważne naruszenie przepisów prawa autorskiego oraz grozi sankcjami prawnymi.

Tabela 1. Obserwacja zmian powierzchni ran w pikselach (px).

Powierzchnia (px)	Dzień 1. (wytworzenie rany)	Dzień 3.	Dzień 5.	Dzień 9.	Dzień 12.	Stosunek powierzchni rany po leczeniu do powierzchni początkowej rany
Insulina	47328	53010	14442	9052	3808	0,08
0,9% NaCl	57330	34322	33280	18275	13104	0,23

Ryc. 4. Wyniki badań histologicznych szczurów z grupy leczonej insuliną i z grupy kontrolnej, barwienie H+E.



prawidłowy histologiczny obraz skóry i tkanki podskórnej (Ryc. 4A, 4D oraz Ryc. 5A). Nie stwierdzono istotnych różnic nasilenia cech stanu zapalnego pomiędzy badanymi grupami zwierząt.

W grupie kontrolnej (otrzymującej roztwór 0,9% NaCl) w preparatach biopsyjnych, pobranych w drugim dniu po wytworzeniu rany doświadczalnej, zaobserwowano wyraźne nacieki zapalne, złożone głównie z granulocytów obojętnochłonnych i makrofagów (Ryc. 4B). Umiarkowany, lecz o mniejszej intensywności naciek, stwierdzono w preparatach biopsji pochodzących od zwierząt otrzymujących insulinę (Ryc. 4E).

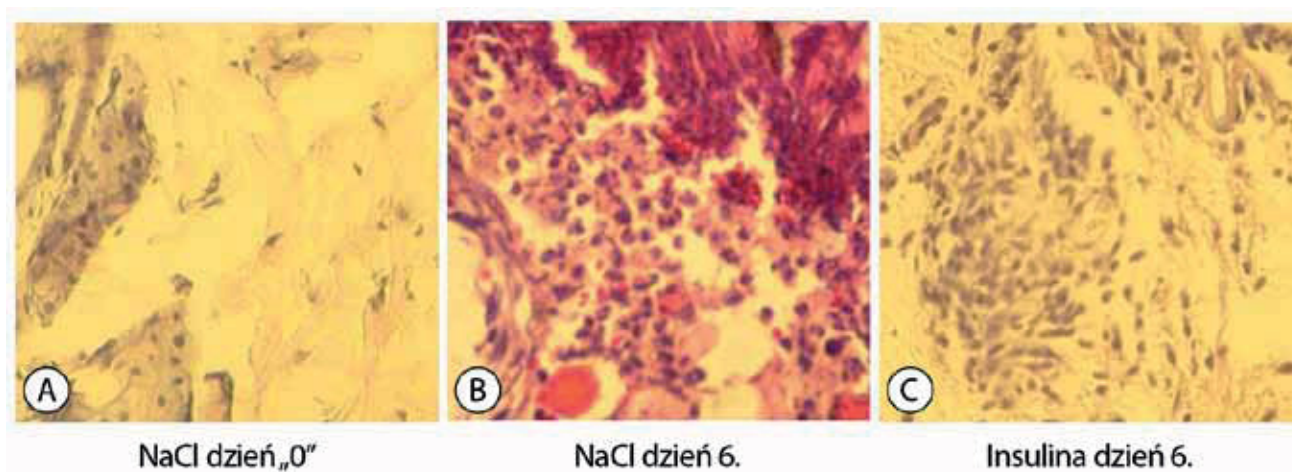
Analiza materiału biopsyjnego, pobranego w 7. dniu po wytworzeniu rany doświadczalnej w grupie kontrolnej, wykazała masywne nacieki granulocytów i makrofagów, obejmujące całą objętość ocenianych preparatów (Ryc. 4C i Ryc. 5B). W preparatach pochodzących z biopsji ran zwierząt z grupy otrzymującej insulinę zaobserwowano jedynie niewielki naciek komórek zapalnych, występujący głównie w bezpośrednim sąsiedztwie brzegów gojącej się rany (Ryc. 4F i Ryc. 5C).

OMÓWIENIE

Leczenie ran stanowi obecnie poważny problem medyczny. Wprowadzenie skuteczniejszej farmakoterapii jest możliwe po uprzednim lepszym poznaniu mechanizmów towarzyszących rozwojowi ran, w oparciu o odpowiednio opracowane modele zwierzęce. W piśmiennictwie przedstawiono różne modele eksperymentalne wywoływania ran u szczurów, niestety większość z nich dotyczy ran ostrych [5, 6]. Obecnie nie jest dostępny uniwersalny model rany przewlekłej. Prawdopodobnie jest to związane z dużą ilością czynników, które mogą przyczyniać się do jej wywołania. Według Davidsona i wsp. należą do nich: zaburzenia perfuzji tkankowej, niewłaściwe odżywianie, wiek, ograniczona aktywność fizyczna oraz przewlekłe niewyrównanie metaboliczne [5].

Rany pojawiające się w przebiegu cukrzycy są najczęstszą przyczyną amputacji kończyn dolnych u ludzi, dlatego w badaniu własnym postanowiono stworzyć model możliwie jak najlepiej odzwierciedlający przewlekłe rany występujące w tym schorzeniu. Ponieważ w praktyce klinicznej rany wywołane podwyższonym stężeniem glukozy we krwi

! Artykuł jest dostępny na zasadzie dozwolonego użytku osobistego. Dalsze rozpowszechnianie (w tym umieszczanie w sieci) jest zabronione i stanowi poważne naruszenie przepisów prawa autorskiego oraz grozi sankcjami prawnymi.



Ryc. 5. Wyniki badań histologicznych szczurów z grupy leczonej insuliną i z grupy kontrolnej, barwienie H+E. Część 2.

często ulegają nadkażeniu, w opracowywanym modelu eksperymentalnym zdecydowano się wywołać przewlekły stan zapalny za pomocą lipopolisacharydu bakteryjnego [19].

Wyniki wstępnego pilotażowego doświadczenia pokazują kierunek dalszych prac nad stworzeniem nowego modelu ran przewlekłych w cukrzycy oraz nad wpływem insuliny na proces ich gojenia.

W oparciu o dane dostępne w piśmiennictwie oraz doświadczenia własne, w celu uzyskania średnio ciężkiej cukrzycy zdecydowano się na jednorazowe podanie szczurom streptozotocyny [12, 22, 23].

Po uszkodzeniu części endokrynej trzustki obserwowano wzrost glikemii, któremu już od czwartego dnia badania towarzyszyło pojawienie się hiperalgezji świadczącej o rozwoju neuropatii. Zaobserwowanie rozwoju neuropatii u szczurów doświadczalnych wydaje się istotne, ponieważ uszkodzenia nerwów są jedną z przyczyn powstawania ran u ludzi. Jednak u pacjentów rozwój cukrzycy, zwłaszcza typu 2. wraz z towarzyszącą jej neuropatią, często przebiega bezobjawowo, co przyczynia się do tego, że w chwili wykrycia uszkodzenia nerwów niemożliwe jest już cofnięcie tego procesu. Jest to jedna z podstawowych przyczyn powstawania zespołu stopy cukrzycowej (ZSC).

W badaniach własnych w trakcie gojenia ran zwierząt dokonywano zmian opatrunku nową metodą opracowaną specjalnie na potrzeby doświadczenia, a także w sposób wystandaryzowany pobierano wycinki z ran. Badania wykazały, że proces gojenia u szczurów przebiega szybciej niż u ludzi (dwa tygodnie), mimo hiperglikemii utrzymującej się w grupie kontrolnej. Warto zwrócić uwagę, że u człowieka – w zależności od stopnia nasilenia zaburzeń metabolicznych – proces gojenia ran może trwać wiele miesięcy, a nawet lat.

Kolejnym elementem w opracowywanym modelu eksperymentalnym, odzwierciedlającym procedury stosowane w praktyce klinicznej, był sposób pobierania wycinków

z rany oraz jej zaopatrywanie. W celu dokładnej oceny wycinków uzyskiwanych w poszczególnych fazach gojenia rany użyto atraumatyzujących opatrunków, które w minimalnym stopniu przylegały do uszkodzenia (opatrunki piankowe bez zawartości jonów srebra Allevyn™ Adhesive z zewnętrzną warstwą klejącą, która pokrywała skórę nieobjętą owrzodzeniem). Podczas kolejnych zmian opatrunków możliwa była zarówno dokładna ocena makroskopowa (w tym przeprowadzenie pomiarów antropometrycznych), jak i pobranie wystandaryzowanych próbek tkankowych do badania histologicznego. Obraz, uzyskany po zabarwieniu skrawków i ich ocenie pod mikroskopem, nasuwa wniosek o szybszym ustępowaniu nacieku zapalnego u szczurów z grupy leczonej insuliną w porównaniu z grupą kontrolną.

Problemem, który z reguły pojawia się w badaniach przeprowadzanych na grupie gryzoni, jest duża aktywność ruchowa tych zwierząt, przekładająca się na trudności w utrzymaniu zabezpieczenia rany (opatrunku). Jest to element niezbędny w celu standaryzacji warunków gojenia. Dla uzyskania takich warunków w doświadczeniu zaprezentowanym w niniejszej pracy, jako ochronę opatrunku piankowego, zastosowano elastyczną opaskę podtrzymującą Molllelast® haft. Cechuje się ona gładkim przyleganiem do opatrunku aktywnego, a jednocześnie nie powoduje nadmiernego ucisku (szczególnie w obszarach powierzchni stawowych). Warto podkreślić, że są to nowoczesne opatrunki stosowane obecnie u ludzi.

Kolejnym elementem wyróżniającym metodykę zaprezentowanego badania jest zastosowanie nowoczesnych sposobów monitorowania procesu gojenia rany. W niniejszej pracy w celu obserwacji gojenia ubytku wykorzystano termowizję. Technika ta łączy w sobie dwie właściwości: z jednej strony umożliwia bardzo dokładną ocenę pola powierzchni rany, natomiast z drugiej pozwala na analizę rozkładu temperatury na powierzchni ubytku i w jego otoczeniu. Warto zwrócić uwagę, że w obrębie rany dochodzi

! Artykuł jest dostępny na zasadzie dozwolonego użytku osobistego. Dalsze rozpowszechnianie (w tym umieszczanie w sieci) jest zabronione i stanowi poważne naruszenie przepisów prawa autorskiego oraz grozi sankcjami prawnymi.

do obniżenia temperatury, co jest związane z większą utratą ciepła z tkanek niepokrytych skórą. Zatem wzrost temperatury przekładający się na mniejszy ubytek promieniowania cieplnego poprzez zdrową skórę zwierzęcia świadczy pośrednio o szybkości gojenia. Cechą wyróżniającą diagnostykę termograficzną od innych stosowanych powszechnie metod diagnostyki (ultrasonografia, rentgenodiagnostyka, scyntygrafia itp.) jest całkowity brak ingerencji w organizm zwierzęcia. Kamera termowizyjna rejestruje jedynie naturalne promieniowanie podczerwone emitowane przez ciało pacjenta, jest ono proporcjonalne do ciepłoty ciała. Ograniczeniem tej metody jest możliwość bezpośredniej obserwacji zmian temperatury tylko na powierzchni rany, co w przypadku doświadczenia zaprezentowanego w niniejszej pracy było wystarczające. Porównując zmiany lokalnych rozkładów temperatury na powierzchni rany i w jej sąsiedztwie oraz wartości temperatur pozornych w tych obszarach, można skutecznie wnioskować o stanie ubytku.

W przeprowadzonym badaniu wykazano spadek temperatury badanej na powierzchniach generowanych ran w porównaniu z tkankami je otaczającymi. Obserwacja ta nie jest zaskoczeniem, ponieważ – tak jak wspomniano – w miejscach pozbawionych skóry (w porównaniu z obszarami pokrytymi jej warstwą) dochodzi do zwiększonego parowania.

Dane dostępne w piśmiennictwie wskazują, że warunkiem prawidłowego procesu gojenia rany w przypadku cukrzycy jest uzyskanie normoglikemii. Nasuwa się jednak pytanie, czy wymóg ten spełnia jedynie insulinoterapia. W warunkach klinicznych postępowanie takie dotyczy szczególnie chorych w ciężkich stanach, ponadto insulinoterapia jest zalecana w przypadku upośledzenia funkcji narządów metabolizujących leki, takich jak nerka lub wątroba.

Obserwacje zaprezentowane w niniejszej pracy potwierdzają związek między lepszym wyrównaniem metabolicznym a szybszym procesem gojenia ran w cukrzycy, co odnotowywano już w badaniach innych autorów [9]. Christman i wsp. w latach 2004–2010 obserwowali gojenie ran u 183 pacjentów z cukrzycą podczas kolejnych wizyt kontrolnych i porównywali je z laboratoryjnymi parametrami wyrównania glikemii oraz stopniem neuropatii. Osoby, u których średni odsetek HbA1c wynosił 5,6%, uzyskiwały współczynnik gojenia rany 0,35 cm²/dzień (z czasem całkowitego zamknięcia rany około 64 dni od czasu pierwszej wizyty), podczas gdy u pacjentów z wysokim odsetkiem HbA1c (średnio 11,1%) nawet po 727 dniach nie dochodziło do wygojenia ubytku. Wyniki badań własnych wydają się potwierdzać, że obniżenie glikemii poprzez przewlekle podawanie insuliny przyspiesza szybkość gojenia ran (w stosunku do grupy przyjmującej placebo).

Nasuwa się jednak pytanie, czy gojące działanie insuliny jest związane jedynie z jej właściwościami obniżającymi stężenie glukozy we krwi, czy także z dodatkowym mechanizmem działania. Dane zaprezentowane w piśmiennictwie

dowodzą, że insulina może pełnić neurotroficzną funkcję, m.in.: stymuluje odrost neurytów, jest włączona w regenerację obwodowych nerwów oraz jest niezbędna do przeżycia neuronów współczulnych [24, 25]. Wyjaśnienie mechanizmu działania insuliny na gojenie ran jest przedmiotem dalszych badań Autorów niniejszej pracy.

WNIOSKI

Badanie pilotażowe wskazuje, że zaproponowany przez Autorów model gojenia rany przewlekłej u szczurów z cukrzycą streptozotocynową może w przyszłości stać się powszechnie wykorzystywanym narzędziem badawczym. Standaryzacja metod tworzenia rany (wprowadzenie lipopolisacharydu bakteryjnego, zastosowanie specjalistycznych opatrunków aktywnych, atraumatyczna metoda zamocowania opatrunku) oraz sposób oceny stopnia jej gojenia (termografia) są zbliżone do warunków gojenia i zabezpieczania rany w praktyce klinicznej.

KONFLIKT INTERESÓW: nie zgłoszono.

DEKLARACJA PRZEJRZYŚCISCI: Na przeprowadzenie badania uzyskano zgodę II Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach w Warszawie.

PIŚMIENNICTWO

- Davidson JM, DiPietro L. The wound-healing process. In: Veves A, Giurini JM, LoGerfo FW (eds). *The Diabetic Foot*. 2nd edn. Humana Press, New Jersey, USA, 2006.
- Lipsky BA, Berendt AR, Deery HG et al. Diagnosis and treatment of diabetic foot infections. *IDSA Guidelines*. *Clin Infect Dis* 2004;39:885–910.
- Frykberg RG, Zgonis T, Armstrong DG et al. Diabetic foot disorders. A clinical practice guidelines (2006 revision). *J Foot Ankle Surg* 2006;45(Suppl. 5):S1–S66.
- Hong JP, Park SW. The combined effect of recombinant human epidermal growth factor and erythropoietin on full-thickness wound healing in diabetic rat model. *Int Wound J* 2014;11(4):373–378.
- Davidson JM. Animal models for wound repair. *Arch Dermatol Res* 1998;290(Suppl.):S1–S11.
- Dorsett-Martin WA. Rat models of skin wound healing: a review. *Wound Repair Regen* 2004;12(6):591–599.
- Cross SE, Naylor IL, Coleman RA, Teo TC. An experimental model to investigate the dynamics of wound contraction. *Br J Plast Surg* 1995;48(4):189–197.
- Tuvdendorj D, Zhang XJ, Chinkes DL et al. Intensive insulin treatment increases donor site wound protein synthesis in burn patients. *Surgery* 2011;149(4):512–528.
- Christman AL, Selvin E, Margolis DJ, Lazarus GS, Garza LA. Hemoglobin A1c predicts healing rate in diabetic wounds. *J Invest Dermatol* 2011;131(10):2121–2127.
- Cook EA, Cook JJ, Henao M et al. The importance of sustained glycaemic control during wound healing. 140th APhA Annual Meeting and Exposition, 27–31 October 2012, San Francisco, USA. Abstract no. 189-OR.
- Collins N, Toiba R. The importance of glycaemic control in wound healing. *Ostomy Wound Manage* 2010;56(9):18–23.
- Nakhoda A, Wong HA. The induction of diabetes in rats by intramuscular administration of streptozotocin. *Experientia* 1979;35(12):1679–1680.
- Randall LO, Selitto JJ. A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1957;111(4):409–419.
- Pinheiro LS, Dutra de Melo A, Andreazzi AE, de Caires Júnior LC, Barros Costa M, González García RM. Protocol of insulin therapy for streptozotocin-diabetic rats based on a study of food ingestion and glycemic variation. *Scand J Lab Anim Sci* 2011;38(2):117–127.

! Artykuł jest dostępny na zasadzie dozwolonego użytku osobistego. Dalsze rozpowszechnianie (w tym umieszczanie w sieci) jest zabronione i stanowi poważne naruszenie przepisów prawa autorskiego oraz grozi sankcjami prawnymi.

15. Oztürk Y, Aydin S. Effects of streptozotocin-induced diabetes and insulin on calcium responsiveness of the rat vas deferens. *Life Sci* 2006;78(10):1084–1090.
16. Gottrup F, Agren MS, Karlsmark T. Models for use in wound healing research: a survey focusing on *in vitro* and *in vivo* adult soft tissue. *Wound Repair Regen* 2000;8(2):83–96.
17. Ngawhirunpat T, Hatanaka T, Katayama K, Yoshikawa H, Kawakami J, Adachi I. Changes in electrophysiological properties of rat skin with age. *Biol Pharm Bull* 2002;25(9):1192–1196.
18. Babaei S, Bayat M, Nouruzian M, Bayat M. Pentoxifylline improves cutaneous wound healing in streptozotocin-induced diabetic rats. *Eur J Pharmacol* 2013;700(1–3):165–172.
19. Takimoto K, Kawashima N, Suzuki N et al. Down-regulation of inflammatory mediator synthesis and infiltration of inflammatory cells by MMP-3 in experimentally induced rat pulpitis. *J Endod* 2014;40(9):1404–1409.
20. Jaworski Ł, Siondalski P, Jarmoszewicz K, Rogowski J. Arm temperature distribution in thermographic pictures after radial artery harvesting for coronary bypass operation. *Inter Cardiovasc Thorac Surg* 2007;6(5):598–602.
21. Pavlov I. Characterization of blood flow in different forms of diabetic foot syndrome. *Angiol Sosud Khir* 2005;11(3):21–25.
22. Bujalska M, Makulska-Nowak H. Bradykinin receptors antagonists and nitric oxide synthase inhibitors in vincristine and streptozotocin induced hyperalgesia in chemotherapy and diabetic neuropathy rat model. *Neuro Endocrinol Lett* 2009;30(1):144–152.
23. Bujalska M. Effect of cannabinoid receptor agonists on streptozotocin-induced hyperalgesia in diabetic neuropathy. *Pharmacology* 2008;82(3):193–200.
24. Sima AA, Zhang W. Mechanisms of diabetic neuropathy: axon dysfunction. In: Zochodne DW, Malik RA (eds). *Handbook of Clinical Neurology*. Vol. 126. Elsevier, 2014, pp. 429–442.
25. Vincent AM, Calabek B, Roberts L, Feldman EL. Biology of diabetic neuropathy. In: Said G, Krarup C (eds). *Handbook of Clinical Neurology*. Vol. 115. Elsevier, 2013, pp. 591–606.