

lek. Mateusz Mieczkowski

**Translacja wyników badań nad zwierzęcymi modelami ran na ich
zastosowanie w praktyce klinicznej gojenia ran u pacjentów z
cukrzycą**

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

Promotor: dr hab. n. med. Beata Mrozikiewicz-Rakowska

Klinika Diabetologii i Chorób Wewnętrznych

Warszawski Uniwersytet Medyczny



Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Dyscypliny Nauk Medycznych

Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Warszawa, 2022 r.

Słowa kluczowe: model zwierzęcy rany przewlekłej; cukrzyca; insulina; metformina; neuropatia

Key words: animal model of chronic wound; diabetes mellitus; insulin; metformin; neuropathy

Badania wchodzące w skład niniejszej pracy doktorskiej zostały przeprowadzone w ramach projektu badawczego pt. *Wpływ zastosowania różnych modeli leczenia przeciwcukrzycowego na proces gojenia ran u szczurów z cukrzycą indukowaną streptozotocyną – ocena immunohistochemiczna* sfinansowanego z Mini Grantu Studenckiego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego przyznanego w 2015 r.

Kierownik projektu:

lek. Mateusz Mieczkowski

Opiekunowie projektu:

dr hab. n. med. Beata Mrozikiewicz-Rakowska

prof. dr hab. n. med. Leszek Czupryniak

Najserdeczniejsze podziękowania składam:

Pani dr hab. n. med. Beacie Mrozikiewicz-Rakowskiej za wspaniałą opiekę promotorską, wsparcie w procesie rozwoju, cierpliwość oraz życzliwość.

Panu Profesorowi Leszkowi Czupryniakowi za wsparcie merytoryczne, możliwość przeprowadzenia projektów badawczych.

Współautorom artykułów składających się na niniejszy cykl publikacji za zaangażowanie oraz czas poświęcony projektom badawczym.

Żonie i Rodzicom za nieustające wsparcie, zrozumienie i nieocenioną pomoc.

Wykaz wszystkich publikacji

Rodzaj publikacji	Liczba	Impact Factor	Punktacja MEiN
Prace włączone do rozprawy doktorskiej	3	9,457	246
Prace, które nie zostały włączone do rozprawy doktorskiej	5		101
Razem	8	9,457	347

Wykaz publikacji stanowiących pracę doktorską:

1. **Nowy model ran przewlekłych w cukrzycy – badanie pilotażowe u szczurów rasy Wistar.**

Mrozikiewicz-Rakowska Beata , Mieczkowski Mateusz , Siwko Tomasz , Bujalska-Zadrozny Magdalena Izabela, de Corde Anna, Gąsińska Emilia , Duda Kamila, Grzela Tomasz , Krejner Alicja , Dulski Rafał, Piątkowski Tadeusz , Nowak Adrianna, Krzymień Janusz; Leczenie Ran; 2015;
Praca oryginalna (MEiN: 6)

2. **Insulin, but Not Metformin, Supports Wound Healing Process in Rats with Streptozotocin-Induced Diabetes.**

Mieczkowski Mateusz, Mrozikiewicz-Rakowska Beata , Siwko Tomasz , Bujalska-Zadrozny Magdalena Izabela, De Cordé-Skurska Anna Elżbieta, Wolińska Renata , Gąsińska Emilia , Grzela Tomasz , Foltyński Piotr , Kowara Michał , Mieczkowska Zofia , Czupryniak Leszek; Diabetes Metabolic Syndrome and Obesity-Targets and Therapy; 2021
Praca oryginalna (IF= 3,249 MEiN: 100)

3. **The Problem of Wound Healing in Diabetes—From Molecular Pathways to the Design of an Animal Model.**

Mieczkowski Mateusz , Mrozikiewicz-Rakowska Beata , Kowara Michał , Kleibert Marcin , Czupryniak Leszek; International Journal of Molecular Sciences; 2022.
Praca oryginalna (IF= 6,208 MEiN: 140)

Łączny Impact Factor: 9,457

Łączna punktacja MEiN: 246

Spis treści

1.	Wykaz zastosowanych skrótów	8
2.	Streszczenie w języku polskim	9
3.	Streszczenie w języku angielskim	14
4.	Wstęp uzasadniający połączenie wskazanych publikacji w jeden cykl oraz komentujący osiągnięcia naukowe na tle dotychczasowego stanu wiedzy	18
5.	Założenia i cel pracy	26
6.	Kopie opublikowanych prac	27
6.1.	Nowy Model Ran Przewlekłych w cukrzycy – Badanie Pilotażowe u Szczurów Rasy Wistar.	27
6.2.	Insulin, but Not Metformin, Supports Wound Healing Process in Rats with Streptozotocin-Induced Diabetes	34
6.3.	The Problem of Wound Healing in Diabetes – From Molecular Pathways to the Design of an Animal Model	47
7.	Zakończenie	68
7.1.	Podsumowanie	68
7.2.	Wnioski	70
8.	Bibliografia	71
9.	Opinia Komisji Bioetycznej	76
10.	Oświadczenia współautorów	79

1. Wykaz zastosowanych skrótów

AGE	późne produkty glikacji (ang. <i>advanced glycation endproducts</i>)
AMP/ATP	adenozyno-5'-monofosforan/adenozyno-5'-trifosforan (ang. <i>5`-adenosine monophosphate / 5`-adenosine triphosphate</i>)
ASIC3	kanał jonowy zależny od kwasowości typu 3 (ang. <i>acid-sensing ion channel-3</i>)
CGRP	peptyd pochodny genu kalcytoniny (ang. <i>calcitonin gene-related peptide</i>)
DAC	diacyloglicerol (ang. <i>diacyloglicerole</i>)
DPP-4	dipeptydylo-peptydaza 4 (ang. <i>dipeptidyl peptidase-4</i>)
GLUT1/ GLUT 2	białko transportera glukozy 1 / białko transportera glukozy 2 (ang. <i>glucose transporter-1 / glucose transporter-2</i>)
HbA1c	hemoglobina glikowana (ang. <i>glycated hemoglobin</i>)
H+E	barwienie hematoksyliną i eozyną (ang. <i>staining with hematoxylin and eosin</i>)
ICAM-1	międzykomórkowa molekula adhezyjna-1 (ang. <i>intercellular adhesion molecule-1</i>)
IGF-1	insulinopodobny czynnik wzrostu-1 (ang. <i>insulin-like growth factor 1</i>)
TRPV1	receptor waniloidowy typu 1 (ang. <i>transient receptor potential vanilloid type 1</i>)
NA	nikotynamid (ang. <i>nicotinamide</i>)
NADPH	zredukowana forma fosforanu dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (ang. <i>nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>)
NO	tlenek azotu (ang. <i>nitric oxide</i>)
Insulina NPH	insulina izofanowa (ang. <i>insulin neutral protamin Hagedorn</i>)
PI3K/Akt	szlak sygnałowy kinazy 3-fosfatydyloinozytolu i kinazy białkowej AKT (ang. <i>phosphatidylinositol 3-kinase and AKT protein kinase pathway</i>)
PKC/ PKA	kinaza białkowa C/ kinaza białkowa A (ang. <i>protein C kinase / protein A kinase</i>)
px	piksel (ang. <i>pixel</i>)
RAGE	receptor dla produktów późnej glikacji (ang. <i>receptor for advanced glycation endproducts</i>)
SGLT2	kotransporter glukozowo-sodowy 2 (ang. <i>sodium-glucose cotransporter-2</i>)
STZ	streptozotocyna (ang. <i>streptozotocin</i>)
T1DM	cukrzyca typu 1 (ang. <i>type 1 diabetes mellitus</i>)
T2DM	cukrzyca typu 2 (ang. <i>type 2 diabetes mellitus</i>)

2. Streszczenie w języku polskim

Tytuł: Translacja wyników badań nad zwierzęcymi modelami ran na ich zastosowanie w praktyce klinicznej gojenia ran u pacjentów z cukrzycą

Wstęp

W dobie starzenia się populacji problem leczenia trudno gojących się ran nabiera coraz większego znaczenia klinicznego. Generatorem opóźnionego procesu gojenia tkanek są wszystkie choroby, u podłoża których leży zmniejszenie utlenowania tkanek, zarówno na poziomie mikrokrążenia, jak i w łożysku dużych naczyń krwionośnych. Wiodącą jednostką chorobową wikłającą gojenie ran jest cukrzyca. Badania podstawowe kierowane są na poszukiwania zarówno cząsteczek, jak i metod optymalizujących proces gojenia ran, związanych szczególnie z wieloletnim niewyrównanym przebiegiem cukrzycy. Istotą takich terapii jest minimalizacja ryzyka zakażenia tkanek poprzez zmniejszenie wielkości owrzodzeń, a zatem wpływ na proces ich regeneracji. Rana bez cech zakażenia to mniejsze ryzyko takich powikłań jak sepsa, z możliwością zgonu włącznie. Utrzymywanie się cech infekcji to ryzyko potencjalnie nieodwracalnej utraty nie tylko stopy, ale także całej kończyny dolnej, w wyniku ich martwicy. Jednak zanim nowe formy terapii będą mogły być zastosowane u ludzi, niezbędne są badania kliniczne powstałe w oparciu o właściwie opracowane modele zwierzęce.

Celem badań wchodzących w skład niniejszej rozprawy doktorskiej było stworzenie eksperymentalnego modelu zwierzęcego rany przewlekłej. Kolejne badania pozwoliły na uzyskanie warunków możliwie jak najwierniej odzwierciedlających zmiany patofizjologiczne obecne w tkankach pacjentów poddanych wpływowi hiperglikemii. Po wytworzeniu takiego modelu dokonano oceny wpływu dwóch form terapeutycznych na efektywność gojenia ran u zwierząt doświadczalnych.

Prace nr 1 i 2 niniejszej rozprawy mają charakter oryginalny i zostały przeprowadzone po dogłębnej analizie dostępnego piśmiennictwa w zakresie projektowania badań na modelach zwierzęcych. Pierwsza praca stanowi opis badania pilotażowego z zaproponowanym autorskim modelem gojenia ran przewlekłych u szczurów rasy Wistar, u których wytworzono cukrzycę za pomocą streptozotocyny (STZ). Druga praca powstała na bazie wniosków wynikających z doświadczeń opisanych w pierwszej pracy. W drugiej pracy uporządkowano wnioski z badania pierwszego, modyfikując pierwotnie stworzony zwierzęcy model rany przewlekłej oraz

zastosowano dwie odrębne cząsteczki przeciwcukrzycowe celem porównania ich wpływu na sam proces gojenia rany, a więc wykorzystujące działania pozahipoglikemizujące leków rutynowo stosowanych w terapii cukrzycy *per se*. Podsumowaniem zebranych doświadczeń jest trzecia praca, która ma charakter poglądowy. Uwagi zawarte w pracy stanowią drogowskaz dla badaczy, którzy będą oceniali skuteczność nowych leków bazując na zwierzęcym modelu rany z towarzyszącą cukrzycą.

Materialy i Metody

Badania opisywane w pracach 1 i 2 przeprowadzono po uzyskaniu zgody II Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach w Warszawie. Badania przeprowadzono we współpracy z Zakładem Farmakologii Doświadczalnej i Klinicznej WUM. W obu przeprowadzonych badaniach wykorzystano szczury rasy Wistar, płci męskiej, o masie ciała około 300 g (+/-30g).

Badanie nr 1 było badaniem pilotażowym. Jego celem było uzyskanie średnio-ciężkiej cukrzycy z jednoczesną stwierdzoną obecnością neuropatii, co miało imitować warunki analogiczne do tych, jakie można zaobserwować u osób z wieloletnią, niewyrównaną cukrzycą. Protokół badania zakładał ostateczne przygotowanie takiego modelu, który mógłby w przyszłości być wzorem dla różnych badań oceniających skuteczność nowych cząsteczek w leczeniu trudno gojących się ran w cukrzycy. Dotyczy to zarówno cząsteczek podawanych ogólnoustrojowo, jak i miejscowo do łożyska rany. Celem wywołania cukrzycy zwierzęta otrzymywały domięśniowo streptozotocynę (STZ) w dawce 35 - 38mg/kg masy ciała. Obecność oraz rozwój neuropatii oceniano odpowiednio po 7., 14., 21. i 28. dniu od podania STZ, uzyskując po tym okresie średnią redukcję antynocycepcji w zakresie 43,6 – 44% w stosunku do wartości wyjściowych. Do właściwego etapu badania pilotażowego wybrano 14 osobników, które utrzymywały glikemie w zakresie 250-350 mg/dl. Zwierzęta te podzielono na dwie grupy. Grupa I otrzymywała podskórne iniekcje insuliny NPH (neutral protamin Hagedorn) w dawce 5 j.m./kg masy ciała, natomiast grupa II (grupa kontrolna) otrzymywała iniekcje soli fizjologicznej (0.9% NaCl). Po 21 dniach stabilizacji glikemii w grupie I (glikemie w zakresie 80-150 mg/dl), w obydwu grupach dokonywano wytworzenia powierzchownej rany. Za pomocą skalpela usuwano z grzbietu cienką warstwę naskórka oraz skóry właściwej o wymiarach 1,5 cm x 2,5 cm, następnie ostrzykiwano roztworem lipopolisacharydu uzyskanego z *Pseudomonas aeruginosa* o stężeniu 5mg/dl (celem imitacji warunków miejscowego stanu zapalnego) i ostatecznie ranę zabezpieczano za pomocą opatrunku. Opatrunki zmieniano co 3

dni celem dokonania pomiarów rany oraz pobierania wycinków z rany do oceny histopatologicznej.

Trudności między innymi w zakresie stabilizacji procesu gojenia rany w badaniu pierwszym, pilotażowym (opisane w Rozdziale 4., uzasadniającym połączenie opisywanych prac w cykl), stały się podstawą do modyfikacji protokołu badania drugiego. Badanie nr 2, przeprowadzono na grupie 200 szczurów rasy Wistar płci męskiej, chowu wsobnego, u których wywoływano cukrzycę metodą analogiczną jak w badaniu nr 1. W fazie wstępnej, służącej do określenia odpowiedniej dawki leków przeciwcukrzycowych, wykorzystano 120 szczurów. Założeniem było uzyskanie glikemii w przedziale 350-450 mg/dl. W ostatecznej fazie badania wykorzystano 45 osobników o najbardziej stabilnych glikemiach. Osobniki te podzielono na 3 grupy. W grupie I podawano dootrzewnowo insulinę ludzką NPH (5 j./kg m.c. raz dziennie), grupa II otrzymywała dożołądkowo metforminę (500 mg/kg m.c. raz dziennie), a grupa III (kontrolna) otrzymywała dootrzewnowo sól fizjologiczną (0.9% NaCl). Po 14 dniach leczenia przeciwcukrzycowego u szczurów dokonywano wytworzenia powierzchownej rany. Na grzbiecie szczurów wycinano cienką warstwę naskórka oraz skóry właściwej o wymiarach 2x2 cm i wszywano silikonowy krążek o średnicy 4 cm z otworem w środku w celu stabilizacji skóry i standaryzacji procesu gojenia. Celem monitorowania procesu gojenia rany co 3 dni dokonywano zarówno fotograficznej oceny wielkości rany, jak i pobierano biopsję z jej powierzchni. Proces gojenia się ran śledzono przez 9 dni. Próbkę biopsyjną poddawano barwieniu hematoksyliną i eozyną (H+E), a także przeprowadzano badania immunohistochemiczne w celu oceny ekspresji markera proliferacji - antygenu Ki67.

Wyniki

W pracy nr 1 zaobserwowano szybsze tempo gojenia rany u szczurów z grupy I otrzymującej insulinę. Średnia powierzchnia rany w 12. dniu po jej wytworzeniu w grupie I wynosiła 3808 px, natomiast w grupie II (kontrolnej) 13104 px, a procentowy stosunek powierzchni końcowej rany do początkowej wynosił odpowiednio w grupie I 8%, natomiast w grupie II – 23%. Analiza materiału biopsyjnego wykazała znacznie większe nagromadzenie komórek zapalnych oraz podwyższoną ekspresję miejscowego stanu zapalnego w grupie II (kontrolnej). W grupie I po pierwszych 3 dniach obserwowano przejściowe powiększenie powierzchni rany, czego nie obserwowano w grupie II. Wynik ten najprawdopodobniej był konsekwencją braku stabilizacji rany z uwagi na odmienny mechanizm gojenia ranu u szczurów (zjawisko kontrakcji mięśnia *panniculus carnosus*) w sposób umożliwiający idealne porównanie wyników w każdym momencie czasowym. Konsekwencji wpływu tego

mechanizmu na proces gojenia rany uniknięto w pracy nr 2 dzięki zastosowaniu opisywanych krążków silikonowych.

W pracy nr 2 średnie stężenia glukozy w badanych grupach po 30 dniach terapii insuliną lub metforminą oraz w grupie kontrolnej były podobne i mieściły się w przedziale 350-450 mg/dl, co odpowiadało zakładanemu celowi, jakim było odwzorowanie stanu niewyrównania metabolicznego cukrzycy. Takie przedziały glikemii utrzymywały się podczas całego procesu obserwacji gojenia rany, co było istotną modyfikacją w stosunku do pierwotnego modelu.

Średnie zmiany pola powierzchni rany (\pm odchylenie standardowe) wynosiły odpowiednio dla grupy I (insulina) -66,8% (\pm 9,7%), grupy II (metformina) -40,4% (\pm 15,8%) i grupy III (kontrolnej) -48,0% (\pm 9,8%). Testy post-hoc Scheffégo i Bonferroniego wykazały istotne różnice pomiędzy grupą I (insulina) a grupą II (metformina), przy $p < 0,002$ dla obu testów oraz pomiędzy grupą I (insulina) a grupą III (kontrolna), przy $p < 0,03$ dla obu testów. Nie odnotowano natomiast istotnych różnic pomiędzy grupą otrzymującą metforminę (grupa II) a grupą kontrolną (grupa III) ($p > 0,51$ dla obu testów). Dlatego najwyższy wskaźnik gojenia się ran dotyczył grupy insulinowej (grupa I).

Materiał biopsyjny pobrany od szczurów grupy I (leczonych insuliną) w analizie histopatologicznej wykazywał istotnie niższy poziom nacieku zapalnego aniżeli te uzyskane od szczurów leczonych metforminą (grupa II) oraz grupą kontrolną (grupa III). Ocena immunohistochemiczna wykazała największą gęstość ośrodków proliferacji (wyrażoną ekspresją markera proliferacji - antygeny Ki67) w grupie zwierząt leczonych insuliną (indeks proliferacyjny 27,5% vs 18%).

Wyniki badań 1 i 2 posłużyły do przygotowania pracy poglądowej (praca nr 3) podsumowującej dotychczasową wiedzę w zakresie przygotowania modelu zwierzęcego rany przewlekłej z towarzyszącą cukrzycą.

Wnioski

Autorzy poszukiwali powtarzalnego modelu rany przewlekłej w cukrzycy, który mógłby znaleźć zastosowanie w badaniu wpływu różnych cząsteczek farmakologicznych na efektywność gojenia ran. Cel ten został osiągnięty, a wyniki drugiego z przeprowadzonych badań wykazały przydatność, uniwersalność oraz powtarzalność zaprojektowanego modelu zwierzęcego rany przewlekłej. W badaniu tym udowodniono, że insulina istotnie bardziej pobudza proces proliferacji komórek w łożysku rany w stosunku do metforminy, czego dowodem była zwiększona ekspresja antygeny Ki67. Ponieważ badanie prowadzono w warunkach utrzymującej się na stałym poziomie hiperglikemii niezależnie od zastosowanych

cząsteczek, efekt zmniejszenia powierzchni rany nie był zależny od zmian wartości glikemii. Badanie dowodzi, że na proces gojenia ran w cukrzycy ma wpływ zastosowanie konkretnego leku przeciwcukrzycowego. Uzyskany materiał może stanowić początek rozważań dotyczących szerokiego wpływu leków przeciwcukrzycowych, w tym insuliny, na mechanizmy gojenia się ran w cukrzycy. Ustalenie tych mechanizmów oraz próba molekularnego wyjaśnienia zauważalnego przyspieszenia gojenia ran w warunkach hiperglikemii u chorych leczonych insuliną będzie celem kolejnego etapu naszych badań.

3. Streszczenie w języku angielskim

Title: Translation of the studies results on animal wound models into their application to the clinical practice of wound healing in patients with diabetes

Introduction

In an ageing population, the problem of treating hard-to-heal wounds is becoming increasingly clinically important. The generators of delayed tissue healing are all diseases with an underlying reduction in tissue oxygenation, both at the microvascular level and in the bed of large blood vessels. The leading disease entity complicating wound healing is diabetes. Basic research is directed towards the search for both molecules and methods to optimize the healing process in wounds associated particularly with long-term uncompensated diabetes. The essence of such therapies is to reduce the risk of tissue infection by decreasing the size of ulcerations and therefore influencing the regeneration process. A wound without infectious features also means a lower risk of complications, such as sepsis, including possible death. The persistence of infectious features is also a risk of potential irreversible loss not only of the foot, but also of the entire lower limb, as a result of necrosis. However, before new forms of therapy can be applied to humans, clinical trials based on properly developed animal models are required.

The aim of the research forming part of this dissertation was to create an experimental animal model of chronic wounds. The initially created model was then modified, obtaining conditions that reflected as closely as possible the pathophysiological changes present in the tissues of patients affected by hyperglycaemia. Once such a model had been produced, the impact of two different therapeutic models on wound healing efficacy was assessed.

Papers 1 and 2 of this dissertation are original and were designed after an in-depth analysis of the available literature on the design of animal model studies. The first paper is a description of a pilot study with the authors' proposed model of chronic wound healing in Wistar rats, in which diabetes was produced with streptozotocin. The second paper was based on the conclusions from the experiments described in the first paper. In the second paper, the conclusions of study 1 were structured by modifying the designed animal model of chronic wounds and two separate therapeutic regimens were used to compare their effects on the wound healing process itself, thus exploiting the non-hypoglycaemic effects of molecules routinely

used in diabetes therapy per se. The third paper summarizes the collected experience. The observations in the paper provide a signpost for researchers who will evaluate the efficacy of new molecules based on an animal model of wound healing with associated diabetes.

Materials and Methods

The studies described in papers 1 and 2 were carried out after obtaining approval from the 2nd Local Ethical Committee for Animal Experiments in Warsaw. The studies were conducted in collaboration with the Department of Experimental and Clinical Pharmacology, WUM. Both studies used Wistar rats, male, with out-bred characteristics, weighing approximately 300 g (+/-30g).

Study 1 was a pilot study. Its aim was to obtain moderately severe diabetes with concomitant established neuropathy to mimic analogous conditions in subjects with long-term, uncompensated diabetes. The study protocol was to ultimately prepare such a model, which could in future serve as a model for various studies evaluating the efficacy of different molecules with potential use in the treatment of difficult-to-heal wounds in diabetes. This includes molecules administered systemically as well as topically to the wound bed. In order to induce diabetes, animals received streptozotocin intramuscularly (dose 38mg/kg body weight). The presence and development of neuropathy was assessed 7, 14, 21 and 28 days after streptozotocin administration, respectively, with a mean reduction in antinociception of 43.6 - 44% from baseline. For the actual part of the pilot study, 14 individuals which maintained glycaemias in the range of 250-350 mg/dl were selected. These individuals were divided into two groups. Group I received subcutaneous injections of NPH insulin at a dose of 5 IU/kg, while group II (control group) received injections of saline (0.9% NaCl). After 21 days of glycaemic stabilization in group I (glycaemias in the range 80-150 mg/dl), a superficial wound was made in both groups. A thin layer of epidermis and dermis measuring 1.5 cm x 2.5 cm was removed from the dorsum using a scalpel, then injected with a 5mg/dl solution of lipopolysaccharide from *Pseudomonas aeruginosa* (to mimic local inflammatory conditions) and finally the wound was protected with a secondary dressing. Dressings were changed every three days in order to take wound measurements and wound biopsies for histopathological evaluation.

Difficulties in, among other things, stabilizing the wound healing process in the first, pilot study (described in Chapter 4, which justifies combining the described papers into a series) became the basis for modifying the protocol of study 2. Study 2, was conducted in a group of 200 male, inbred Wistar rats, in which diabetes was induced using the same method as in Study

1. In the initial phase, 120 rats were used to determine the appropriate dose of antidiabetic drugs to achieve glycaemia of 350-450 mg/dl. In the final phase of the study, 45 individuals with the most stable glycaemias were used. These individuals were divided into three groups: group I received human NPH insulin intraperitoneally (5 IU/kg b.w.) once daily, group II received metformin intragastrically (500 mg/kg b.w.) and group III (control) received saline intraperitoneally. After 14 days of antidiabetic treatment, a superficial wound was made in the rats. A thin layer of epidermis and dermis measuring 2x2 cm was cut on the dorsum of the rats and a 4 cm diameter silicone disc with a hole in the center was sutured to stabilize the skin and standardize the healing process. To monitor the wound healing process, both a photographic assessment of the wound size and a biopsy of the wound surface were taken every three days. The wound healing process was followed for 9 days. Biopsy samples were subjected to H+E staining and immunohistochemistry was performed to assess the expression of the proliferation marker Ki67 antigen.

Results

In study 1, a faster rate of wound healing was observed in group I (rats receiving insulin). The mean surface area at day 12 after wound formation for group I was 3808 px, while in group II (control) it was 13104 px, and the percentage ratio of final wound area to initial wound area was 8% in group I and 23% in group II, respectively. Analysis of the biopsy material showed a significantly higher accumulation of inflammatory cells and greater expression of local inflammation in group II (control). An enlargement of the wound area was initially observed in group I (after the first 3 days), which was not observed in group II. This result was most likely a consequence of the lack of wound stabilization due to the different mechanism of wound healing in rats (*musculus panniculus carnosus* contraction phenomenon) in such a way that the results could be ideally compared at any time point. The consequences of the effect of this mechanism on wound healing were avoided in paper 2 by using the silicone discs described above.

In paper 2, the mean glucose levels in the insulin or metformin treatment groups and the control group after 30 days of treatment were similar and ranged between 350 and 450 mg/dl to represent the metabolic unbalanced state of diabetes. These glycaemic ranges were maintained throughout the observation of wound healing, an important modification of the original model to better represent the state of chronic diabetic imbalance.

Mean wound area changes (\pm standard deviation) were -66.8% (\pm 9.7%) for group I (insulin), group II (metformin) -40.4% (\pm 15.8%) and group III (control) -48.0% (\pm 9.8%),

respectively. Scheffé and Bonferroni post-hoc tests showed significant differences between the insulin group (group I) and the metformin group (group II), with $p < 0.002$ for both tests, and between the insulin group (group I) and the control group (group III), with $p < 0.03$ for both tests. On contrary, there were no significant differences between the metformin group (group II) and the control group (group III) ($p > 0.51$ for both tests). Therefore, the highest wound healing rate was for the insulin group (group I).

Biopsy material taken from group I (insulin-treated) rats on histopathological analysis showed significantly lower levels of inflammatory infiltration than those obtained from rats treated with metformin (group II) and the control group (group III). Immunohistochemical evaluation showed the highest density of proliferation centers (expressed with proliferation marker – Ki67 antigen) in the group of insulin-treated animals (proliferation index 27.5% vs 18%).

The results of studies 1 and 2 were used to prepare a review paper (paper 3) summarizing previous knowledge in the preparation of an animal model of chronic wounds with associated diabetes.

Conclusions

The authors were looking for a reproducible chronic wound model in diabetes, that could be used to study the effects of different pharmacological molecules on wound healing efficiency. This objective was achieved and the results of the second study conducted demonstrated the usefulness, versatility and reproducibility of the designed animal model of chronic wounds. In this study, insulin was shown to significantly stimulate cell proliferation more than metformin, as evidenced by increased expression of the Ki67 antigen. As the study was conducted under conditions of sustained hyperglycaemia, irrespective of the molecules used, the effect of wound area reduction was not dependent on changes in glycaemic values. This study demonstrates that the wound healing process in diabetes is influenced by the use of a specific antidiabetic drug. The material obtained may be the beginning of a consideration of the broad effects of antidiabetic drugs, including insulin, on wound healing mechanisms in diabetes. Establishing these mechanisms and attempting to molecularly explain the noticeable acceleration of wound healing under hyperglycaemic conditions in insulin-treated patients will be the aim of the next stage of our research.

4. Wstęp uzasadniający połączenie wskazanych publikacji w jeden cykl oraz komentujący osiągnięcia naukowe na tle dotychczasowego stanu wiedzy

Według raportu International Diabetes Federation (IDF) w 2021 roku szacowano, że na świecie z cukrzycą żyje 537 milionów dorosłych (20-79 lat). Przewiduje się, że do 2045 roku liczba osób z rozpoznaną cukrzycą osiągnie ponad 783 miliony [1]. Wobec lawinowo narastającej zachorowalności na cukrzycę równolegle rośnie liczba powikłań tej choroby. Przewlekłe powikłania cukrzycy, zarówno o charakterze mikro- jak i makroangiopatii, mają istotny wpływ na stopniowe pogarszanie się funkcji wielu narządów w wyniku zmniejszenia utlenowania tkanek. Powikłania te są m.in. przyczyną upośledzenia procesu gojenia ran, zarówno ostrych, jak i przewlekłych [2]. To, co wyróżnia naturalny przebieg powikłań naczyniowych u osób z cukrzycą w stosunku do osób bez cukrzycy, to niejednokrotnie bezobjawowy ich charakter. Przyczyną tego faktu jest m.in. nakładająca się na ten przebieg zmian narządowych neuropatia, która jest najczęstszym, a jednocześnie najbardziej niedocenianym w codziennej praktyce klinicznej powikłaniem cukrzycy. Neuropatia, która może dotyczyć wielu układów, według różnych autorów obecna jest u 54-80% pacjentów z cukrzycą na różnych etapach ich życia [3,4]. W przypadku ran zlokalizowanych w odcinkach dystalnych organizmu (najczęściej stopy, rzadziej ręce) neuropatia ma szczególne znaczenie, ponieważ może dotyczyć komponenty zarówno czuciowej, ruchowej, jak i autonomicznej. W tych lokalizacjach może objawiać się m.in. upośledzeniem czucia bólu, temperatury, dotyku i wibracji oraz suchością skóry, co w konsekwencji może prowadzić do powstawania owrzodzeń w miejscach wzmożonego nacisku. Jest to podstawą m.in. rozwoju zespołu stopy cukrzycowej. Uważa się że owrzodzenie stóp może pojawić się u 15%, a nawet 20% pacjentów z cukrzycą na przestrzeni ich życia [4,5]. Tylko szybka interwencja w momencie powstania rany u chorego z cukrzycą jest w stanie zahamować niekorzystny ciąg zdarzeń prowadzących poprzez zakażenie do martwicy, konieczności resekcji tkanek, a nawet sepsy z możliwością zgonu włączenie. Nadzieją dla pacjentów z cukrzycą, u których powstanie rana, jest dostępność cząsteczek farmakologicznych, które z jednej strony będą hamowały nasilenie cech stanu zapalnego, a z drugiej przyspieszały proliferację nowo tworzącej się ziarniny. Rolą badań naukowych jest ciągle ulepszanie narzędzi umożliwiających skrócenie czasu gojenia ran. Do narzędzi tych należą nowo syntezowane cząsteczki, ale także odpowiednio projektowane zwierzęce modele rany, które mogą odzwierciedlać warunki obecne w ranach u ludzi. W dostępnym piśmiennictwie opisano wiele modeli zwierzęcych cukrzycy oraz wiele modeli samej rany, jednak niewiele możemy znaleźć opracowań opisujących zwierzęcy model rany w

cukrzyca, szczególnie z towarzyszącą neuropatią.

Przedstawiany cykl prac miał dwa zasadnicze cele. Pierwszym było zaprojektowanie zwierzęcego modelu rany przewlekłej, który możliwie jak najwierniej odwzorowałby warunki w tkankach u ludzi z cukrzycą oraz towarzyszącą neuropatią. Drugim celem była ocena skuteczności leków przeciwcukrzycowych w zakresie wpływu na proces gojenia rany na optymalnie przygotowanym wcześniej modelu rany zwierzęcej.

U ludzi przedłużone gojenie ran, związane z obecnością cukrzyca, wynika z odmiennej patofizjologii tego procesu w warunkach hiperglikemii i jest złożonym procesem. Pierwotnie hiperglikemia, a w dalszej konsekwencji wzajemne nakładanie się wpływu immunopatii, endoteliopatii oraz neuropatii, są głównymi czynnikami wpływającymi na znaczne utrudnienie procesu gojenia ran u chorych na cukrzycę [6]. Uszkodzenia narządowe w cukrzycy zależne od utrzymującej się przewlekłej hiperglikemii są wynikiem nasilenia szlaku poliolowego, kinazy białkowej C (PKC) i szlaku późnych produktów glikacji (AGE). Wszystkie opisane wyżej procesy są wynikiem zaburzeń krążenia, zarówno na poziomie mikro-, jak i makronaczyniowym, i są bezpośrednim czynnikiem wydłużającym czas gojenia ran, a często całkowicie je uniemożliwiającym [7]. Wynika to z niewystraczającego zaopatrzenia miejsca rany w substancje odżywcze konieczne do prawidłowej regeneracji tkanek [8].

Immunopatia cukrzycowa polega na upośledzeniu funkcji obronnych organizmu zależnych od czynników komórkowych i humoralnych powstałych w warunkach przewlekłej hiperglikemii (tzw. *hyperglycemia milieu*). W takich warunkach osłabione są właściwości bakteriobójcze granulocytów obojętnochłonnych, co wynika ze zmniejszonej aktywności zawartej w ich ziarnistościach azurofilnych dysmutazy nadtlenkowej. Niedobory fosforanu dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (NADPH) związane m.in. z aktywacją szlaku poliolowego w cukrzycy powodują, że tlenowe mechanizmy odpowiedzialne za unieszkodliwianie drobnoustrojów przez granulocyty obojętnochłonne nie są w pełni sprawne (poprzez zmniejszenie aktywności enzymów zależnych od insuliny), poza tym upośledzeniu ulegają również procesy komórkowe, takie jak chemotaksja czy fagocytoza. [9,10,11].

Szlak poliolowy dodatkowo przyczynia się do zmniejszenia podaży tlenu azotu (NO) oraz nasila produkcję wolnych rodników tlenowych w świetle naczyń, powodując bezpośrednio zaburzenie regulacji naczyniowej ich śródbłonna, co wydaje się odgrywać kluczową rolę w rozwoju endoteliopatii [12,13].

Ponadto hiperglikemia, w wyniku wzmożonej syntezy diacyloglicerolu (DAG), wpływa

na zwiększenie syntezy enzymów regulatorowych należących do szlaku PKC, które powodują dysfunkcję mikroarterioli regulujących kurczliwość mięśniówki gładkiej naczyń zaopatrujących obszary tkankowe [14]. Uszkodzenie komórek endotelium w okresie długotrwałej niewyrównanej cukrzycy dokonuje się również w wyniku działania szlaku AGE poprzez glikację struktury i zmianę funkcji białek macierzy zewnątrz- i wewnątrzkomórkowej. Dodatkowo aktywacja receptorów dla AGE (RAGE) prowadzi do aktywacji oksydazy NADPH i w tym mechanizmie dalej nasilenia procesy oksydoredukcyjnych, co powoduje dalsze uszkodzenie endotelium poprzez formowanie produktów reaktywnych form tlenu (ROS) oraz uszkodzenie DNA [15]. W wyniku nasilenia wspomnianych szlaków AGE jak i PKC dochodzi także do zwiększonej sygnalizacji jądrowego czynnika transkrypcyjnego NF- κ B, pośredniczącego m.in. w syntezie endoteliny-1 oraz molekuł adhezyjnych ICAM, które nasilają miejscowy odczyn immunologiczny w świetle naczynia [16].

Większość procesów odpowiedzialnych za rozwój endoteliopatii i immunopatii, m.in. zwiększona aktywność szlaku polioliowego, tworzenie AGE oraz szlak PKC, prowadzi jednocześnie do rozwoju neuropatii [17]. Do uszkodzenia nerwów *per se*, dochodzi jak w przypadku endoteliopatii, w wyniku nadmiernej aktywności szlaku polioliowego, czego konsekwencją jest gromadzenie sorbitolu, nasilenie stresu osmolarnego i w konsekwencji zwiększenie aktywności ROS [18]. Z uwagi na postępujące zmiany okluzyjne w *vasa nervorum* dochodzi także do zmniejszenia ciśnienia parcjalnego tlenu, a co za tym idzie miejscowego niedokrwienia tkanek i obniżenia pH, co bezpośrednio powoduje aktywację kanału jonowego zależnego od kwasowości typu 3 (ASIC3), odpowiedzialnego za przekazywanie sygnałów bólowych i regulowanego przez kinazę białkową A (PKA) oraz kinazę białkową C (PKC) [19,20].

W wyniku mikroangiopatii upośledzona jest także sekrecja neuropeptydów i neuroprzekazników z zakończeń włókien nerwowych (głównie włókna typu C, które występują w 70% w skórze), m.in. substancji P oraz peptydu pochodnego genu kalcytoniny (CGRP), co powoduje, że komórki układu odpornościowego nie uzyskują sygnału do podjęcia swoich funkcji [21,22]. Zakłócone zostają więc procesy sygnalizacji komórkowej odpowiedzialne zarówno za obecność neuropatii bólowej, jak i wadliwą odpowiedź na pojawienie się cech stanu zapalnego [23]. W wyniku utrzymującego się przewlekłe miejscowego stanu zapalnego wywołanego uszkodzeniem śródbłonna naczyń dochodzi ponadto do aktywacji receptorów waniloidowych (TRPV1) [19]. Receptory TRPV1 są umiejscowione we włóknach nerwów czuciowych oraz m.in. w niektórych naczyniowych komórkach śródbłonna i komórkach mięśni

gładkich, uczestnicząc w integracji przekazywania bodźców bólowych, a ich nadmierna aktywacja również odpowiada za obecność neuropatii bólowej u pacjentów z cukrzycą [24]. Z reguły u ludzi na opisane procesy wiodące do mikroangiopatii, nakładają się stopniowo nasilające się zmiany makroangiopatyczne, które w zależności od obszaru tkankowego mogą powodować zmiany niedokrwienne, np. występujące w obszarze kończyn dolnych, wywołując zmiany zgorzelinowe (zespół stopy cukrzycowej o etiologii naczyniowej). Jednak wyjściową przyczyną, która w większości przypadków stanowi podstawę decydującą o upośledzeniu gojenia ran w cukrzycy, są zmiany w naczyniach o małej średnicy wywołujące mikroangiopatię [25]. Uzyskanie takich warunków u zwierząt doświadczalnych jest niezwykle trudne. Powszechnie używane modele szczurze i mysie zapewniają wgląd w specyficzne, wyselekcjonowane mechanizmy związane z cukrzycą o podłożu poligenowym [26]. W modelach zwierzęcych uzyskuje się zazwyczaj albo efekt odpowiadający wpływowi mikroangiopatii, albo makroangiopatii.

W pracach, które są przedmiotem niniejszej rozprawy doktorskiej zdecydowano, aby do oceny zwierzęcego modelu rany posłużyły szczury. W porównaniu do innych dostępnych zwierząt laboratoryjnych model szczurzy cechuje się niskim kosztem ekonomicznym prowadzenia badania (zakup zwierzęcia, zapewnienia pożywienia, powierzchni laboratoryjnej), a przy tym wysokim wskaźnikiem urodzeń osobników oraz krótkim czasem reprodukcji, co ułatwia szybkie generowanie modeli o określonych cechach [27].

U szczurów doświadczalnych zmiany o charakterze neuropatii są stwierdzane już po 7 dniach od indukcji cukrzycy, co znacznie skraca czas prowadzenia badania. **W badaniu nr 1 - Nowy model ran przewlekłych w cukrzycy – badanie pilotażowe u szczurów rasy Wistar oraz w badaniu nr 2 pt. Insulin, but not metformin, supports wound healing process in rats with streptozotocin-induced diabetes** potwierdziliśmy stopniowy rozwój neuropatii odpowiednio po 7., 14., 21. i 28. dniu od podania STZ. Stopień uszkodzenia nerwów oceniano mierząc próg wrażliwości na bodźce mechaniczne według modyfikacji metody Randalla-Selitto [28]. U ludzi proces taki z reguły dokonuje się na przestrzeni wielu lat. W badaniu populacyjnym z 1994 roku, oceniającym obecność powikłań DM, w którym ponad trzy tysiące pacjentów z szesnastu krajów było leczonych insuliną, początkowo stwierdzono neuropatię u 28% chorych, a wzrost do 51,5% odnotowano po kolejnych siedmiu latach obserwacji [29]. Jeżeli w modelu szczurzym przygotowanie analogicznych warunków trwa zaledwie kilka dni, oznacza to, że teoretycznie można w jego oparciu prowadzić badania odpowiadające na szereg pytań klinicznych, które u ludzi trwałyby wiele miesięcy lub nawet lat.

Pomimo że etapy gojenia się ran są podobne i obejmują koagulację, fazę zapalną (naciek komórek odpornościowych, wydzielanie cytokin), fazę proliferacyjną (wytwarzanie macierzy pozakomórkowej, angiogeneza, epitelializacja) oraz fazę remodelingu (sieciowanie i reorganizacja kolagenu), istnieją różnice w ultrastrukturze i fizjologii skóry pomiędzy poszczególnymi gatunkami, co sprawia, że gojenie się ran u ludzi i zwierząt różni się. U szczurów skóra jest cienka i delikatna, natomiast warstwa podskórna składa się ze specjalnego rozstępu mięśniowego, *musculus panniculus carnosus*. Rana powstała na grzbiecie zwierzęcia doświadczalnego w obrębie *musculus panniculus carnosus* ulega szybkiemu obkurczeniu, co sprzyja bardzo szybkiemu gojeniu się ran [30]. Zjawiska tego nie da się odtworzyć u ludzi. Stało się to powodem, dla którego w **badaniu nr 2 pt. Insulin, but not metformin, supports wound healing process in rats with streptozotocin-induced diabetes** zastosowaliśmy specjalną metodą stabilizacji rany. Na grzbiecie szczurów wycinano cienką warstwę naskórka oraz skóry właściwej o wymiarach 2x2 cm i wszywano silikonowy krążek o średnicy 4 cm z otworem w środku celem zapobiegania procesowi kontrakcji *musculus panniculus carnosus*, który u każdego osobnika mógłby przebiegać nieco inaczej. Zapewniło to standaryzację procesu gojenia i powtarzalność u badanych osobników. Autorzy zdecydowali się również na wybór szczurów przed myszami ze względu na większą powierzchnię celem lepszego odwzorowania wytworzonej rany.

U ludzi z cukrzycą rany przewlekłe ulegają z reguły zakażeniu. Celem uzyskania warunków imitujących cechy miejscowego zakażenia w badaniach ranę ostrzykiwano roztworem lipopolisacharydu uzyskanego z *Pseudomonas aeruginosa*. Tak przygotowaną ranę dodatkowo zabezpieczano za pomocą opatrunku w taki sposób, aby zwierzęta nie przenosiły tkanek zakażonych na inne obszary ciała, ani nie powodowały ich powikłania się na skutek drażnienia tkanek np. o ścianki klatki. U człowieka rany także zabezpiecza się za pomocą opatrunków o różnych właściwościach (m.in. zmniejszenie ilości wysięku, wykorzystanie właściwości przeciwdrobnoustrojowe, ograniczanie syntezy metaloproteinaz), jednak w przedstawionych badaniach celem nie była ocena wpływu rodzaju opatrunku na proces gojenia rany, jedynie stabilizacja miejsca rany.

Problemem, który analizowano przed rozpoczęciem prac doświadczalnych była decyzja o sposobie indukcji cukrzycy u zwierząt doświadczalnych. Celem wywołania cukrzycy zdecydowano się skorzystać z protokołu cukrzycy streptozotocynowej (STZ). W przedstawianym modelu nie chodziło o pokazanie sytuacji klinicznej obecnej w cukrzycy konkretnego typu, tj. typu 1 lub 2, ale odwzorowanie zmian tkankowych jakie indukuje

długotrwała hiperglikemia. Niektóre pozycje piśmiennictwa wskazują na to, że cukrzyca STZ odzwierciedla idealnie warunki cukrzycy typu 1. Pomimo swojego toksycznego działania na komórki β wysp trzustkowych, modele indukowane STZ nie są prostym odwzorowaniem cukrzycy typu 1 (T1DM), ponieważ choroba ta nie jest spowodowana niszczeniem komórek β przez ksenobiotyki, oraz nie następuje całkowite upośledzenie wytwarzania insuliny, poza schematem użycia STZ w znacznie wyższych i częstszych dawkach [31]. W prezentowanych pracach dawka zastosowanej STZ (35-38mg) nie powodowała całkowitego, nieodwracalnego uszkodzenia funkcji komórki β , pozwalając na indukcję średniociężkiej cukrzycy u większości badanych osobników (glikemie w przedziałach 250-350 mg/dl). Analogicznie zastosowanie wariantów genetycznych zwierząt doświadczalnych, np. myszy czy szczurów ob/ob czy db/db jako modelu nie jest idealnym odwzorowaniem cukrzycy typu 2 (T2DM), ponieważ u większości ludzi cukrzyca nie jest bezpośrednio spowodowana zaburzeniem osi leptynowej [32]. Dodatkowym aspektem poruszonym w piśmiennictwie jest możliwość dodania do STZ nikotynoamidu (NA) celem poprawy kontroli nad ciężkością wytworzenia cukrzycy u badanych zwierząt. W badaniach *in vitro* wykazano, że odpowiedź insulinosekrecyjna na glukozę u szczurów z cukrzycą indukowaną STZ-NA jest osłabiona w porównaniu ze zwierzętami kontrolnymi. Odbywa się to dzięki hamowaniu aktywności polimerazy poli(ADP-rybozy) (PARP-1), co zapobiega wyczerpaniu NADPH i ATP w komórkach narażonych na działanie STZ [33].

W piśmiennictwie dostępne są również schematy wywołania cukrzycy przez alloksan [34]. Alloksan i produkt jego redukcji działają bezpośrednio w komórkach β za pośrednictwem ROS, powodując ich szybkie niszczenie. Natomiast STZ dostaje się do komórki β przez transporter glukozy (GLUT2) i powoduje alkilację DNA [35]. Jednak według doniesień większości autorów to STZ jest preferowanym środkiem do wytworzenia cukrzycy u zwierząt, ze względu na wyższy wskaźnik indukcji i niższą toksyczność [36-38]. Śmiertelność zwierząt jest wyższa w przypadku alloksanu niż STZ m.in. ze względu na dużą utratę masy ciała. Wynika to ze zmniejszonej masy komórek β , jak również z defektów metabolicznych w komórkach wydzielających insulinę.

Biorąc pod uwagę szybkość powstawania powikłań u szczurów z cukrzycą STZ, prosty schemat wytworzenia, niski koszt wdrożenia tego schematu oraz możliwość doboru ciężkości cukrzycy, stał się on podstawą naszego modelu.

Optymalna kontrola glikemii ma kluczowe znaczenie dla prawidłowego gojenia się ran u pacjentów z cukrzycą. Nie jest jednak jasne, czy istnieje jakikolwiek dodatkowy efekt

związany z lekami przeciwcukrzycowymi poza poprawą kontroli glikemii. W badaniu pt. **Insulin, but not metformin, supports wound healing process in rats with streptozotocin-induced diabetes** oceniliśmy wpływ podawania insuliny i metforminy na proces gojenia ran, wykorzystując zaprojektowany zwierzęcy model doświadczalny u szczurów z cukrzycą indukowaną STZ. W badaniu tym udowodniono, że insulina istotnie bardziej pobudza proces proliferacji komórek w stosunku do metforminy, czego dowodem była zwiększona ekspresja antygenu Ki67. Ponieważ badanie prowadzono w warunkach utrzymującej się na stałym poziomie hiperglikemii, niezależnie od zastosowanych cząsteczek, efekt zmniejszenia powierzchni rany nie był zależny od zmian wartości glikemii. Badanie dowodzi, że na proces gojenia ran w cukrzycy ma wpływ zastosowanie konkretnego leku przeciwcukrzycowego. W opisywanych na modelach zwierzęcych pracach, autorzy postulują, że insulina i insulinopodobny czynnik wzrostu 1 (IGF-1) pośredniczą w aktywacji szlaku sygnałowego kinazy3-fosfatydyloinozytolu i kinazy białkowej AKT (PI3K/Akt), stymulując migrację komórek nabłonkowych i gojenie się ran [39,40]. Ponadto wykazano, że insulina bezpośrednio stymuluje proliferację keratynocytów poprzez szlak PI3K/Akt oraz aktywuje ich migrację poprzez aktywację GTPazy Rac1, wzmacniając proces gojenia się ran [41,42]. W badaniu Dandona wykazano, że insulina wywołuje efekt przeciwzapalny w monocytach pochodzących od otyłych pacjentów poprzez zmniejszenie sygnalizacji NF κ B i generowania ROS, zmniejszając destrukcyjny wpływ ROS [43]. W analizowanych badaniach obserwowano również korzystny wpływ miejscowo stosowanej insuliny na rany, poprzez wzrost stężenia białka transportera glukozy 1 (GLUT1) [44,45].

Nie ma jednoznacznej zgody badaczy co do wpływu metforminy na gojenie się ran, a wyniki opublikowanych dotychczas badań są sprzeczne. W badaniu Verma i wsp. wykazano w modelu zwierzęcym, że metformina wpływa na metabolizm komórek raka płaskonabłonkowego głowy i szyi poprzez spadek wychwytu 2-deoksy-D-glukozy oraz hamuje ich proliferację, co stwierdzono poprzez istotne statystycznie zmniejszenie skupisk wybarwień antygenu Ki-67 [46]. Działanie antyproliferacyjne zasugerowali również Lee i wsp. w badaniu na komórkach raka dróg żółciowych, wykazując, że metformina hamuje szlak mTOR, promując apoptozę [47]. Takie działanie, choć pożądane w terapii przeciwnowotworowej, nie jest korzystne w leczeniu gojenia ran. Wyniki badania Han i wsp. na modelu cukrzycy myszy db/db wykazały poprawę funkcji endotelialnych komórek progenitorowych (EPc) oraz poprawę angiogenezy rany, upośledzonych w tym wariantcie genetycznym z uwagi na zaburzenia gospodarki lipidowej [48]. Odmienne wyniki obrazujące wpływ metforminy na gojenie się ran

wynikają również ze sposobu podawania (doustnie lub miejscowo, bezpośrednio na ranę). Qing i wsp. sugerują pozytywny wpływ miejscowo stosowanej metforminy na gojenie się ran poprzez hamowanie szlaku kinazy białkowej aktywowanej przez adenozyno-5'-monofosforan (AMP) [49].

Inną grupą leków przeciwcukrzycowych, których wpływ na rany w cukrzycy został opisany w piśmiennictwie, są inkretynomimetyki. W pracy pogładowej zbierającej wszelkie doniesienia naukowe z lat 1994-2014 dotyczące działania inhibitorów dipeptydylo-peptydazy 4 (DPP-4) opisano m.in. promowanie rekrutacji progenitorowych komórek, zwiększenie skuteczności angiogenezy oraz optymalizację odpowiedzi immunologicznej na utrzymującą się hipoksję w przewlekłych ranach cukrzycowych [50]. W badaniu Sasso i wsp. wyniki histopatologiczne biopsji pacjentów leczonych wildagliptyną wykazały zwiększone stężenie czynnika indukowanego hipoksją-1 (HIF-1 α) i czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGF), które sugerowały zaangażowanie proangiogenne. Badacze zaproponowali, że wildagliptyna może działać poprzez zmniejszenie stresu oksydacyjnego oraz zapobieganie zwiększonej degradacji czynnika indukowanego (HIF-1 α), prowadząc do zwiększonej ekspresji (VEGF) [51]. Dla porównania w badaniu Nagae i wsp. gdzie zastosowano maść zawierającą analog GLP-1 (liraglutyd) na rany na grzbiecie myszy balb/c (n = 6) ustalono, że liraglutyd może odpowiadać za zwiększoną migrację keratynocytów poprzez aktywację szlaku PI3K/Akt [52].

Poza opisywanymi powyżej cząsteczkami farmakologicznymi trwają prace nad oceną działania innych substancji przeciwcukrzycowych, m.in. inhibitory kotransportera glukozy-sodowego 2 (SGLT-2) w kontekście leczenia ran na modelu zwierzęcym, przyczyniając się do poszerzenia ich zastosowania [53].

5. Założenia i cel pracy

Powszechność występowania cukrzycy i wydłużanie się czasu życia społeczeństwa sprzyja rozwojowi powikłań naczyniowych utrudniających gojenie się ran. Poszukuje się zarówno cząsteczek farmakologicznych, jak i innych metod przyspieszających proces gojenia ran, celem zmniejszenia ryzyka powikłań septycznych i innych następstw długotrwałego ich utrzymywania się. Zanim takie cząsteczki i metody zostaną zastosowane u człowieka powinno dokonać się ich oceny w modelach zwierzęcych. W dostępnym piśmiennictwie opisano wiele modeli zwierzęcych cukrzycy oraz wiele modeli samej rany, jednak niewiele możemy znaleźć opracowań traktujących o zwierzęcym modelu rany w cukrzycy.

- 1) Zwierzęcy model rany przewlekłej u chorych na cukrzycę wymaga optymalizacji celem przygotowania przydatnego narzędzia badawczym przy pracach nad nowymi cząsteczkami przyspieszającymi proces gojenia ran.
- 2) Proces gojenia ran u zwierząt z cukrzycą doświadczalną przebiega odmiennie w zależności od zastosowanych cząsteczek przeciwcukrzycowych.

Celem pracy badawczej była odpowiedź na następujące pytania:

- 1) Czy za pomocą zwierzęcego modelu rany można jak najwierniej odwzorować warunki występujące w ranie u ludzi z wieloletnią, niewystarczająco kontrolowaną cukrzycą?
- 2) Czy można zapewnić powtarzalność i standaryzację stworzonego zwierzęcego modelu rany przewlekłej tak, aby wyniki prowadzonych badań mogły być porównywane w przypadku zastosowania różnych cząsteczek?
- 3) Czy istnieją różnice w zakresie potencjału na proces gojenia ran różnych cząsteczek przeciwcukrzycowych?

6. Kopie opublikowanych prac

6.1. Nowy Model Ran Przewlekłych w cukrzycy – Badanie Pilotażowe u Szczurów Rasy Wistar.

LECZENIE RAN 2015;12(1):33–39
© Evereth Publishing, 2015

PRACA ORYGINALNA

BEATA MROZIKIEWICZ-RAKOWSKA¹ | MATEUSZ MIECZKOWSKI¹ | TOMASZ J. SIWKO¹ | MAGDALENA I. BUJALSKA-ZADROŻNY² | ANNA E. DE CORDÉ² | EMILIA GAŚSIŃSKA² | KAMILA KULIK² | TOMASZ GRZELA³ | ALICJA KREJNER³ | RAFAŁ DULSKI⁴ | TADEUSZ PIĄTKOWSKI⁴ | ADRIANA NOWAK¹ | JANUSZ KRZYMIENI¹

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].

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×dziennie 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

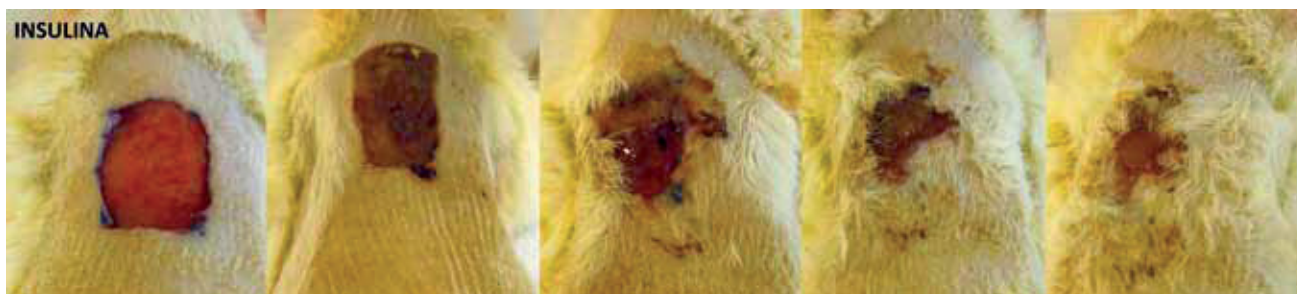
u zwierząt otrzymujących insulinę mieściły się w granicach 80–150 mg/dl [14, 15]. W trakcie doświadczenia szczury miały nieograniczony dostęp do wody oraz pożywienia.

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 brzeżnych 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].

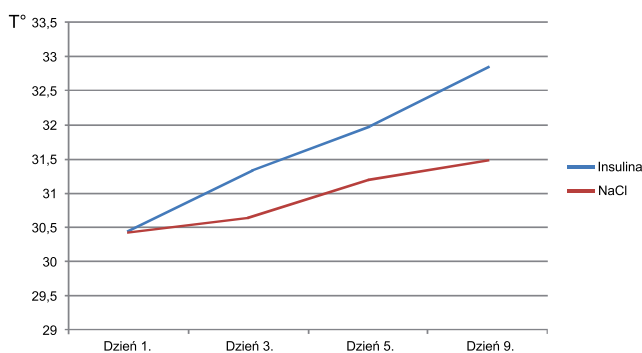
Wycinki z obrzeża rany zebrane podczas badania zostały ocenione pod względem histologicznym. Materiał biopsyjny utrwalono w roztworze 2% formaldehydu i poddano standardowej procedurze, tj. preparaty o grubości 10 μ m barwiono hematoksyliną i eozyną, a następnie oceniano w mikroskopie świetlnym przy powiększeniu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



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.

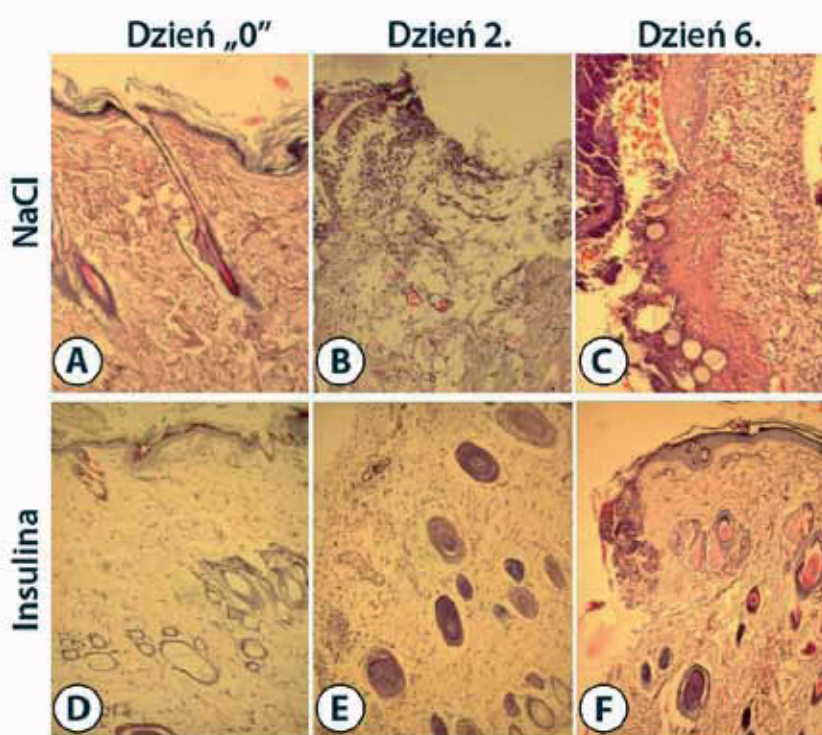
Na Ryc. 1 i 2 przedstawiono makroskopowy wygląd ran wybranych szczurów z grupy I i II. Zaobserwowano, że u zwierząt leczonych insuliną, pomimo początkowego powiększenia powierzchni rany, w dalszym okresie nastąpiło jej szybsze (w porównaniu do grupy kontrolnej) gojenie. W konsekwencji podczas ostatniego 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

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.

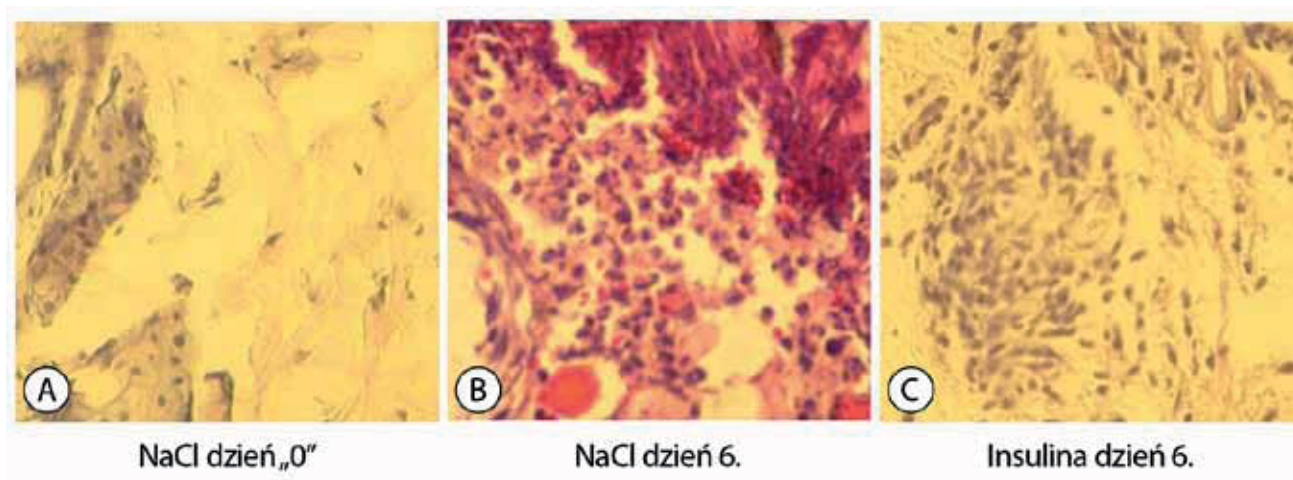
W grupie kontrolnej (otrzymującej roztwór 0,9% NaCl) w preparatach biopsyjnych, pobranych w drugim dniu po wytworzeniu rany doświadczalnej, zaobserwowano wyraźne nacieki zapalne, złożone głównie z granulocytów obojętnochłonnych i makrofagów (Ryc. 4B). Umiarkowany, lecz o mniejszej intensywności naciek,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



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 Allelyvyn™ 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 Moll elast® 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

do obniżenia temperatury, co jest związane z większą utratą ciepła z tkanek niepokrytych skórą. Zatem wzrost temperatury przekładający się na mniejszy ubytek promieniowania ciepłego 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 przewlekłe 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 neutroficzną 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 zabezpieczenia 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 glycaemic variation. *Scand J Lab Anim Sci* 2011;38(2):117–127.

15. Oztürk Y, Aydın 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.

6.2. Insulin, but Not Metformin, Supports Wound Healing Process in Rats with Streptozotocin-Induced Diabetes

Insulin, but Not Metformin, Supports Wound Healing Process in Rats with Streptozotocin-Induced Diabetes

Mateusz Mieczkowski ¹
Beata Mrozikiewicz-Rakowska ¹
Tomasz Siwko ¹
Magdalena Bujalska-Zadrozny ²
Anna de Corde-Skurska ²
Renata Wolinska ²
Emilia Gasinska ²
Tomasz Grzela ³
Piotr Foltynski ⁴
Michal Kowara ⁵
Zofia Mieczkowska ¹
Leszek Czupryniak ¹

¹Department of Diabetology and Internal Medicine, Medical University of Warsaw, Warsaw, Poland; ²Department of Pharmacodynamics, Medical University of Warsaw, Warsaw, Poland; ³Department of Histology and Embryology, Medical University of Warsaw, Warsaw, Poland; ⁴Nalecz Institute of Biocybernetics and Biomedical Engineering Polish Academy of Sciences, Warsaw, Poland; ⁵Department of Cardiology, Medical University of Warsaw, Warsaw, Poland

Correspondence: Beata Mrozikiewicz-Rakowska
Department of Diabetology and Internal Medicine, Medical University of Warsaw, Poland ul. Banacha 1A, Warsaw, 02-097, Poland
Tel +48 600 311 399
Fax +48225992832
Email rakowskab123@gmail.com

Purpose: Optimal glycemic control is crucial for proper wound healing in patients with diabetes. However, it is not clear whether other antidiabetic drugs support wound healing in mechanisms different from the normalization of blood glucose control. We assessed the effect of insulin and metformin administration on the wound healing process in rats with streptozotocin-induced diabetes.

Methods: The study was conducted on 200 male Wistar rats with streptozotocin-induced diabetes. In the last phase of the study, 45 rats, with the most stable glucose levels in the range of 350–500 mg/dL, were divided into three groups: group I received human non-protamine insulin subcutaneously (5 IU/kg body mass) once a day, group II received metformin intragastrically (500 mg/kg b.m.), and group III (control) was given saline subcutaneously. After 14 days of antidiabetic treatment, a 2 cm × 2 cm thin layer of skin was cut from each rat's dorsum and a 4 cm disk with a hole in its center was sewn in to stabilize the skin and standardize the healing process. The wound healing process was followed up for 9 days, with assessment every 3 days. Biopsy samples were subjected to hematoxylin and eosin staining and immunohistochemical assays.

Results: Analysis of variance revealed significant influence of treatment type (insulin, control, or metformin) on the relative change in wound surface area. The wound healing process in rats treated with insulin was more effective than in the metformin and control groups. Wound tissue samples taken from the insulin-treated animals presented significantly lower levels of inflammatory infiltration. Immunohistochemical assessment showed the greatest density of centers of proliferation Ki-67 in insulin-treated animals.

Conclusion: These results suggest that an insulin-based treatment is more beneficial than metformin, in terms of accelerating the wound healing process in an animal model of streptozotocin-induced diabetes.

Keywords: diabetes mellitus, neuropathy, ulceration, animal model

Introduction

The rapidly growing incidence of diabetes is accompanied by a simultaneous increase in the number of complications caused by this disease. A particular example of such a complication is disordered wound healing. One of the most common wounds in diabetes is diabetic foot syndrome (DFS).¹ Estimates show that up to 30% of people with diabetes may develop DFS. The prevalence of DFS in a diabetic patient is 19%–34%, with an annual incidence of 2%. After the healing process is completed, the rate of ulcer recurrence is 40% per year, with 65% recurrence within 3 years. It should be

emphasized, however, that only two-thirds of patients with DFS are likely to heal, and about 28% of patients will require lower limb amputation.²⁻⁴ The socioeconomic cost of care for DFS has become a global economic problem, especially taking into consideration the fact that one amputation of the lower limb is carried out every 20 s owing to this disease.^{5,6}

For this reason, in the modern development of the pharmacotherapy of diabetes and its complications, it is important to emphasize not only the control of diabetes itself, but also activities that can prevent or inhibit the development of complications, eg, wounds induced by the presence of chronic hyperglycemia. A good example is the use of the pleiotropic effect of sodium-glucose co-transporter-2 (SGLT-2) inhibitors, which have a range of actions other than their hypoglycemic effect, eg, they inhibit the progression of heart failure.⁷

The prolonged wound healing observed in diabetes results from the different pathophysiology of the wound healing process under hyperglycemia. It has been proven that, under conditions of hyperglycemia, the wound healing process is significantly impaired. Christman et al showed that for each percentage point increase in the level of glycated hemoglobin (HbA1c), the daily wound-area healing rate was decreased by 0.028 cm² per day in humans.⁸ Hyperglycemia affects the persistence of a chronic inflammatory process in the wound, often leading to infectious etiologies. In addition, hyperglycemia significantly impairs the body's defense functions, which are dependent on cellular and humoral factors. Insulin deficiency, caused by insulin resistance in type 2 diabetes or its complete absence in type 1 diabetes, affects the activity of insulin-dependent enzymes contained in neutrophils. Myeloperoxidase and superoxide dismutase, contained in the azurophilic granules of neutrophils, show reduced activity, with weakened bactericidal properties. Deficiencies in nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH), which is connected to the activation of the polyol pathway in diabetes, result in dysfunction of the oxygen mechanisms responsible for neutralization of microorganisms by neutrophils (including the formation of reactive oxygen species on the cell membrane). Monocyte- and macrophage-dependent chemotaxis and phagocytosis are also impaired. Perfusion disorders, leading to critical ischemia at both the micro- and macrovascular levels, underlie the pathophysiology of diabetes, and are direct factors in extending the duration of wound healing, often precluding a successful healing process.⁹⁻¹¹

In addition to local treatment methods for chronic wounds (eg, vacuum-assisted closure or the use of growth factors), methods are being sought to optimize tissue regeneration on a systemic scale. It is postulated that there may be alternative mechanisms of action of antidiabetic drugs, which are independent of their effect on glycemia. These drugs might have a direct impact on the process of regenerating defective tissue in the treatment of ulcers.

The introduction of a more effective pharmacotherapy is made possible through a better understanding of mechanisms accompanying the development of wounds, ascertained through the studies using properly developed animal models.¹²⁻¹⁴ Assuming that the study of properly developed animal models that reflect the tissue regeneration processes as faithfully as possible in patients with long-term diabetes will allow the selection of more effective pharmacotherapy in future, we decided to compare the effect of insulin and metformin on the healing process of chronic wounds in an experimental model of streptozotocin-induced diabetes in Wistar rats.

Materials and Methods

The study was conducted after obtaining the consent of the 2nd Local Ethical Commission for Animal Experiments at the Medical University of Warsaw (Resolution No. 17/2014 of 25 February, 2014). In addition, we also include the name of the guidelines followed for the welfare of the laboratory animals of Polish National Ethical Committee for Animal Experiments.¹⁵ A total of 200 inbred male Wistar rats, weighing 300 ± 30 g were used for the study (Figure 1). The laboratory part of the study consisted of five phases.

In the initial phase, 120 rats were used to determine the insulin demand and dosage of antidiabetic drugs; a further 80 rats were used in the core stage of the experiment. During the trial, animals had unlimited access to water and food.

Phase I: Induction of Diabetes in Study Animals

To induce diabetes, all subjects received streptozotocin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) intramuscularly at a dose of 35 mg/kg body mass (b.m.)¹⁶ The levels of glucose were determined using an Accu-chek Active[®] glucometer (Roche, Basel, Switzerland) four times a day. Blood samples for glucose determination were drawn from the tail vein. The development of diabetes was accompanied by the development of neuropathy. After 7 days,

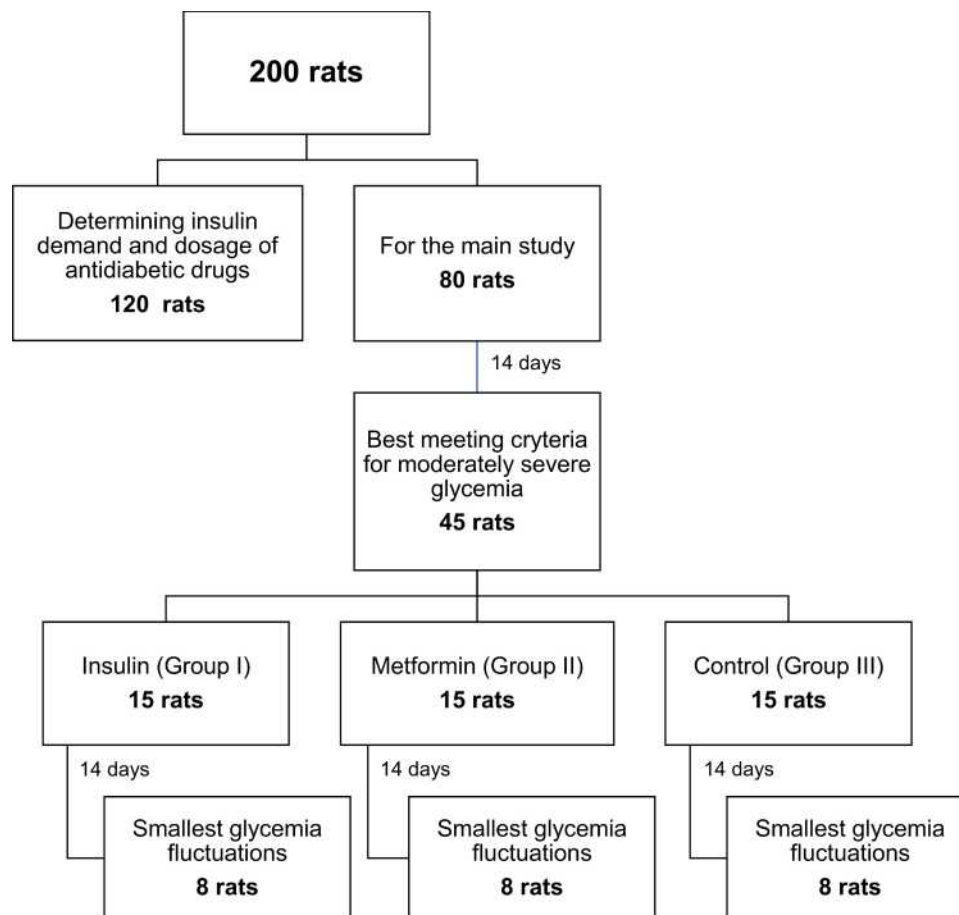


Figure 1 Study protocol.

sensory neuropathy was observed in the study animals. The degree of nerve damage was assessed at 7, 14, 21, and 28 days after streptozotocin administration by measuring the sensitivity threshold to a mechanical stimulus, using a modification of the Randall–Selitto test.¹⁷ Changes in the sensory threshold to a mechanical stimulus were studied using an Ugo-Basile analgesimeter type 7200® (Biological Research Apparatus, Comerio-Varese, Italy). A mechanical stimulus of increasing pressure, applied to the outer surface of the rat's hind limb, was delivered by the analgesimeter until the limb twitched or was withdrawn by the rat. The results, obtained in grams, were converted into percentage variations from the values obtained before streptozotocin administration (time 0) for each rat, according to the following formula:

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

where

A = pressure at time 0 (prior to streptozotocin administration),

B = pressure on subsequent days following streptozotocin administration.

The percentages of analgesia for individual animals, calculated according to the formula, were then used to calculate the average values for the groups (Table 1).

Phase 2: Determining Required Insulin and Metformin Doses in Study Animals

After the period of diabetes induction, the rats were divided into two groups. The first 120 individuals were used to determine the appropriate doses of drugs, ie, metformin and insulin. Initial drug doses were determined on the basis of data from the literature.^{18,19} Fourteen days after the administration of streptozotocin, from a second group, of 80 individuals, 45 rats were selected who best met the criteria for mild diabetes (blood glucose >200 mg/dL). These 45 rats were then divided into three groups: 15 subjects, group I, were treated with insulin (Insulatard®, Novo Nordisk A/S Novo Allé, Bagsværd, Denmark) preparations of 5 IU/kg b.m. subcutaneously; 15 rats, group II, were treated with metformin

Table 1 Percentage Changes in Pain Threshold in the Development of Neuropathy (Day 0 – Before Streptozotocin Administration, Day 7, Day 14, Day 21 and Day 28 After Streptozotocin Administration), Compared with Values Before Streptozotocin Administration (measured using a modification of the Randall-Selitto test)¹⁷

Group	Insulin (Group I)		Metformin (Group II)		Control (Group III)	
	Antinociception	Reduction (%)	Antinociception	Reduction (%)	Antinociception	Reduction (%)
Before streptozotocin administration	108.215		118.125		112.8125	
Day 7	95	-11.80	94.375	-19.85	94.375	-16.28
Day 14	66.5625	-38.33	76.25	-35.40	75.00	-33.47
Day 21	64.375	-40.37	68.75	-41.49	63.125	-41.49
Day 28	60.9375	-43.60	66.5625	-43.49	60.9375	-44.00

(Metformax[®], Teva Pharmaceuticals Polska sp.z.o.o., Warsaw, Poland) at a dose of 500 mg/kg b.m. orally; and the remaining 15 individuals, who formed the control group (group II), were administered 0.9% NaCl at dose of 50 µL/kg b.m. subcutaneously.

Phase 3: Wound Formation

After 14 days of treatment, eight individuals with the smallest glucose fluctuations were selected from each group (ranges: group I, 326–488 mg/dL; group II, 340–511 mg/dL; group III, 359–510 mg/dL). Scarification was made on the dorsal surface of the skin, after shaving the fur using an electric razor. All animals selected for this phase of the study had a piece of skin removed from the dorsum to the depth of the panniculus carnosus muscle, 0.3–0.5 mm thick and 2 cm × 2 cm wide.^{20–22} Before surgery, the animals were subjected to general anesthesia using a mixture of isoflurane (Isofluran Baxter[®], Søborg, Denmark) and air. The induction of anesthesia was carried out in a sealed chamber at an isoflurane concentration of 4–5% and a flow of 1000 mL/min. Next, to maintain anesthesia, a mixture of 3–3.5% isoflurane in air was administered via a mask outside the induction chamber (Isoflurane Vaporizer, Rothacher & Partner, Berne, Switzerland). Before performing the surgery, the rats' reflexes were always checked by applying pressure using tweezers in the midfoot and the tail. In each group, 1 mL of lipopolysaccharide solution obtained from *Pseudomonas aeruginosa* (Sigma-Aldrich) at a concentration of 1 mg/mL was applied to the wounds to produce chronic inflammation.²³ Then, using surgical sutures, a 4 cm × 4 cm silicone plate with a hole in the center was sutured in place over the wound to replace the skin and standardize the wound healing process. Samples from the marginal sections of the healthy cut-out skin were also collected. Every 3 days, in each individual, a sample was collected from a marginal

section of the wound, wound surface area was assessed, and the protective dressing changed (Mollelast[®] 4 cm × 4 m band, Lohmann & Rauscher, Pabianice, Poland). The protective dressing was gently put around the upper limbs and three-quarters of the upper torso. The bandage was cut in key places (eg, around the shoulder joint) with a risk of compression complications (ischemia, acute neuropathy), creating a kind of a sleeve. The ends of the band were secured with adhesive tape.

Phase 4: Analysis of the Wound Healing Process

To measure the wound surface area, the Planimator app (design by Institute of Biocybernetics and Biomedical Engineering, Polish Academy of Sciences), installed on a Samsung Galaxy S5 smartphone, was used.²⁴ To measure the surface area with this app, two self-adhesive rulers were used, placed on opposite sides of the wound, and the wound contour was outlined in a photograph showing the wound and the rulers located around it.

Phase 5: Histological Evaluation of Collected Sections

Sections taken from wounds were fixed in 2% formaldehyde solution. Standard staining methods (hematoxylin and eosin) were used to determine the presence of inflammatory cells, and standard immunohistochemical testing was used to determine the presence of the nuclear proliferation marker Ki-67 antigen.

Statistical Analysis

The influence of treatment type on wound area was analyzed using analysis of variance (ANOVA). Post-hoc Scheffé and Bonferroni tests were also conducted. Normality of data distribution was analyzed using Kolmogorov–Smirnov and

Shapiro–Wilk tests. Homogeneity of variances was determined using Bartlett's, Cochran's, Hartley's, and Levene's tests. Data were analyzed using STATISTICA® software version 10 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA). Statistical significance was considered for $p < 0.05$.

Results

After administration of streptozotocin in the study rats, symptoms of increasing hyperglycemia were observed, up to maxima of 492 mg/dL in the insulin group (group I), 512 mg/dL in the metformin group (group II), and 526 mg/dL in the control group (group III). This was manifested by increased water intake, increased urine volumes, and reduced pain thresholds (Table 1).

During the 25 days from the start of drug administration, the average glucose level in each group stabilized, as shown in Figure 2. For the statistical analysis of glycemia results, the distribution of which was close to normal, ANOVA was used.

To avoid making the mistake of repeated testing, the comparison was made at an isolated point in time, specifically just prior to drug administration. The comparison of glucose concentration between the considered groups did not reveal any significant differences between the groups ($p = 0.21$); therefore, post hoc tests were not performed. In the subsequent days of the wound healing phase, the differences in glucose concentration between the insulin group (I) and the metformin group (II) were statistically insignificant, which makes it possible to treat glucose levels in these groups as equal. The results of the statistical analysis are shown in Table 2.

To monitor the wound healing process, changes in the wound surface area and macroscopic features of inflammation were assessed (Figure 3).

Percentage changes in wound surface area were calculated for each wound as the difference between the area at day 9 and the area at the start of treatment divided by the area at the start of treatment. The impact of treatment type on the change in wound area was analyzed using ANOVA. The result was significant ($p = 0.002$). The assumptions (homogeneity of variances and normality of data) for the ANOVA test were checked. There were no significant differences between variances ($U = 0.31$) and the percentage changes in wound area were normal for each treatment type (group I, $p = 0.10$; group II, $p = 0.43$; group III, $p = 0.28$). The mean changes in wound area (\pm standard deviation) were for the insulin (group I), -66.8% ($\pm 9.7\%$), metformin (group II) -40.4% ($\pm 15.8\%$), and control (group III) -48.0% ($\pm 9.8\%$), respectively. Post-hoc Scheffé and Bonferroni tests revealed significant differences between the insulin (group I) and metformin (group II) groups, with $p < 0.002$ for both tests and between the insulin (group I) and control (group III) groups, with $p < 0.03$ for both tests. There were no significant differences between the metformin (group II) and control (group III) groups ($p > 0.51$ for both tests). Therefore, the highest rate of wound healing was for the insulin group (group I).

Histologically assessed wounds differed in the rate of resolution of inflammation. Biopsies taken on the day of wound formation (control biopsies) showed a normal histological picture of skin and subcutaneous tissue (Figure 4).

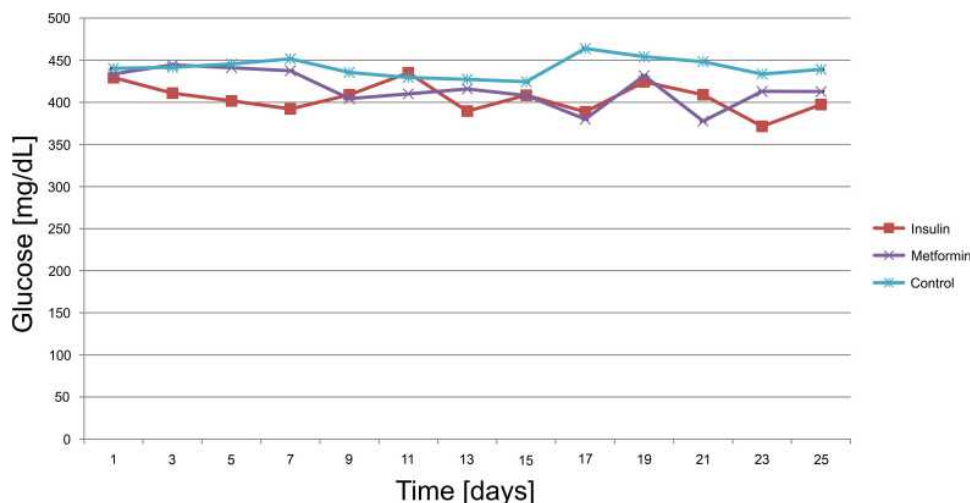


Figure 2 Glycemia in the analyzed groups during all phases of the study.

Table 2 Results of Statistical Analysis for Glycemia in the Wound Healing Phase Between Groups (ANOVA)

Day After Streptozotocin Administration	Mean Glucose Control Group (III) (±SD) [mg/dL]	Mean Glucose Insulin Group (I) (±SD) [mg/dL]	Mean Glucose Metformin Group (II) (±SD) [mg/dL]	P values for the ANOVA test
13 (first day of drug administration)	389.58 ± 17.25	415.86 ± 33.78	427.25 ± 21.08	0.21
15	408.43 ± 9.66	408 ± 43.35	424.37 ± 25.92	0.48
17	388.71 ± 45.16	380 ± 98.87	463.87 ± 50.46	0.051
19	424.29 ± 52.55	431.57 ± 49.09	454.12 ± 60.93	0.55
21	409 ± 60.50	377.57 ± 76.39	448.25 ± 29.38	0.08
23	371.43 ± 38.55	413 ± 71.1	433.5 ± 33.38	0.075
25	397.39 ± 52.93	412.71 ± 90.96	439 ± 35.50	0.44

Note: Statistical significance considered for $p < 0.05$.

Analysis of the biopsy material collected on day 9 after the formation of the experimental wound in the control group showed massive infiltrates of granulocytes and macrophages, covering the entire volume of the preparations evaluated. In samples derived from wound biopsies of animals from the insulin group, only a small infiltration of inflammatory cells was observed, occurring mainly in the immediate vicinity of the margins of the healing wound, whereas in rats treated with

metformin (group II), the inflammatory infiltration was markedly greater than in sections of the insulin (group I) and control (group III) groups. This observation was consistent with the clinical picture evaluated on the basis of photographs (Figure 3).

Preliminary immunohistochemical assessment showed differences in the number of proliferative cell clusters, as evidenced by the increased proportion of Ki67 antigen

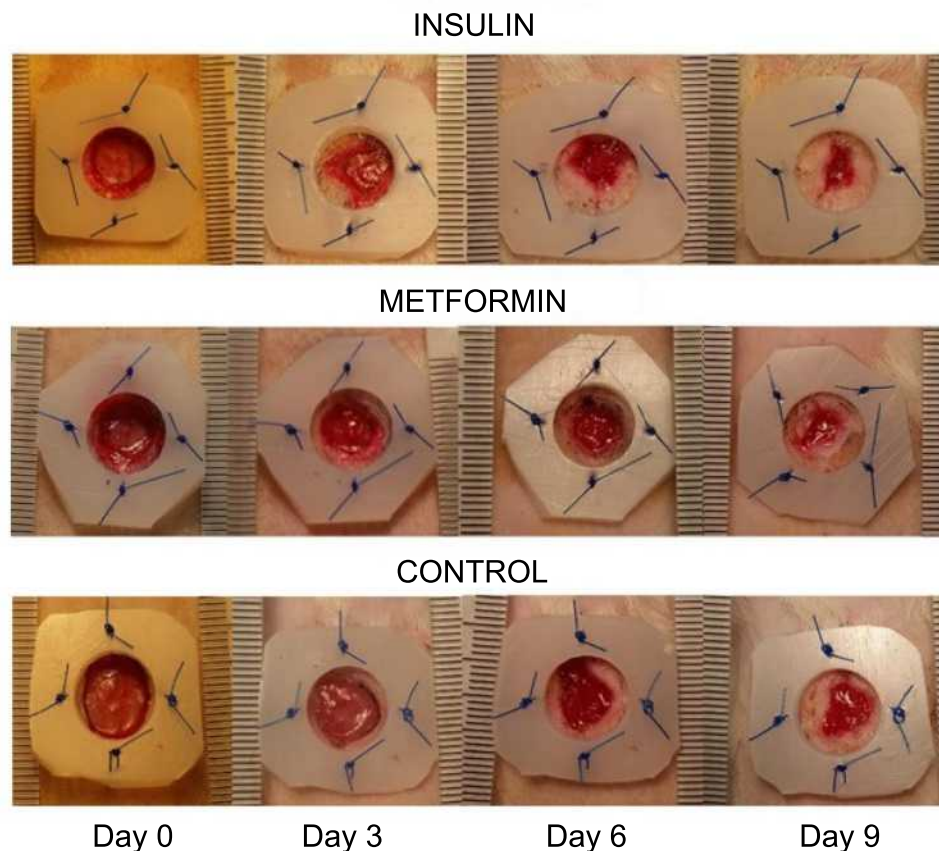


Figure 3 Changes in wound surface during observation.

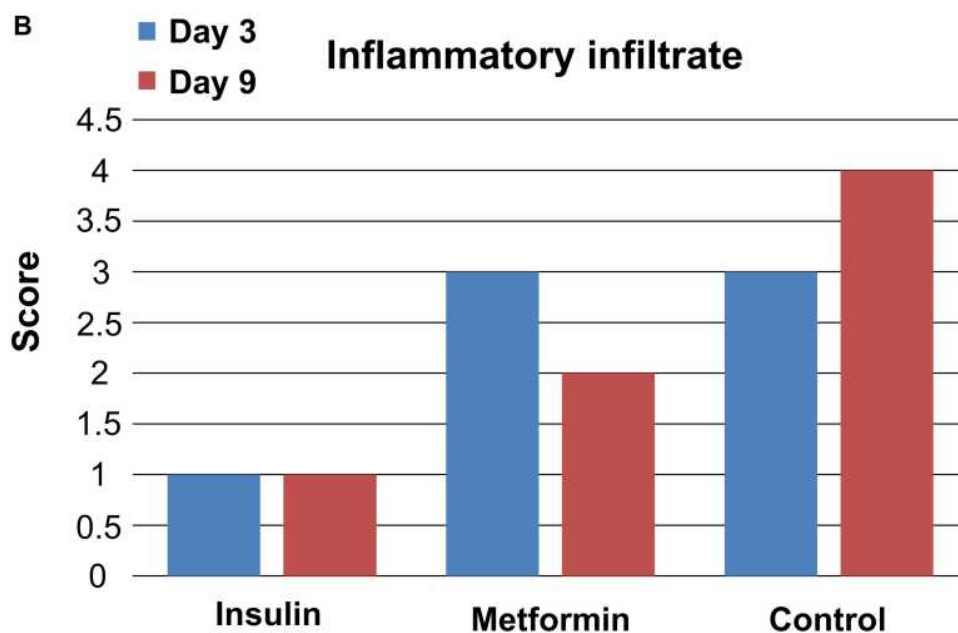
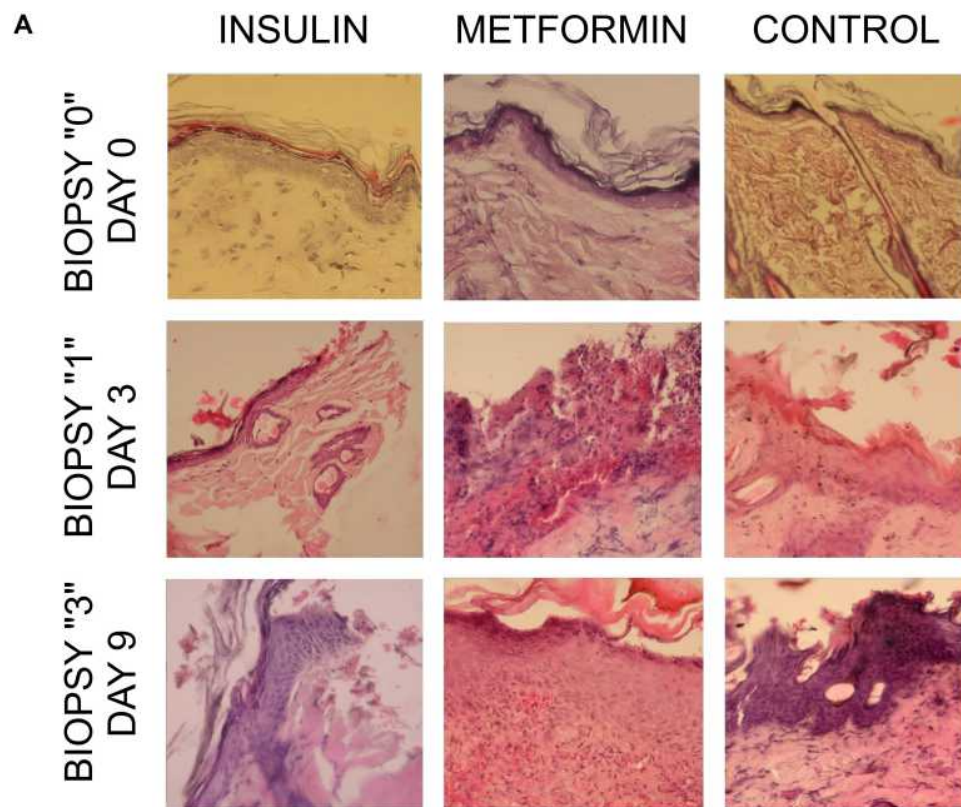


Figure 4 (A) Micrographs of selected rat wounds from groups I (insulin), II (metformin), and III (control), on days 0, 3, and 9 after wound formation. **(B)** Inflammatory infiltrate (statistical significance not calculated, owing to semiquantitative histological assessment): 0, no infiltrate; 1, weak infiltrate (<20% cells in assessed field revealing polymorphonuclear or mononuclear phenotype); 2, mild infiltrate (20%–39% cells revealing polymorphonuclear or mononuclear phenotype); 3, moderate infiltrate (40%–59% cells in assessed field revealing polymorphonuclear or mononuclear phenotype); 4, intense infiltrate with mild necrosis (60%–80% cells in assessed field revealing polymorphonuclear or mononuclear phenotype); 5, severe infiltrate with moderate or extensive necrosis (>80% cells in assessed field revealing polymorphonuclear or mononuclear phenotype).

staining in the insulin group (group I) compared with the metformin group (group II) (Figure 5).

Discussion

Until recently, it has been thought that the presence of a chronic wound in a diabetic patient is an absolute indication for insulin treatment and withdrawal of oral antidiabetic drugs. The experience of the last decade has shown that it is possible to treat this group of patients with oral antidiabetic drugs. However, this approach concentrates on glycemia normalization. The question is whether the wound healing effect in diabetic patients with chronic wounds depends only on glycemia normalization or whether it depends on additional molecular pathways regulated by insulin or other antidiabetic agents.

In our study, we evaluated the effect of selected diabetes medications on the wound healing process in a rat model of streptozotocin-induced diabetes accompanied by neuropathy and chronic hyperglycemia. It is necessary to

emphasize that such a study depends on an optimal model of wound healing. In this study, we selected a model that aims to reflect the conditions of the analogous process of diabetic wound healing in human beings as closely as possible. Therefore, a chronic wound model developed during a pilot study was used.²⁵ The duration of hyperglycemia in rats in our study may reflect the long-term uncompensated course of diabetes in human beings.

The results of pain threshold measurements confirm the onset of developing sensory neuropathy in the studied rats as early as day 7 after the administration of streptozotocin (Table 1). In human beings, the process of neuropathy development is slower, and, in addition to the existence of diabetes per se, is influenced by such factors as age, glycemic control, elevated levels of cholesterol and triglycerides, hypertension, obesity, and smoking. A study assessing the presence of diabetes complications, EURODIAB IDDM,²⁶ which examined more than 3000 patients treated with insulin from 16 countries, initially

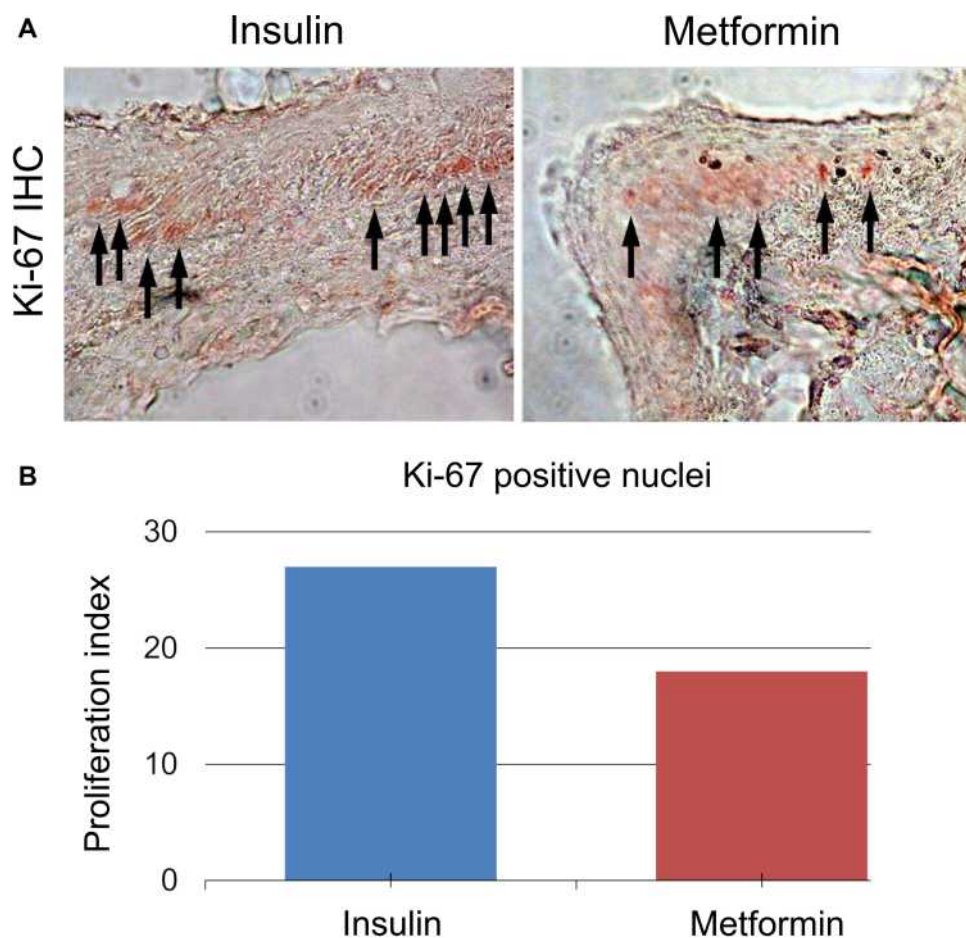


Figure 5 (A) Immunohistochemical assessment with Ki-67 antigen staining in the insulin- and metformin-treated groups (black arrows indicate proliferation centers saturated with Ki-67). (B) Proliferation index, expressed as the percentage of Ki-67-positive nuclei among basal and suprabasal epithelial cells, visualized through immunohistochemical staining (statistical significance not calculated, owing to semiquantitative histological assessment).

found neuropathy in 28% of patients; after 7 years of observation, an increase to 51.5% was recorded. Therefore, our observations based on a rat model are able to provide answers to important clinical questions, because it is possible to reproduce similar conditions in few weeks, while, in the case of a human model, researchers would need many years. Bujalska et al used such a methodology to evaluate the process of developing diabetic neuropathy.²⁷

Another issue is wound generation. Most current animal models are based on the formation of acute wounds, which are then subjected to factors responsible for their conversion into chronic wounds, for example, through the development of ischemia (eg, damage associated with pressure) or diabetes. In our study, we present a model imitating the conditions of a chronic wound in patients with diabetes. The inflammation phase is lengthened, the concentration of growth factors and proliferative phase cells is reduced, and neovascularization is impaired.²⁸ Thanks to the procedures applied, such as maintaining the state of hyperglycemia for a long time, the use of bacterial lipopolysaccharides, and inhibition of the participation of the panniculus carnosus muscle in the species-specific process of rapid wound healing after injury (by silicone plate placement), it was possible to reflect the conditions of the wound environment observed in a patient with long-term uncontrolled diabetes in the best possible manner. Without the aforementioned modifications, the healing time would have been much shorter (5 to 7 days) than was the case in this study, and could not accurately reflect the healing conditions of a chronic wound.²⁹

We have selected a rat model with streptozotocin-induced diabetes. Although it is not a strict model of type 2 diabetes, we chose it because the evaluation of oral antidiabetic drugs in an animal model of streptozotocin-induced diabetes has become increasingly common practice.³⁰ This is partly due to economic aspects but is primarily because it enables the long-term complications of diabetes to be observed within a short time of its induction with streptozotocin. Moreover, it is worth mentioning that oral medications (eg, dapagliflozin) are already approved for the treatment of special cases of type 1 diabetes and a number of studies have been conducted with the use of biguanides (metformin) in this group of patients.^{31–33} Therefore, this model can also be applied to studies of type 2 diabetes.³⁴

Insulin and metformin were chosen for assessment as they are the most commonly used drugs in the treatment of

diabetes in human beings. The effect of each drug was assessed both by evaluating the percentage of wound surface area reduction, using a novel measuring device, and by immunohistochemical assessment of changes in the expression of Ki67 antigen in the studied biopsy specimens.³⁵ Analysis of variance revealed a significant influence of the treatment method (insulin, metformin, or control) on the relative change in wound area. In our study, it was shown that the wound healing rate was faster in rats receiving insulin than in rats receiving metformin or saline. The rate of wound healing in rats is significantly different from that in human beings; thus, the individual wound healing phases occur at much shorter time intervals.³⁶ For this reason, the changes observed over the course of just 3 days of wound treatment in rats may indicate significant differences in the effectiveness of the tested molecule. It was shown that insulin was more efficient than metformin or control treatment in wound area reduction, without any observable differences between metformin and control treatment at any stage. In addition, differences in the concentration of staining of proliferative cell clusters were also demonstrated, as evidenced by the increased Ki67 staining in the group of rats receiving insulin compared with the group receiving metformin and the control group, while maintaining analogous glucose levels. Many authors use the assessment of Ki-67 reactivity to confirm the effectiveness of drug molecules or to show the mechanism of repair processes.^{12,37}

Thus, our results demonstrate that insulin treatment tends to be more efficient in wound healing in our diabetic model than metformin, irrespective of the effect of glycaemic normalization. This could indicate that insulin and metformin trigger different molecular pathways that influence wound healing in different ways. Although we did not investigate certain molecular pathways in our study, other authors provide insight into that process.

A number of basic studies performed on other animal models (*Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans*) provide arguments that insulin and insulin-like growth factor 1 (IGF-1) mediate activation of the PI3K/Akt signaling pathway, stimulating epithelial cell migration and wound healing. Moreover, Kakanj et al showed that the expression of a dominant-negative version of the insulin receptor in *D. melanogaster* results in decreased wound healing is associated with the inhibition of translocation of the forkhead box O (FOXO) transcriptional factor from the nucleus to the cytoplasm.³⁸ It should also be emphasized that insulin directly stimulates the

proliferation of keratinocytes through the PI3K/Akt pathway and activates their migration through the activation of Rac1 GTPase, enhancing the entire process of wound healing.^{39,40} Recently, the beneficial effect of topical insulin on wounds has also been observed.⁴¹ The increase in levels of glucose transporter 1 (GLUT1) protein and its translocation from the cytosol to the cell membrane of the basal epidermal cells demonstrate that diabetic skin tissue is characterized by insulin responsiveness.⁴²

By contrast, metformin activates different molecular pathways, which might play a detrimental role in wound healing. Lee et al suggested that metformin inhibits the mTOR pathway, promoting apoptosis, as demonstrated in a study on bile duct cancer cells.²⁹ Metformin has been shown to be antiproliferative in a number of studies demonstrating its additional antitumor effect.⁴³ Such an antiproliferative effect, although desired in antitumor therapy, is not beneficial in wound healing treatment. This mechanism might explain why metformin therapy, which normalizes glycemia, does not provide any beneficial effect on wound healing, compared with the control group in our study.

There is no unambiguous consensus between researchers on the effect of metformin on wound healing, and the results of studies published so far are contradictory. Verma et al showed, in an *in vivo* model of mice, that metformin affects the oxidation, metabolism, and proliferation of head and neck squamous cell carcinoma cells.⁴⁴ After 5 days, subjects receiving metformin had a significant increase ($p < 0.05$) in tumor oxygen saturation and hemoglobin concentration levels in treated tumors compared with untreated control subjects, with fluorescence imaging revealing a 46% decrease in 2-deoxy-D-glucose uptake compared with control subjects. In addition, a statistically significant reduction of Ki-67 antigen staining clusters was found, while smaller tumor sizes were observed using magnetic resonance imaging.⁴⁴ As far as the tumorigenic process is concerned, this appears to be beneficial, whereas a stimulating effect on cell proliferation would be more desirable for wound healing. Different results showing the effect of metformin on wound healing also result from the method of administration (orally or topically, directly to the wound). Qing et al suggest a positive effect of topically applied metformin on wound healing through inhibition of the AMP-activated protein kinase (AMPK) pathway, which leads to macrophage differentiation toward the M2 population.⁴⁵ However, Bagheri et al,⁴⁶ who assessed the effect of

metformin and photomodulation on wound healing in rats, confirmed the positive effect of metformin on the differentiation of macrophages in the M2 population, but did not find a positive relationship between the number of M2 macrophages and wound strength. Bagheri et al explain this by pointing to the inhibitory effect of photomodulation on the development of the M2 macrophage population.⁴⁶

Owing to the aforementioned methodologic approach, we were able to conduct a study using an animal model that reflects the conditions of diabetic wound healing in human beings in many aspects. The innovative element of this study is the comparison of the effects of insulin and metformin under similar conditions—poor glycemic control, which is often observed in clinical settings in patients with long-term diabetes.

Another modification in our study was the assessment of the wound surface area using a photoplanimetric method, implemented using the Planimator app, which allows precise measurement of the ulcer surface area. In our previous pilot study, a thermal imaging camera was used, which appeared to give high sensitivity and specificity. However, although thermal imaging provided information about the current metabolic status of the wound, it did not allow accurate measurement of the wound's surface area. In this study, the Planimator app was used for the first time to assess the wound surface area precisely. Preliminary test data indicate greater accuracy and repeatability of surface area measurements made using this application compared with assessments using commercial devices, such as Visitrak[®] (Smith & Nephew, Watford, UK) or SilhouetteMobile[®] (Aranz Medical, Christchurch, New Zealand).²⁵ The app was developed at the Institute of Biocybernetics and Biomedical Engineering of the Polish Academy of Sciences (Warsaw, Poland), with the intention of producing, for everyday use by medical personnel, a simple accurate measurement method using two rulers.⁴⁷ The digital photoplanimetric method used in the Planimator app was recently improved, based on a proposed adaptive calibration, which increases measurement accuracy and precision at curved surfaces.⁴⁸

Study Limitations

Given the complexity of the processes that occur in chronic wounds in adults, particularly in people with diabetes, there is no single animal model that can perfectly reproduce human conditions. Therefore, our goal was to

choose the optimal model that would suit our study and that could be further modified, if required.

In our study, we used streptozotocin to destroy beta cells in order to produce diabetes in the study animals. There are many animal models of diabetes, including commercially available genetically modified mice or rats, but owing to the financial limitations of the study, genetically modified animals were not used. Each of the aforementioned models allows some insight into the wound healing process in diabetes; the problem is that there are many different protocols, used by different laboratories, making it difficult to compare models and results. Based on the current literature, it is difficult to determine which of the models described is optimal, owing to the many different output parameters (eg, different animal ages or wound sizes) and the adopted conditions and objectives of each study (eg glycemic ranges).

Another important aspect is the difference in biomechanical conditions used in forming and permanently affecting a specific wound. In DFS, one of the main factors in the formation of wounds is pressure on the sole surface of the foot, which, in combination with sensory disturbances and delayed skin regeneration processes (autonomic neuropathy), initially results in thickening of the stratum corneum (forming a callus), and then the formation of wounds. In our study, wounds imitating those found in human beings were created “artificially”. Owing to its location on the animal’s dorsum, which allows a consistently sized ulcer to be reproduced, there is no constant pressure on its surface, which is often the cause of long and complicated treatment of similar wounds in human beings. It is worth noting, however, that a basic part of the treatment of ulcers in DFS is the patient’s use of pressure-relieving footwear or even an absolute ban on applying pressure on the limb. A situation in which there is a lack of biomechanical pressure on a wound formed on a rat’s dorsum can therefore be a good representation of a patient’s compliance with recommendations for pressure relief.

In the study, metformin and insulin were not used in combined administration in any group; this might have yielded different study results.

In addition, at the beginning of the study, we did not have devices for assessing wounds in 3D projection, ie for assessing the depths of wounds; such devices are now more easily available.

Conclusion

Our study provides evidence that insulin accelerates wound healing in a rat model of diabetes with neuropathy and under

chronic hyperglycemia, causing increased expression of Ki67 antigen and a reduced wound surface, and that this effect does not depend solely on glycemia normalization. The results obtained in this study may prompt investigations into the broader influence of antidiabetic drugs, including insulin, on the mechanisms of wound healing in diabetes. In the next phases of our study, we will attempt to establish these mechanisms and to explain, molecularly, the noticeable acceleration of wound healing under hyperglycemia in patients treated with insulin.

Abbreviations

b.m., body mass; AMPK, AMP-activated protein kinase; ANOVA, analysis of variance; DFS, diabetic foot syndrome; FOXO, forkhead box O; NADPH, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; SGLT-2, sodium-glucose co-transporter-2.

Funding

The study was funded by the statute fund of the Department of Diabetology and Internal Diseases of Medical University of Warsaw for 2016 and the Mini Student Grant of the Medical University of Warsaw for 2015/2016, number 1WO/NM1/2014.

Disclosure

The authors report no conflicts of interest in this work.

References

- Najafian Y, Khorasani ZM, Najafi MN, et al. Efficacy of aloe vera/plantago major gel in diabetic foot ulcer: a randomized double-blind clinical trial. *Curr Drug Discov Technol.* 2019;16(2):223–231. doi:10.2174/1570163815666180115093007
- Armstrong DG, Boulton AJ, Bus SA. Diabetic foot ulcers and their recurrence. *N Engl J Med.* 2017;376:2367–2375. doi:10.1056/NEJMra1615439
- Jeffcoate WJ, Chipchase SY, Ince P, Game FL. Assessing the outcome of the management of diabetic foot ulcers using ulcer-related and person-related measures. *Diabetes Care.* 2006;29(8):1784–1787. doi:10.2337/dc06-0306
- Prompers L, Schaper N, Apelqvist J, et al. Prediction of outcome in individuals with diabetic foot ulcers: focus on the differences between individuals with and without peripheral arterial disease. The EURODIALE Study. *Diabetologia.* 2008;51(5):747–755. doi:10.1007/s00125-008-0940-0
- International Diabetes Federation. *Time to Act: Diabetes and Foot Care.* Brussels: International Diabetes Federation; 2005.
- Lu Q, Wang J, Wei X, et al. Cost of diabetic foot ulcer management in China: a 7-year single-center retrospective review. *Diabetes Metab Syndr Obes.* 2020;13:4249–4260. doi:10.2147/DMSO.S275814
- Patel DK, Strong J. The pleiotropic effects of sodium-glucose cotransporter-2 inhibitors: beyond the glycemic benefit. *Diabetes Ther.* 2019;10(5):1771–1792. doi:10.1007/s13300-019-00686-z
- 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. doi:10.1038/jid.2011.176

9. Marhoffer W, Stein M, Maeser E, Federlin K. Impairment of polymorphonuclear leukocyte function and metabolic control of diabetes. *Diabetes Care*. 1992;15(2):256–260. doi:10.2337/diacare.15.2.256
10. Geerlings SE, Hoepelman AI. Immune dysfunction in patients with diabetes mellitus (DM). *FEMS Immunol Med Microbiol*. 1999;26:259–265. doi:10.1111/j.1574-695X.1999.tb01397.x
11. Witko-Sarsat V, Rieu P, Descamps-Latscha B, et al. Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Lab Invest*. 2000;80:617–653.
12. 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*. 2012;11(4):373–378. doi:10.1111/j.1742-481X.2012.01100.x
13. Davidson JM. Animal models for wound repair. *Arch Dermatol Res*. 1998;290(Suppl 1):S1–S11. doi:10.1007/PL00007448
14. Dorsett-Martin WA. DVM rat models of skin wound healing: a review. *Wound Rep Regen*. 2004;12:591–599. doi:10.1111/j.1067-1927.2004.12601.x
15. Small animal anesthesia and analgesia. Polish National Ethical Committee for animal experiments; Good practices. Available from: <http://www.bip.nauka.gov.pl/dobre-praktyki/>. Accessed May 30, 2019.
16. Nakhoda A, Wong HA. The induction of diabetes in rats by intramuscular administration of streptozotocin. *Experientia*. 1979;35:1679–1680. doi:10.1007/BF01953269
17. Randall LO, Selitto JJ. A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue. *Arch Int Pharmacodyn Ther*. 1957;111:409–419.
18. Pinheiro LS, de Melo AD, Andreazzi AE, et al. 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):356–360.
19. Ozturk Y, Aydin S. Effects of streptozotocin-induced diabetes and insulin on calcium responsiveness of the rat vas deferens. *Life Sci*. 2006;78:1084–1090. doi:10.1016/j.lfs.2005.06.019
20. Gotttrup 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;8:83–96. doi:10.1046/j.1524-475x.2000.00083.x
21. Ngawhirunpat T, Hatanaka T, Katayama K, et al. Changes in electrophysiological properties of rat skin with age. *Biol Pharm Bull*. 2002;25(9):1192–1196. doi:10.1248/bpb.25.1192
22. Babaei S, Bayat M, Nouruzian M, Bayat M. Pentoxifylline improves cutaneous wound healing in streptozotocin-induced diabetic rats. *Eur J Pharmacol*. 2013;700:165–172. doi:10.1016/j.ejphar.2012.11.024
23. 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. doi:10.1016/j.joen.2014.04.001
24. Foltynski P. Ways to increase precision and accuracy of wound area measurement using smart devices: advanced app planimator. *PLoS One*. 2018;13(3):e0192485. doi:10.1371/journal.pone.0192485
25. Mrozkiewicz-Rakowska B, Mieczkowski M, Siwko TJ, et al. Nowy Model Ran Przewlekłych W Cukrzycy – Badanie Pilotażowe U Szczurów Rasy Wistar [New model of chronic wounds in Wistar rats – pilot study]. *Leczenie Ran*. 2015;12(1):33–39.
26. Tesfaye S, Chaturvedi N, Eaton SEM, et al. Vascular risk factors and diabetic neuropathy. *N Engl J Med*. 2005;352:341–350. doi:10.1056/NEJMoa032782
27. Bujalska M, Tatariewicz J, de Cordé A, Gumułka SW. Effect of cyclooxygenase and nitric oxide synthase inhibitors on streptozotocin-induced hyperalgesia in rats. *Pharmacology*. 2008;81(2):151–157. doi:10.1159/000110787
28. Falanga V. Wound healing and its impairment in the diabetic foot. *Lancet*. 2005;366(9498):1736–1743. doi:10.1016/S0140-6736(05)67700-8
29. Lee J, Hong EM, Kim JH, et al. Metformin induces apoptosis and inhibits proliferation through the AMP-activated protein kinase and insulin-like growth factor 1 receptor pathways in the bile duct cancer cells. *J Cancer*. 2019;10(7):1734–1744. doi:10.7150/jca.26380
30. Gebremeskel L, Beshir Tuem K, Teklu T. Evaluation of antidiabetic effect of ethanolic leaves extract of *Becium grandiflorum* Lam. (Lamiaceae) in streptozotocin-induced diabetic mice. *Diabetes Metab Syndr Obes*. 2020;13:1481–1489. doi:10.2147/DMSO.S246996
31. Paik J, Blair HA. Dapagliflozin: a review in type 1 diabetes. *Drugs*. 2019;79:1877–1884.
32. Petrie JR, Chaturvedi N, Ford I, et al. Cardiovascular and metabolic effects of metformin in patients with type 1 diabetes (REMOVAL): a double-blind, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2017;5(8):597–609. doi:10.1016/S2213-8587(17)30194-8
33. Beysel S, Unsal IO, Kizilgul M, et al. The effects of metformin in type 1 diabetes mellitus. *BMC Endocr Disord*. 2018;18(1):1. doi:10.1186/s12902-017-0228-9
34. Zhang M, Lv XY, Li J, Xu ZG, Chen L. The characterization of high-fat diet and multiple low-dose streptozotocin induced type 2 diabetes rat model. *Exp Diabetes Res*. 2008;2008:704045. doi:10.1155/2008/704045
35. Juriková M, Danihel L, Polák S, Varga I, Ki67, PCNA, and MCM proteins: markers of proliferation in the diagnosis of breast cancer. *Acta Histochem*. 2016;118:544–552. doi:10.1016/j.acthis.2016.05.002
36. Galiano RD, Michaels J, Dobryansky M, Levine JP, Gurtner GC. Quantitative and reproducible murine model of excisional wound healing. *Wound Repair Regen*. 2004;12(4):485–492. doi:10.1111/j.1067-1927.2004.12404.x
37. Chen Y, Zhang Q, Wu Y, Branch-Brooks CD, Butler CE. Short-term influences of radiation on musculofascial healing in a laparotomy rat model. *Sci Rep*. 2019;9:11896. doi:10.1038/s41598-019-48201-5
38. Kakanj P, Moussian B, Grönke S, et al. Insulin and TOR signal in parallel through FOXO and S6K to promote epithelial wound healing. *Nat Commun*. 2016;7:12972. doi:10.1038/ncomms12972
39. Sabater AL, Andreu EJ, García-Guzmán M, et al. Combined PI3K/Akt and Smad2 activation promotes corneal endothelial cell proliferation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2017;58(2):745–754. doi:10.1167/iovs.16-20817
40. Hashmi S, Marinkovic MP. Biology of the basement membrane zone. In: Murrell DF, editor. *Blistering Diseases: Clinical Features, Pathogenesis, Treatment*. Berlin Heidelberg: Springer Verlag; 2015:3–20.
41. Wang J, Xu J. Effects of topical insulin on wound healing: a review of animal and human evidences. *Diabetes Metab Syndr Obes*. 2020;13:719–727. doi:10.2147/DMSO.S237294
42. Yu T, Gao M, Yang P, et al. Topical insulin accelerates cutaneous wound healing in insulin-resistant diabetic rats. *Am J Transl Res*. 2017;9(10):4682–4693.
43. Irie H, Banno K, Yanokura M, et al. Metformin: a candidate for the treatment of gynecological tumors based on drug repositioning. *Oncol Lett*. 2016;11(2):1287–1293. doi:10.3892/ol.2016.4075
44. Verma A, Rich LJ, Vincent-Chong VK, Seshadri M. Visualizing the effects of metformin on tumor growth, vascularity and metabolism in head and neck cancer. *J Oral Pathol Med*. 2018;47(5):484–491. doi:10.1111/jop.12705
45. Qing L, Fu J, Wu P, et al. Metformin induces the M2 macrophage polarization to accelerate the wound healing via regulating AMPK/mTOR/NLRP3 inflammasome signaling pathway. *Am J Transl Res*. 2019;11(2):655–668.
46. Bagheri M, Mostafavinia A, Abdollahifar MA, et al. Combined effects of metformin and photobiomodulation improve the proliferation phase of wound healing in type 2 diabetic rats. *Biomed Pharmacother*. 2020;123:109776. doi:10.1016/j.biopha.2019.109776

47. Foltynski P, Ladyzynski P, Ciechanowska A, et al. Wound area measurement with digital planimetry: improved accuracy and precision with calibration based on 2 rulers. *PLoS One*. 2015;10:e0134622. doi:10.1371/journal.pone.0134622
48. Foltynski P, Ladyzynski P. Digital planimetry with a new adaptive calibration procedure results in accurate and precise wound area measurement at curved surfaces. *J Diabetes Sci Technol*. 2020;193229682095934. doi:10.1177/1932296820959346

Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy

Dovepress

Publish your work in this journal

Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy is an international, peer-reviewed open-access journal committed to the rapid publication of the latest laboratory and clinical findings in the fields of diabetes, metabolic syndrome and obesity research. Original research, review, case reports, hypothesis formation, expert opinion

and commentaries are all considered for publication. The manuscript management system is completely online and includes a very quick and fair peer-review system, which is all easy to use. Visit <http://www.dovepress.com/testimonials.php> to read real quotes from published authors.

Submit your manuscript here: <https://www.dovepress.com/diabetes-metabolic-syndrome-and-obesity-targets-and-therapy-journal>



Review

The Problem of Wound Healing in Diabetes—From Molecular Pathways to the Design of an Animal Model

Mateusz Mieczkowski ^{1,†} , Beata Mrozikiewicz-Rakowska ^{1,*,†} , Michał Kowara ² , Marcin Kleibert ^{1,2} and Leszek Czupryniak ¹

¹ Department of Diabetology and Internal Diseases, Medical University of Warsaw, 02-097 Warsaw, Poland; mateusz.mieczkowski@gmail.com (M.M.); marcin.kleibert@gmail.com (M.K.); leszek.czupryniak@wum.edu.pl (L.C.)

² Chair and Department of Experimental and Clinical Physiology, Laboratory of Centre for Preclinical Research, Medical University of Warsaw, Banacha 1b, 02-097 Warsaw, Poland; michal.kowara@wum.edu.pl

* Correspondence: rakowskab123@gmail.com

† These authors contributed equally to this work.

Abstract: Chronic wounds are becoming an increasingly common clinical problem due to an aging population and an increased incidence of diabetes, atherosclerosis, and venous insufficiency, which are the conditions that impair and delay the healing process. Patients with diabetes constitute a group of subjects in whom the healing process is particularly prolonged regardless of its initial etiology. Circulatory dysfunction, both at the microvascular and macrovascular levels, is a leading factor in delaying or precluding wound healing in diabetes. The prolonged period of wound healing increases the risk of complications such as the development of infection, including sepsis and even amputation. Currently, many substances applied topically or systemically are supposed to accelerate the process of wound regeneration and finally wound closure. The role of clinical trials and preclinical studies, including research based on animal models, is to create safe medicinal products and ensure the fastest possible healing. To achieve this goal and minimize the wide-ranging burdens associated with conducting clinical trials, a correct animal model is needed to replicate the wound conditions in patients with diabetes as closely as possible. The aim of the paper is to summarize the most important molecular pathways which are impaired in the hyperglycemic state in the context of designing an animal model of diabetic chronic wounds. The authors focus on research optimization, including economic aspects and model reproducibility, as well as the ethical dimension of minimizing the suffering of research subjects according to the 3 Rs principle (Replacement, Reduction, Refinement).

Keywords: animal model; molecular mechanism; diabetic foot syndrome; chronic wound



Citation: Mieczkowski, M.; Mrozikiewicz-Rakowska, B.; Kowara, M.; Kleibert, M.; Czupryniak, L. The Problem of Wound Healing in Diabetes—From Molecular Pathways to the Design of an Animal Model. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 7930. <https://doi.org/10.3390/ijms23147930>

Academic Editor: Desire' Pantalone

Received: 30 June 2022

Accepted: 13 July 2022

Published: 19 July 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Epidemiological data clearly show that diabetes mellitus (DM) has long been a challenge for the representatives of the medical world and healthcare-financing entities. Estimates show that the number of DM cases and diabetic complications worldwide is increasing, including difficult-to-heal wounds, with the most representative example being diabetic foot syndrome (DFS). It is assessed that during the lifetime of a patient with DM, the probability of DFS occurrence ranges from 5 to 25%, according to various authors. DFS is found in 10 to 20% of patients with diabetes, and detailed data from the USA report even 25% [1,2]. There are no exact data on what percentage of patients with DM have wounds of ischemic etiology or those resulting from venous insufficiency. The lack of such precise epidemiologic data may be due to the fact that the abovementioned etiologic factors of wounds, i.e., atherosclerotic lesions or venous insufficiency, which is less frequent, may coexist in a patient with DM at different rates simultaneously. In addition, impaired wound healing in diabetic patients results from comorbidities. Cellulitis is often the triggering factor for wound formation, which might be an indicator of increasing swelling resulting

from heart or kidney failure, a large percentage of which is due to changes caused by DM. Additionally, patients with DM are more vulnerable to injuries due to neuropathy. Regardless of its etiology, any wound that develops initially on the lower leg may become a precursor to DFS when it spreads below the ankle. When ulceration becomes infected, especially in the case of DFS due to impaired immune response in these patients, it can generate complications such as sepsis, amputation, and even death. In patients with DM who developed active ulceration within five years, the mortality rate has been reported to be as high as 40% [3]. Considering mortality following amputation, the figures are even more terrifying since they range from 13% to 40% at one year, 35% to 65% at three years, and 39% to even 80% at five years [1]. For this reason, research is conducted in scientific laboratories worldwide to produce molecules of both local and systemic action, which could accelerate wound healing and inhibit the development of inflammation at the lowest possible stage. Before these molecules can be used in humans, it is necessary to carry out studies in an animal model, which could demonstrate the safety and efficacy of such molecules. To achieve this goal, the protocol of animal studies should be optimized. Moreover, the variety of the choice of models for preclinical studies and related problems closely reflecting the pathophysiology of wound development in human DM can be challenging. In this paper, we summarize the current information related to the pathogenesis of impaired wound healing in DM in the context of the design of an animal model. Additionally, the paper presents the most important practical aspects of designing and selecting an animal model for preclinical studies on wound healing in DM.

2. Molecular Pathways of the Development of Chronic Wounds in DM

The source of impaired wound healing in DM is related to several overlapping mechanisms, presented in Figure 1. Endotheliopathy, which results in micro- and macrovascular changes, can lead to neuropathic changes, which significantly increase the risk of injury and delay in wound healing [4]. Macroangiopathic lesions, which usually occur later than microvascular changes, affect the supply of nutrients to the wound during vascular complications in DM. Importantly, although the studies investigating microvascular complications of DM, such as diabetic retinopathy, diabetic nephropathy and neuropathy, have used various animal models (e.g., streptozotocin or alloxan-induced DM in mice and rats, DM induced by transgenic procedures as in Akita mice), the mechanism leading to microvascular complications (microangiopathy) and created in these models is the same—hyperglycemia and other important changes such as impaired immune response or altered intracellular pathways [5]. Investigations of macrovascular changes are focused on animal models of specific macrovascular lesions, e.g., myocardial infarction or stroke. At a certain stage of the development of microangiopathic and macroangiopathic wound progression, revascularization is the only chance for wound healing. As yet, no vascular surgery techniques have allowed the restoration of the flow in microcirculation vessels (known as resistance subcutaneous arteries) due to the mostly irreversible nature of vessel wall remodeling and thrombotic and embolic closure. Firstly, the aim of the current studies should be to find optimal and possibly non-invasive assessment methods for the flow in the microvascular bed. This is extremely important when the changes in small arteries are potentially reversible, before significant thickening of the basement membrane and thrombotic and embolic occlusions occur. New MRI-based techniques used in preclinical studies on cerebral microcirculation in rodents might also be useful in diabetic wound studies [6]. Secondly, searching for microvascular revascularization methods and/or molecules and drugs preventing the occurrence of thrombotic and embolic changes and basal membrane thickening should be independent research directions [7,8]. Studies on both of these problems require designing an adequate animal model of wounds in DM, which will imitate impairment related to DM.

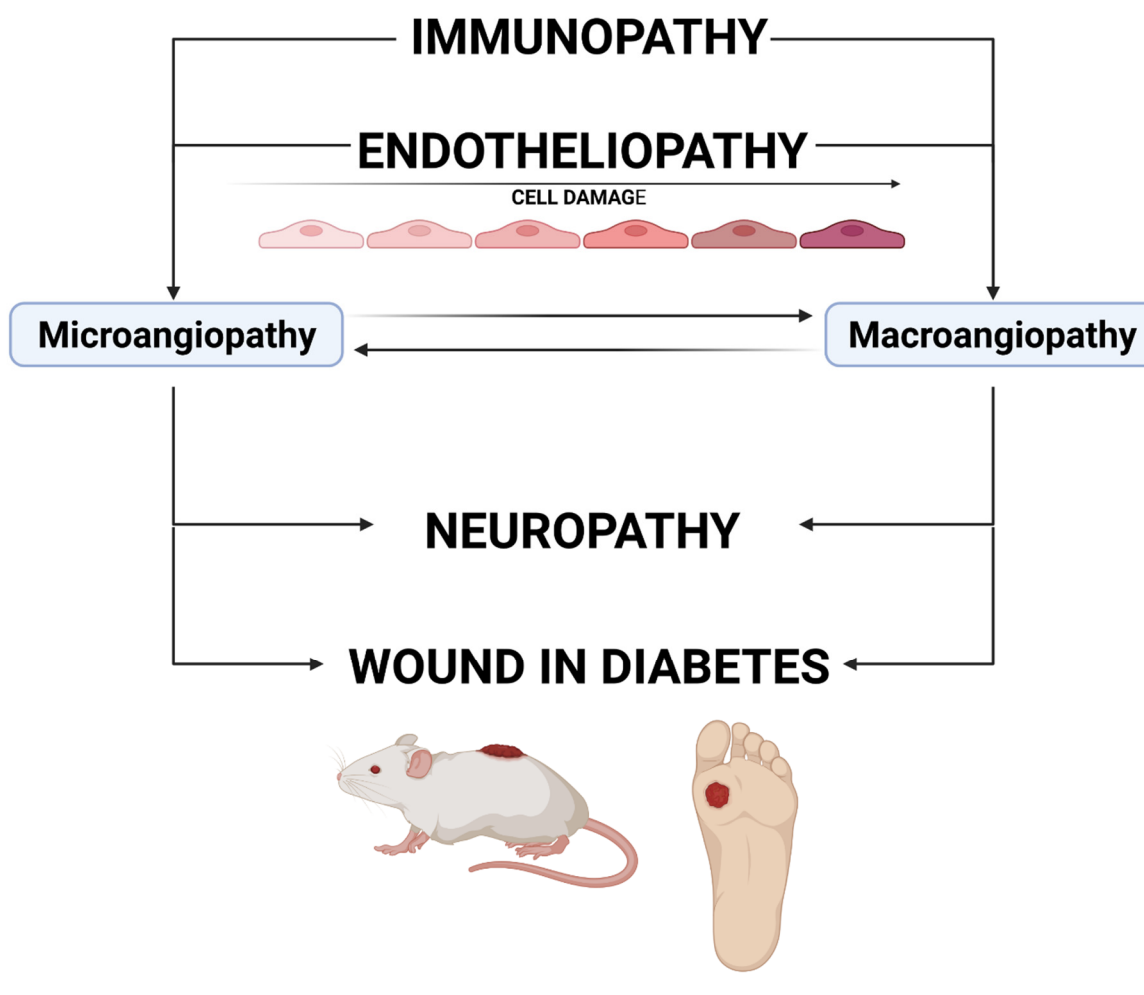


Figure 1. The mechanism of wound development in diabetes. Immunopathy and endotheliopathy are the causes of the development of microangiopathy and macroangiopathy. The impairment of blood supply (mainly lesions in the vasa nervorum) can cause neuropathy. All these pathologies lead to an increased risk of wound development and a delayed healing process. Created with BioRender.com.

2.1. Diabetic Endotheliopathy

Endotheliopathy plays a leading role due to impaired tissue metabolism in DM [9]. It is related to a disturbed reactivity of the vessel wall, which in long-term DM causes not only an impaired flow to distal parts but also, paradoxically, an overflow at the arteriolar level within the tissue, due to the formation of arteriovenous anastomoses (AVAs) [10,11]. Hyperglycemia affects endotheliopathy through pathways leading to microangiopathy, such as polyol, hexosamine, advanced glycation end-products (AGEs), and protein kinase C (PKC) pathways (Figure 2) [12]. Of these four pathways, the PKC pathway seems to affect endothelial vascular dysregulation most directly. Hyperglycemia may increase the synthesis of regulatory enzymes belonging to the PKC family independently or through increased diacylglycerol (DAG) synthesis. Activation of these enzymes results in endothelium-dependent dysfunction of microarterioles regulating contractility of the smooth muscle of vessels supplying distal tissue areas [13]. Moreover, endothelial dysfunction of small vessels results from the inhibition of the nitric oxide (NO) and endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) pathways and enhanced production of endothelin-1 and oxygen-free radicals [14]. Khamasi et al. showed that patients with DFS were characterized by increased levels of PKC δ , which was associated with inhibition of insulin signaling. This can be associated with delayed wound healing due to a restriction of oxygen and nutrient supply by impaired arteriole relaxation [15]. The abovementioned changes are also observed in animal models in studies on DM. A study on a mouse model showed that hyperglycemia

(developed in streptozotocin-induced diabetic mice) caused a significant increase in PKC- δ expression, which resulted in subsequent SHP-1 activation, PDGF downstream signaling reduction, cellular apoptosis, and the presence of acellular capillaries within the retina compared to non-diabetic control mice. These changes in diabetic mice were not reversible by insulin treatment. However, the aforementioned changes were not developed in transgenic *Prkcd* $-/-$ mice that lacked PKC- δ signaling. This study highlights the role of PKC- δ in the development of endotheliopathy [16]. In addition, a study on rat mesangial cells demonstrated that advanced glycation end products (AGEs) induced intracellular oxidation stress, which contributes to the development of pathological changes in DM [17]. Moreover, hyperglycemia in streptozotocin-induced diabetic mice causes neuronal injury, especially in the frontal cortex and amygdala, through inducible nitric oxide synthase (iNOS) overexpression [18]. The imitation of this process can be achieved by induction of hyperglycemia, which can induce enzyme synthesis and overactivation of the PKC pathway. Importantly, the PKC pathway, which seems to be crucial in the pathogenesis of DM is also up-regulated in *ob/ob* mice, which reflects type 2 DM, not only in streptozotocin-induced diabetic mice [18].

The polyol pathway leads to endotheliopathy through the decreased supply of NO in dysfunctional vessels by reducing NADPH in the cytosol. NADPH is necessary for the regeneration of glutathione, which has antioxidant properties, and also for the production of nitric oxide synthase (NOS) [19]. In the case of cytosolic deficiency of NADPH, uncoupling of eNOS does not occur, which results in decreased production of NO and increased production of oxygen free radicals, including ONOO $^-$ and O $^{2-}$. The formation of ROS products exacerbates endothelial cell dysfunction, thus mediating DNA damage [20]. Increased activity of the hexosamine pathway occurs due to hyperglycemia. The final stage of this pathway is related to the formation of UDP-N-Acetylglucosamine, which results in increased expression of TGF- β 1 and PAI-1. Under hyperglycemic conditions, a four-fold increase is reported in O-GlcNAcylation of the transcription factor Sp1, which participates in the development of endotheliopathy by activating TGF- β 1 and PAI-1 in arterial endothelial cells and the PAI-1 promoter in vascular smooth muscle cells. Additionally, activation of receptors for AGEs (RAGE) triggers NADPH oxidase, which enhances redox reactions and consequently causes further endothelial damage [21]. Not only does AGE cause damage to endothelial cells, but it also causes changes in the structure and function of extracellular (ECM) and intracellular (ICM) matrix proteins [19]. These processes delay wound healing due to the impaired activation of fibroblasts which secrete the ECM proteins. Moreover, it should be stressed that RAGE and PKC pathway upregulation results in increased NF- κ B factor signaling, mediating the synthesis of endothelin-1 and ICAM adhesion molecules, which results in increased migration of immune cells [22]. A study on obese hyperglycemic mice showed that administration of sEH inhibitor t-AUCB inhibited the degradation of epoxyeicosatrienoic acids (EETs) and could increase EDHF secretion, which resulted in the inhibition of microangiopathic lesion formation [23]. Animal models should imitate the impaired activation of the EDHF pathway due to its essential role in the pathogenesis of microangiopathy.

2.2. Diabetic Neuropathy

Most of the processes responsible for the development of endotheliopathy, including increased polyol pathway activity, AGE formation, and the PKC pathway, simultaneously lead to the development of neuropathy [24]. In addition to hyperglycemia, other factors such as glycemic variability, lipid disturbances, smoking, and alcohol abuse may influence the occurrence and severity of neuropathy symptoms [25]. Damage to the vasa nervorum, which supply various nerve fibers, such as C-type and delta fibers responsible for specific functions of the nervous system, is mainly responsible for impaired wound healing in DM and its recurrence, especially in DFS [26]. This highlights the importance of imitating neuropathic changes in the design of the animal model [27]. Impaired microcirculation in the skin in patients with DM occurs due to damage to the vasa nervorum caused

by thickening of the basal membrane of those arteries and their persistent occlusion by microclots. This leads to a decrease in oxygen partial pressure in patients with DFS despite preserved flow in the vascular bed [28]. This change results in sustained ischemia of distally located tissues and persistently decreased pH in this area, which activates Acid-Sensing Ion Channel-3 (ASIC3), responsible for transmitting pain signals [29,30]. However, its transmission may be impaired due to neuropathy. A study on nociception in *Ins2+/Akita* mice (a hereditary model of DM in which the disease develops in young animals after weaning) revealed reduced action potential discharge in mechanonociceptors compared with wild-type animals, which was reversed by restoration of normal glucose levels [31].

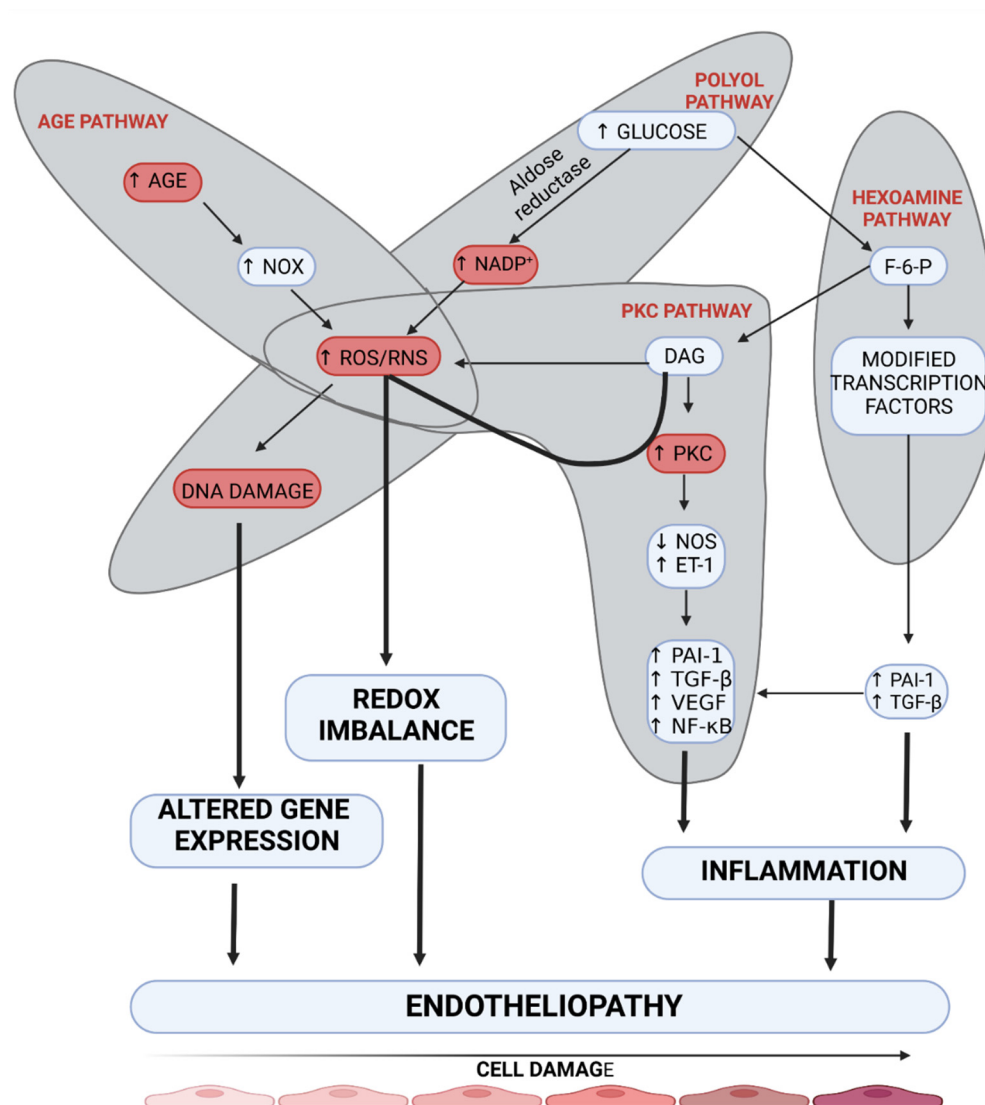


Figure 2. The mechanism of the development of endotheliopathy. Four main pathways are involved in the damage to endothelial cells (AGE pathway, polyol pathway, PKC pathway, and hexosamine pathway). Overactivation of these molecular pathways leads to inflammation, redox imbalance, and altered gene expression, which results in endotheliopathy. AGE—advanced glycation end-product, DAG—diacylglycerol, DNA—deoxyribonucleic acid, ET-1—endothelin-1, F-6-P—fructose 6-phosphate, NADP+—nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NF-κB—nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, NOS—nitric oxide synthase, NOx—nitrogen oxides, PAI-1—plasminogen activator inhibitor-1, PKC—protein kinase C, RNS—reactive nitrogen species, ROS—reactive oxygen species, TGF-β—transforming growth factor β, VEGF—vascular-endothelial growth factor. Created with BioRender.com.

Besides autonomic responses, unmyelinated C-type fibers are responsible for pain perception. Up to 70% of multifunctional C-fibers are present in the skin [32,33]. Their stimulation initiates neurogenic inflammation in response to neuropeptides released from sensory nerve endings. These neuropeptides include substance P and calcitonin gene-related peptide (CGRP), and their role is to regulate the activation of dendritic cells, mast cells, and T cells. Microangiopathy, which causes impaired secretion of these neuropeptides and neurotransmitters, results in not receiving signals by the immune system, whose cells cannot undertake their functions [32–34]. Thus, the cell signaling processes responsible for a normal immune response are strongly disrupted [35]. In the natural course of DM, particularly if long-standing and poorly compensated, the C-fiber function permanently deteriorates, inevitably causing impaired neurogenic inflammation responsible for neuropathic pain and the inadequate response to inflammation [36]. In this process, especially TRPV1, which is the transient receptor potential vanilloid subfamily member, plays a significant role [29]. TRPV1 receptors are located in sensory nerve fibers and some vascular endothelial and smooth muscle cells. Of note, they participate in the integration of pain stimulus transmission. Besides inflammation in the wound, activation of TRPV1 is an additional factor that triggers pain sensation. Paradoxically, due to this neurogenic damage and due to lesions, the transmission of information about the emerging features of infection in a wound occurs with a delay or does not occur at all (e.g., in DFS). With regard to the immune changes occurring in the microcirculation in DM, the term immunocompromised district theory has been adopted [37].

2.3. Diabetic Immunopathy

Impaired wound healing in the course of ulceration results most often from an ongoing infectious process. A typical feature of chronic wounds is an increased concentration of metalloproteinases, which causes damage to the formation of granulation tissue [38]. A chronic wound in a hyperglycemic environment is subjected to special conditions. Due to the impaired functioning of immune system cells in this environment, some processes can be overactivated, with simultaneous underactivation of others. The immune system plays an important role in sustaining subclinical inflammation under conditions of developing hyperglycemia, as seen in individuals with obesity or in those who have already developed type 2 DM (Figure 3). It seems that hyperglycemia causes significant impairment of cell-dependent and humoral defense functions, which results in the long-term persistence of bacteria in the biofilm form in wounds in diabetic patients. Additionally, decreased myeloperoxidase and superoxide dismutase activities have been demonstrated in azurophilic granules of neutrophils in patients with persistent long-term hyperglycemia, which also causes delayed wound healing. Moreover, the aerobic mechanisms (production of ROS and respiratory burst) responsible for microbial inactivation by neutrophil granulocytes are impaired in DM. This is caused by, among others, excessive activation of the polyol pathway in DM, inducing NADPH deficiency, which prevents the generation of oxygen free radicals. It results in an impaired non-specific removal of pathogens, which is one of the key mechanisms of innate immunity. Furthermore, reduced activity of insulin-dependent enzymes in neutrophil granulocytes, causing impaired neutrophil migration, is also affected by relative insulin deficiency associated with insulin resistance in type 2 DM, or its complete absence in type 1 DM. Monocyte- and macrophage-dependent processes, such as chemotaxis and phagocytosis, are also impaired [39–41]. A decrease in adaptive immunity is observed due to the impaired activation of antigen-presenting cells (APCs). In the hyperglycemic milieu, increased mast cell degradation and increased recruitment of proinflammatory M1 macrophages were also shown to be responsible for the impaired cellular response and prolonged inflammation, which can also cause a delay in wound healing [42]. All the above processes are collectively defined as diabetic immunopathy [4]. It is important to imitate all these changes during the design of animal models due to their vital role in wound healing. Although diabetes also causes changes to the immune system in animals, these changes differ from the corresponding changes in humans. First, immune

systems of mice or rats do not perfectly reflect the human immune system (e.g., there are two main subpopulations of monocytes in mice i.e., Ly6Chi and Ly6Cl α) [43]. Second, it is difficult to extrapolate the exact pathogenesis of type 2 DM or even type 1 DM from humans to mice. For example, streptozotocin-induced DM, which is a common mice model, does not reflect autoimmune processes in the islets because it causes chemical (but not autoimmune) cell destruction. Therefore, developing new models and modifying the currently existing models in order to reflect immune processes in a more accurate way would be warranted. For instance, a model showing the experimental autoimmune reaction against pancreatic islets could reflect the natural pathogenesis of type 1 DM. Experience from similar models such as experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), a rodent model used in studies on multiple sclerosis, would be useful in generation of the above-mentioned hypothetical model [44].

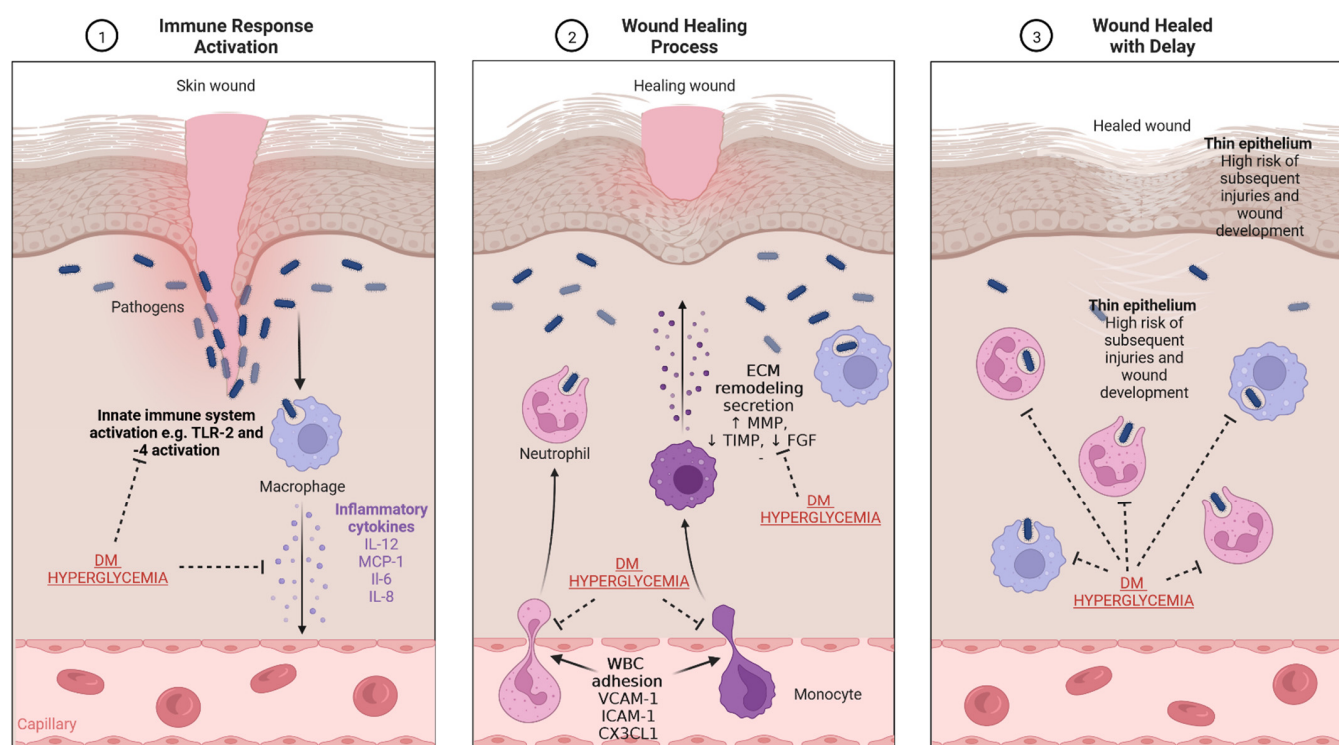


Figure 3. The mechanism of wound healing and impairment related to DM and hyperglycemia. (1) Immune response activation—the presence of pathogens, which enter through the damaged epithelium, leads to activation of innate immune response and secretion of inflammatory cytokines. (2) Wound healing process—secreted cytokines stimulate WBC diapedesis; macrophages and monocytes secrete substances which lead to re-epithelialization and ECM production and remodeling. (3) Wound healed with delay—the impaired physiological processes related to wound healing in diabetes result in the presence of thinner epithelium and an increased risk of infection. CX3CL1—chemokine (C-X3-C motif) ligand 1, DM—diabetes mellitus, FGF—fibroblast growth factor, ICAM-1—intercellular adhesion molecule 1, IL—interleukin, MCP-1—monocyte chemoattractant protein-1, MMP—matrix metalloproteinase, TIMP—tissue inhibitor of metalloproteinase, TLR-2—toll-like receptor 2, WBC—white blood cells, VCAM-1—vascular cell adhesion molecule-1. Created with BioRender.com.

3. Large Vessel Atherosclerotic Lesion in DM

The nature of atherosclerotic lesions in DM results not only from their much faster development compared to the general population but also from a subsequent predilection for lesions to be located in the intima and the media [45]. The diffuse character of changes in DM, which causes faster involvement of distal vessel segments than in patients with atherosclerosis without diabetes, is also noteworthy [46]. The reason for this difference is still not fully understood and needs further research. Therapeutic interventions by

vascular surgeons or interventional radiologists do not always result in the expected revascularization outcomes due to the characteristic location of atherosclerotic lesions in DM.

3.1. Endotheliopathy as the Primary Factor Promoting Atherosclerosis

An impaired activation of many overlapping processes is the molecular basis of such a phenotype of changes as the ones observed in DM. Diabetic endotheliopathy is the initial process that facilitates the formation of vascular stenosis that initiates atherosclerotic plaque formation. Endothelial dysfunction is initiated not only by hyperglycemia but also by other factors such as increased arterial pressure, causing turbulent flow in vessels, high concentration of oxidized LDL, high concentrations of free oxygen radicals as well as homocysteine, genetic factors, inflammatory changes resulting from viral or bacterial infections, and the response to proinflammatory cytokines [47]. One of the final effects of these changes is a reduced NO synthesis in the endothelium, which leads to impaired reactivity of the vessel wall and a reduced antiatherosclerotic effect on plaque formation. The ability of optimal NO secretion depends on numerous factors such as the availability of tetrahydrobiopterin (BH4) and the activity of enzyme heme oxygenase-1 (HO-1). Their vital role in the homeostasis of NO was adopted for designing one of the mouse models of atherosclerosis development by knocking out the gene of the enzyme that participates in NO production (human HO-1 deficiency and Hmox1 $-/-$ mice) [48]. This model seems to imitate the vascular changes but does not induce hyperglycemia. Therefore, it cannot be used as the model for the wound healing process in DM unless it is combined with other mutations or interventions which cause hyperglycemia. NO deficiency is not always the initiating factor for atherosclerotic lesions. Some studies have shown that NO synthesis may increase due to a higher concentration of free oxygen radicals, which was observed in patients with DM where abnormal vascular reactivity to NO was found [49]. Despite paradoxically increased NO production, endothelial cells showed simultaneously enhanced production of O^{2-} when treated with high concentrations of glucose [50]. This phenomenon requires further research to explain the dualistic role of glucose in these processes. Despite the above, the hyperglycemia milieu is a specific example of the potentially destructive effect of oxygen free radicals on the development of endotheliopathy [51]. The role of nitric oxide in the pathogenesis of DM has been widely investigated in animal models. An interesting study on neuronal nitric oxide synthase (nNOS) expression in pancreatic islets was performed on a rat model. It revealed that nNOS levels in beta cells disappeared after 12 h from the onset of DM [52].

The adhesion of platelets to damaged endothelial cells is one of the factors enabling the formation of atherosclerotic plaque and embolism. In DM, this process is enhanced by increased stimulation of growth factors, fibrin, thromboxane A2, integrins, and P-selectin. Activated platelets secrete numerous molecules which maintain local inflammation by stimulating endothelial cells. This leads to a constant mutual reaction between the endothelial cells and the atherosclerotic plaque, including the transformation of monocytes into macrophages by enhancing diapedesis [53].

3.2. Subclinical Inflammation as the Trigger of the Atherosclerotic Process

3.2.1. Adhesion Molecules

Moreover, according to the current views, this subclinical inflammation is responsible for initiating and maintaining the atherosclerotic process. Indeed, there is a relationship between the activity of the innate and adaptive immune responses and the propagation of atherosclerotic lesions, which is particularly seen in DM. The innate immune response is activated by the subendothelial accumulation of cholesterol deposits and foam cells (fat-laden cells with an M2 macrophage-like phenotype), oxidation, and glycation [47,54,55]. It has been shown that the atherosclerotic plaque contains activated B cells, T cells, macrophages, mast cells, and dendritic cells that also send signals to the surrounding lymph nodes and around the area of the vascular lesion. The permanently damaged vessel wall becomes more

permeable to leukocytes adhering to endothelial cells, mainly due to vascular (VCAM-1) and intercellular (ICAM-1) adhesion molecules [56]. The process of leukocyte adhesion and migration is also possibly due to chemokines such as fractalkine CX3CL1, which maintains the migration of macrophages to the site of the vessel wall and causes its damage [57]. Increased blood levels of VCAM and ICAM were observed in clinical conditions related to subclinical inflammation and hyperinsulinemia associated with insulin resistance, such as obesity or pre-DM [58,59]. It seems that peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs), which are present in the walls of endothelial cells and monocytes, macrophages, and T cells, are one of the key regulators of this process. Oliver et al. showed that the use of PPAR-activating molecules (GW501516) in DM leads to the inhibition of the atherosclerotic process and the improvement of the lipid profile (increase in plasma HDL-C and decreased plasma triglyceride, LDL-C and insulin levels) [60,61]. PPAR pathways with KLF5 also participate in the development of diabetic cardiomyopathy, which has been demonstrated on transgenic mice [62].

3.2.2. Toll-like Receptors

In DM, chronic inflammation is responsible for the long-lasting wound healing process, which is another factor stimulating the development of atherosclerotic lesions. The activation of Toll-like receptors (TLRs) in the damaged tissue that are part of the innate immune system is the phenomenon linking these two processes [63]. During injury and infection, e.g., due to DFS, the TLRs are stimulated and mediate the expression of proinflammatory cytokines. In humans, increased expression of TLR receptors in the atherosclerotic plaque has been demonstrated [64]. In an ApoE $-/-$ mouse model of atherosclerosis, deprivation of TLR4 receptors resulted in a reduction in atherosclerotic severity, with an associated decrease in the circulating levels of pro-inflammatory cytokines such as IL-12 and monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1), despite chronic persistent hypercholesterolemia [65]. Although the relations refer to the animal model, similar pathophysiological relations characteristic of the atherosclerotic process were observed in humans with long-lasting DM [66]. Li et al. showed an increase in the expression of immune response factors such as NF κ B, ICAM-1, IL6, and IL8 after treatment with TLR2 and TLR4 agonists in a group of patients with type 1 DM and advanced coronary atherosclerosis [67]. Enhanced secretion of these cytokines may accelerate the progression of the atherosclerotic plaque and increase the risk of its rupture. TLR receptors are responsible not only for signaling associated with infection but also for non-infectious factors, such as those resulting from excess visceral adipose tissue and the secretion of activating factors. Properties of these receptors may find application in the future as targets of treatment for macroangiopathic complications of DM. Therefore, it is important to adequately imitate its role in animal models [68].

3.2.3. Pentraxins

Pentraxins (e.g., PTX3) constitute another group of factors that link the atherosclerotic process and the wound healing process. PTX3 is synthesized during neutrophil differentiation, it is accumulated in their mature follicles, and is ready for secretion under hypoxia in response to increased concentrations of proinflammatory cytokines such as TNF alpha, IL-1 beta, or the presence of lipopolysaccharides [69–71]. Therefore, PTX3 levels can be used not only as prognostic markers in myocardial ischemia but also in tissue recovery [72]. Increased levels of PTX3 were found in obese patients and in conditions of elevated insulin levels characteristic of insulin resistance, such as metabolic syndrome and DM [73,74]. The role of this molecule has not been well investigated in the context of wound healing. However, it seems that it can play an essential role in inflammation associated with tissue regeneration, and higher levels of it can be associated with delayed wound healing.

3.3. How Proteases Affect the Severity of the Atherosclerotic Process

3.3.1. Matrix Metalloproteinases

Additional factors linking the pathogenesis of atherosclerotic lesions and the healing process are cathepsins and matrix metalloproteinases (MMPs), whose dominant role is the degradation of extracellular matrix components. Under physiological conditions, they are responsible not only for the reconstruction of vascular wall structures as well as formation and destabilization of the atherosclerotic plaque, but also for the regeneration of superficial injuries of the epidermis or mucosa [75–77]. Knock-out studies on animal models have provided knowledge about the role of these enzymes in the pathogenesis of atherosclerosis. Overactivity of different subtypes of metalloproteinases has been found in DM depending on the location of the pathological process. Increased levels of metalloproteinases -1,-2,-3 have been shown to be associated with markers of vessel wall stiffness in patients with type 1 DM and may represent a potential therapeutic target [78]. In contrast, in type 2 DM, elevated levels of MMPs-7 and -12 were associated with a more severe course of atherosclerosis and an increased frequency of coronary incidents [79]. Furthermore, atherosclerotic lesions in the arterial vessel wall showed increased activity of metalloproteinases MMP-7 in addition to MMP-1,-2,-3,-9 [80–82]. It seems that inhibition of these enzymes can reduce the risks of plaque rupture and further narrowing of the vessel. Moreover, overexpression of MMP-9 was associated with delayed wound healing, and MMP-1,-8,-9 were found in diabetic wounds [83–86]. During healing, there is a dynamic balance between the activity of metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) in the wound, especially in patients with DM. Yu Liu et al. demonstrated that in wound exudates of patients with DFS, the assessment of MMP-9 and TIMP-1 activity could help to evaluate patients with a high risk of delayed wound healing [87]. In a study evaluating carotid atherosclerotic plaque composition in patients with type 2 DM, overactivity of domain 17 (ADAM17) and MMP-9 was found to be associated with the inadequate expression of TIMP-3 via SirT1 [88].

3.3.2. Cathepsins

Furthermore, cathepsins play an essential role in wound healing. Depending on their site of action, they affect not only cardiac remodeling (cathepsins B and S) but also bone (K) and adipose tissue (S) metabolism [89,90]. Moreover, cathepsin L plays a role in adipogenesis and insulin action. It was shown that inhibition of cathepsin L can result in the reduction of serum insulin, body weight gain, and protection of fibronectin from degradation [91]. An animal model should imitate the impaired function of ECM enzymes in DM. One of them is CatK $-/-$ mice, which received bone marrow lacking cathepsin K. The mice presented with impaired functional recovery following hindlimb ischemia [92]. Cathepsins may also play a role in TLR9 receptor-mediated innate immunity, which may accelerate atherosclerotic lesions [93]. Diabetic patients have been shown to be deficient in the endogenous cathepsin inhibitor cystatin C, which suggests a correlation with increased serum cathepsin S. [94].

3.4. The Role of Procoagulant Factors in Atherosclerosis

The formation of atherosclerotic lesions would not be possible without the influence of procoagulant factors. Activation of the plasmin system appears to be particularly important in DM [95,96]. Plasminogen-activating factors have been found to mediate atherosclerotic plaque destabilization [97]. In the abovementioned mouse model of ApoE knockout, a lower plasminogen concentration was observed in addition to faster development of the atherosclerotic plaque. Factors inhibiting the NF- κ B pathway may affect the inhibition of plasminogen activation. This can be observed in humans and experimental animals treated with drugs inhibiting this pathway, e.g., peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR- γ) agonists. An example of such an effect was demonstrated by Hao et al. on a mouse model with the use of rosiglitazone, which showed that angiotensin II inhibited plasminogen activating inhibitor 1 (PAI-1) and extracellular matrix (ECM)

production, probably through interactions between PPAR- γ and TGF- β 1/Smad2/3 and c-Jun N-terminal kinase (JNK) signaling pathways [98]. In clinical practice, two classes of drugs from this group are already used, i.e., fibrates (PPAR- α agonists), commonly used in diabetic dyslipidemia, and thiazolidinediones (PPAR- γ agonists), used in type 2 DM [98]. A rabbit model of hypercholesterolemia demonstrated an improvement in endothelial relaxation dependent on pioglitazone administration that was not directly related to lowering serum lipid levels [99].

3.5. Mast Cells and Their Significance in Plaque Formation

Mast cells play a special role among inflammatory cells involved in the development of atherosclerosis. They mature in the vessel wall under the influence of stem cell factor (SCF). They produce and secrete proteolytic substances which play a significant role in vessel wall remodeling. These proteolytic enzymes modify the composition and function of LDL and HDL lipoproteins [100]. In rodent mast cell cultures with a high content of LDL and HDL particles, accelerated formation of atherosclerotic plaques was observed on the inner vessel wall. On the other hand, after incubation of stimulated mast cells collected from the peritoneal cavity (peritoneal mast cells) with LDL particles, rapid proteolytic degradation of these particles was observed [101]. This degradation was caused by mast cell chymase present in cytosolic granules and was termed “granule-mediated uptake of LDL” [102]. It seems that the role of these cells depends on their phenotype which is also modified by hyperglycemia. Therefore, it is one of the mechanisms which ensures faster wound healing if the metabolic control of DM is accurate.

Mast cells, which secrete paracrine and autocrine proinflammatory cytokines such as tumor necrosis factor (TNF), IL-33, and IL-6, participate in the mechanism of insulin resistance by activating kinases [103]. IL-37 (a member of the IL-1 7 family), continuously sustains chronic inflammation. It has been postulated that combining IL-37 (IL-1 family member 7) with the IL-18 receptor alpha (IL-18R α) causes silencing of the innate and acquired immune response in type 2 DM, inhibiting the development of insulin resistance [104]. The impact of this modification on the wound healing process needs further investigation.

3.6. Lipid Disorders—A View beyond the Atherosclerotic Plaque

The influence of lipid disorders on the development of the atherosclerotic process is indisputable in the present era of research. Foam cell formation on the macrophage core is mediated by endocytosis of oxidized lipoproteins via their receptors [105]. This process is multiplied by the glycation of apolipoproteins due to the defective action of insulin, impairing the ability of macrophages to cope with apoptosis [106]. Macrophages loaded with lipid masses secrete proinflammatory cytokines, chemokines, and reactive oxygen species, further stimulating inflammatory cells and causing the death of surrounding healthy tissues and impairing wound healing [105].

Two classes of receptors play an important role in maintaining readiness for foam cell activity, i.e., class A scavenger receptors (SR-A) and class B scavenger receptors (CD36). The role of these receptor types is to engulf modified lipids in the vessel wall for clearance. CD36 appears to be more important in activating monocytes and macrophages in the adipose tissue, liver, and arteries, leading to increased levels of soluble sCD36 in plasma and consequently maintaining the atherosclerotic process [107,108]. Increased levels of soluble forms of CD36 receptors have been found in the plasma of patients with DM and those with an unstable atherosclerotic plaque in carotid atherosclerosis. Several authors have demonstrated an association between sCD36 levels and glycemia measured as fasting glucose and HbA1C [109–111]. Therefore, the levels of these receptors may be considered markers of cardiovascular risk in the future.

Moreover, expression of the transmembrane lectin-like oxLDL receptor 1 (LOX-1), which is responsible for trapping oxidized LDL, has been found in endothelial cells, vessel wall smooth muscle cells, platelets, and macrophages [112]. The constant movement of

foam cells between the bloodstream and the vessel wall is stimulated by a large influx of oxLDLs and overexpression of adhesion molecules on the endothelial surface due to their interaction with scavenger receptors on the foam cell surface. The macrophages loaded with oxLDLs have a reduced capacity to move to inflammatory sites and lymph nodes. The final result of this process is an increase in the number of foam cells. [113].

4. Animal Models versus Human Models—Similarities and Differences

4.1. Animal Model of Diabetic Wound—A Challenge

Wound progression and healing in DM in humans is a complicated process, as has previously been described in detail. As a result, the design of appropriate and potentially successful therapies requires optimal preclinical models of these processes. Several animal models have already been created, such as mouse, rat, hamster, and pig models (widely used models are given in Table 1). However, none of them perfectly reflects the process of diabetic wound healing in humans [114]. Most of them do not imitate all factors which are impaired in patients with DM (particularly immune reactions and metabolomic and transcriptomic changes specific to a certain organism). This should be considered during the analysis of the results.

Table 1. Selected animal models of diabetic wound healing (based on [114]). NOD—non-obese diabetic; BB—bio-breeding; 1—streptozotocin-mediated destruction of beta-islets, generating type 1 diabetes; 2—a spontaneous development of autoimmune reactions leading to type 1 diabetes; 3—selected line of hamsters presenting with glucosuria and exhaustion of beta cells [115]; 4—leptin receptor deficiency, severe obesity; 5—a point mutation in the leptin receptor gene, severe obesity; 6—recombinant strain, polygenic background of diabetes, moderate obesity; 7—fa gene homozygous mutation in the leptin receptor gene OB-R, resistance to leptin [116].

	Mice	Rats	Other Animals
Type 1 diabetes	Streptozotocin-induced ¹ diabetic mice NOD mice ²	Streptozotocin-induced ¹ diabetic rats BB rats ²	Chinese hamster ³
Type 2 diabetes	Obese <i>ob/ob</i> mice ⁴ <i>db/db</i> mice ⁵ NONcNZO mice ⁶	Zucker <i>fa/fa</i> rats ⁷	

In an established pig model (streptozotocin-injected Yorkshire pigs) of diabetic wound, the wounds healed within 18 days, which makes this model incoherent with the analogous process in humans [117]. Streptozotocin-induced models did not mimic type 1 DM because this disease is not caused by xenobiotic-mediated destruction of beta cells [118]. Similarly, type 2 DM in humans is not caused by the dysfunction of the leptin axis as in the case of *ob/ob* mice or *db/db* mice [119]. Although the stages of wound healing are similar and include coagulation, the inflammatory phase (immune cell infiltration, cytokine secretion), the proliferative phase (extracellular matrix generation, angiogenesis, epithelialization) and the remodeling phase (collagen crosslinking and reorganization), there are differences in skin ultrastructure and physiology between different species, which makes wound healing different in human and animals. In mice and rats, the skin is thin and fragile, whereas the subcutaneous layer consists of a special muscular striatum, panniculus carnosus (absent in humans), which causes more rapid contraction and facilitates wound healing [120]. Nevertheless, rodents are widely used in experimental models of diabetic wound healing and a number of them provided experience, which allows for further optimization of models in the aspects such as glycemic levels, the method of induction of DM, or duration of DM [121]. The advantages and disadvantages of different animal models used in the studies on diabetic wounds are given in Table 2.

4.2. How to Recreate the Neuropathic Component Observed in Patients with Long-Term Diabetes in an Animal Model?

A study conducted by the authors of this review showed that the duration of hyperglycemia in rats might reflect the long-term uncompensated course of DM in humans [123]. The results of pain threshold measurements confirm the onset of developing sensory neuropathy in the studied rats as early as day seven after administration of streptozotocin. In humans, the development of neuropathy is more spread out over time. In addition to the existence of DM per se, the development of complications is also influenced by other factors such as age, glycemic control, elevated cholesterol and triglyceride levels, hypertension, obesity, and smoking. EURODIAB IDDM, which was a study assessing the presence of DM complications in which more than three thousand patients from sixteen countries were treated with insulin, initially found neuropathy in 28% of patients, and an increase to 51.5% was recorded after a seven-year follow-up [124]. Therefore, the authors' observations based on a rat model can provide answers to important clinical questions, because in an immeasurably shorter time it is possible to obtain the conditions for which researchers would need many years in the case of a human model. In many studies based on an animal model, Bujalska et al. used such a methodology to evaluate the process of developing diabetic neuropathy [125].

Table 2. Advantages and disadvantages of different animal models in studies on human diabetic wounds (based on [114,122]).

<u>Model</u>	<u>Advantages</u>	<u>Disadvantages</u>
Mice	<ul style="list-style-type: none"> • Relatively low cost • High rate of breeding • Short time of a single experiment • Easy transgenic model generation 	<ul style="list-style-type: none"> • Differences in: <ol style="list-style-type: none"> 1. mechanism of wound healing (contraction) 2. skin ultrastructure 3. innate and adaptive immune systems
Rat	<ul style="list-style-type: none"> • Similar to mice • Larger dimensions, better endurance—more stable experimental conditions 	<ul style="list-style-type: none"> • Different mechanism of wound healing (contraction) • A paucity of specific reagents (compared to mice)
Rabbit	<ul style="list-style-type: none"> • Relatively low costs • Rapid breathing • Similar response to different factors as in human skin • Ear model (contralateral ear as a control) 	<ul style="list-style-type: none"> • Difficulties in transgenic organisms generation • A paucity of specific reagents
Pig	<ul style="list-style-type: none"> • Anatomical and physiological similarities with humans • Similar mechanism of wound healing as in humans—re-epithelialization and granulation 	<ul style="list-style-type: none"> • Incoherence with humans (rapid wound healing) • High cost • Long time of a single experiment

4.3. Ischemic Model—Is It Really a Chronic Wound Model?

Of note, the chronic wound model described in the vast majority of studies is in fact an acute wound model. One example is the rabbit model, in which two of the three arteries supplying the area with blood were ligated in the rabbit's ear [126]. Next, a wound was created in the ischemic site. This model was mainly used to study the effect of growth factors on a wound. One modification of the rabbit model is the model proposed by Constantine and Bolton, describing the formation of an ischemic skin wound of a guinea pig [127]. This model involves the subcutaneous placement of a plunger tip of a disposable plastic syringe, wound closure, and ligation of the plunger base with a nylon fastening

strap. In the experiments, a necrotic lesion developed after 9 h. Another model currently used in research for the analysis of chronic wounds is a model in which a rat or other rodent has a metal plate implanted into the skin. Then, with an external magnet, this plate compresses the skin, causing ischemia and ulceration. Over time, the blood supply is restored, which allows the inflow of inflammatory mediators [128]. These models do not fully reflect the wound in humans due to the physiological and anatomical differences between the species. They offer the possibility of controlled restoration of tissue perfusion. The above models allow for the creation of ischemic wounds, whereas in the case of chronic wounds in DM, there is an important neuropathic component, even if ischemic features coexist in the vascular bed. Moreover, these models do not imitate the activation of many impaired molecular pathways in patients with DM. This should be considered during the interpretation of the results and the analysis of potential utility for humans.

Another concept for model selection is the anatomical recreation of the human skin model of a chronic wound in pigs [129]. As in the rabbit model, the blood supply to the wound site is also surgically restricted, causing tissue hypoxia. Due to the anatomical and physiological similarities to the conditions of wound healing in humans, this model offers very good conditions for testing. However, it is rarely used in preclinical studies due to the very high price of raising and keeping pigs. Choosing a rat as the basis for our model is also in line with the “replacement” principle recommended in animal model studies. However, skin transplantation onto animals may have an impact on wound healing due to the activation of inflammatory pathways and differences in MHC molecules.

4.4. Is It Possible to Translate the Conditions of Chronic Inflammation in DM from a Human to an Animal Model?

Most current animal models are based on the formation of acute wounds and then subjecting the wounds to factors responsible for the formation of chronic wounds, i.e., ischemia (e.g., damage associated with pressure) or DM. In the above study, a model imitating chronic wound conditions in patients with DM was presented [123]. The presence of DM means that different stages of wound healing exhibit changed characteristics. The inflammation phase is lengthened, the concentration of growth factors and number of cells in the proliferation phase are reduced, and neovascularization is impaired [130]. Due to the applied procedures, such as the maintenance of hyperglycemia for a long time, eventually causing sensory neuropathy, the use of bacterial lipopolysaccharide, and the inhibition of the participation of musculus panniculus carnosus in the species-specific process of rapid wound healing after an injury, it was possible to best reflect the conditions in the wound environment in a patient with long-term uncontrolled DM. If Lee et al. had not applied the above modifications, the healing time would have been much shorter (5–7 days) than that obtained in our study, and could not have accurately reflected the healing conditions of the chronic wound [131].

Another modification in our abovementioned study was the use of bacterial lipopolysaccharide placed directly on the wound as an additional factor for improving the model to recreate the conditions in the human model. The presence of DM in humans is a widely recognized factor for an increased risk of wound infection through hyperglycemia and also macro- and microangiopathy, causing worse tissue perfusion, as well as autonomic neuropathy, which is the cause of excessive drying of the skin and, as a consequence, its poorer regeneration. In their meta-analysis, Biancari and Giordano put forward a thesis about the existence of a positive correlation between the worse metabolic control of DM manifested in objective laboratory tests as a higher percentage of glycated hemoglobin and the frequency of postoperative complications in the form of wound infection after cardiac surgery [132]. For this reason, in patients with uncontrolled DM, multiple bacterial flora is reported, including multi-drug resistant strains such as *Ps. aeruginosa*. Therefore, the authors used this bacterium in the lipopolysaccharide rat model.

5. What Features Should the Best Model Have? Do We Know the Model Closest to the “Target”?

5.1. How to Prevent the Mechanism of Contraction Observed in Wounds Generated in the *Musculus Panniculus Carnosus* in Rats?

In the above paper, special modifications were applied to the model after the pilot study [133]. This included the use of silicone discs placed on the dorsal skin around the periphery of the wound to stabilize the wound healing process. As a result, a proliferation of neoplastic granulation tissue could be observed, which was not possible in the pilot study due to the different biomechanics of wound healing in rats. Galiano et al. [134] described such modifications in the literature. Another method for preventing premature wound healing by inhibiting constriction is that proposed by Yao et al. [135]. Their study was conducted in mice and featured a membrane used in, e.g., vacuum therapy, which was sutured to the shaved skin of the rodent's dorsum, which prevented wound healing through skin contraction. According to Yao et al., after 48 h, the wound maintained 80% of the baseline area, while under normal conditions the wound decreased to 30% of the baseline area during this time, which roughly corresponds to the surface area reduction values obtained in our study. The undoubted advantage of the method is its low cost, as well as the simplicity of implementation. However, the problem is related to the durability of the membrane when it comes into contact with cage elements, other animals or even during research procedures.

Another concept for choosing a chronic model is the wound model presented by Reiss et al., who used a special Xanthan gum carrier applied to the wound. Recombinant collagenase (metalloproteinase-9) was suspended in Xanthan gum to a concentration parallel to that found in chronic wounds [136]. In the present study, the carrier delayed wound healing. The indisputable advantage of this scheme is the simplicity of using it, but due to the complex production process of the carrier and its significant costs, such a model could not be considered to be generally available or universal.

5.2. Does the Strain of Animal Matter in the Preparation of the Animal Model?

As mentioned before, the species of animals present different advantages and disadvantages in an animal model of diabetic wounds. The selection of the appropriate strain is also important. For instance, Zucker Diabetic Fatty (ZDF) rats or Zucker-Diabetic-Sprague Dawley rats are more specific for investigation of type 2 DM than Wistar-Kyoto (WKY) rats (used in studies on hypertension) [137–139]. However, modified WKY rats have also been used in diabetic studies [140]. Importantly, the arrangement of the experiment requires careful strain selection.

6. Conclusions

The risk of a wound in a diabetic patient lies not only in the fight against potential infection but above all in its long-term persistence, which, with a decreased immune barrier, exposes the patient to life-threatening complications such as sepsis. Patients with DM are also at greater risk of wound tissue resection due to severe infection or irreversible ischemia of the wound area. Since consequences such as high amputation significantly shorten the life of patients with DM, intensive treatment is needed as early as possible in the course of the disease to prevent its chronicity [141]. Hyperglycemia impairs many of the described pathways, which can cause a delay in wound healing. Intensive research is conducted worldwide and its aim is to develop medicinal products which would result in the closure of the wound as quickly as possible and would also prevent the development of infection. Preparation of such molecules requires the development of an animal wound model that reflects as closely as possible the conditions and molecular differences of a chronic wound in a patient with DM. In individual subsections, we described the molecular mechanism of the development of endotheliopathy, immunopathy, and neuropathy. Additionally, we presented the difficulties researchers may encounter when choosing an animal species for the model, the way of creating the wound, and even the mapping of the desired dominant

etiopathological factor of the wound. We also discussed what innervations may be applied to obtain the best imitation of chronic wound in an animal model. Such information can help in designing an adequate animal model which could ensure the development of new, safe, and effective medicinal products for the treatment of chronic wounds in patients with DM.

Author Contributions: Conceptualization—M.M. and B.M.-R.; resources—M.M., B.M.-R., M.K. (Marcin Kleibert) and M.K. (Michał Kowara); writing-original draft preparation—M.M., B.M.-R., M.K. (Marcin Kleibert) and M.K. (Michał Kowara); writing-review and editing M.M., B.M.-R., M.K. (Marcin Kleibert) and M.K. (Michał Kowara); visualization—M.K. (Marcin Kleibert); supervision—B.M.-R., L.C.; funding acquisition—M.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: The APC was funded by the Publishing Fund of Medical University of Warsaw, grant number: 1WO/N/2022.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Singh, N.; Armstrong, D.G.; Lipsky, B.A. Preventing foot ulcers in patients with diabetes. *JAMA* **2005**, *293*, 217–228. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Reiber, G.E. The epidemiology of diabetic foot problems. *Diabet. Med.* **1996**, *13* (Suppl. 1), S6–S11. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Jupiter, D.C.; Thorud, J.C.; Buckley, C.J.; Shibuya, N. The impact of foot ulceration and amputation on mortality in diabetic patients. I: From ulceration to death, a systematic review. *Int. Wound J.* **2016**, *13*, 892–903. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Richard, J.L.; Lavigne, J.P.; Sotto, A. Diabetes and foot infection: More than double trouble. *Diabetes Metab. Res. Rev.* **2012**, *28* (Suppl. 1), 46–53. [[CrossRef](#)]
- Singh, R.; Farooq, S.A.; Mannan, A.; Singh, T.G.; Najda, A.; Grazyna, Z.; Albadrani, G.M.; Sayed, A.A.; Abdel-Daim, M.M. Animal models of diabetic microvascular complications: Relevance to clinical features. *Biomed. Pharmacother.* **2022**, *145*, 112305. [[CrossRef](#)]
- Callewaert, B.; Jones, E.A.V.; Himmelreich, U.; Gsell, W. Non-Invasive Evaluation of Cerebral Microvasculature Using Pre-Clinical MRI: Principles, Advantages and Limitations. *Diagnostics* **2021**, *11*, 926. [[CrossRef](#)]
- Society for Vascular Surgery Lower Extremity Guidelines Writing Group; Conte, M.S.; Pomposelli, F.B.; Clair, D.G.; Geraghty, P.J.; McKinsey, J.F.; Mills, J.L.; Moneta, G.L.; Murad, M.H.; Powell, R.J.; et al. Society for Vascular Surgery practice guidelines for atherosclerotic occlusive disease of the lower extremities: Management of asymptomatic disease and claudication. *J. Vasc. Surg.* **2015**, *61*, 2S–41S. [[CrossRef](#)]
- Okuno, S.; Iida, O.; Iida, T.; Takahara, M.; Yamaoka, T.; Kitano, I.; Asai, M.; Masuda, M.; Okamoto, S.; Ishihara, T.; et al. Comparison of Clinical Outcomes between Endovascular Therapy with Self-Expandable Nitinol Stent and Femoral-Popliteal Bypass for Trans-Atlantic Inter-Society Consensus II C and D Femoropopliteal Lesions. *Ann. Vasc. Surg.* **2019**, *57*, 137–143. [[CrossRef](#)]
- Schramm, J.C.; Dinh, T.; Veves, A. Microvascular Changes in the Diabetic Foot. In *The Diabetic Foot: Medical and Surgical Management*, 4th ed.; New Illust. Humana Press: Towota, NJ, USA, 2018; pp. 173–188.
- Uccioli, L.; Mancini, L.; Giordano, A.; Solini, A.; Magnani, P.; Manto, A.; Cotroneo, P.; Greco, A.V.; Ghirlanda, G. Lower limb arterio-venous shunts, autonomic neuropathy and diabetic foot. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **1992**, *16*, 123–130. [[CrossRef](#)]
- Boulton, A.J.; Scarpello, J.H.; Ward, J.D. Venous oxygenation in the diabetic neuropathic foot: Evidence of arteriovenous shunting? *Diabetologia* **1982**, *22*, 6–8. [[CrossRef](#)]
- Szabo, C. Role of nitrosative stress in the pathogenesis of diabetic vascular dysfunction. *Br. J. Pharmacol.* **2009**, *156*, 713–727. [[CrossRef](#)]
- Rask-Madsen, C.; King, G.L. Vascular complications of diabetes: Mechanisms of injury and protective factors. *Cell Metab.* **2013**, *17*, 20–33. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Kizub, I.V.; Klymenko, K.I.; Soloviev, A.I. Protein kinase C in enhanced vascular tone in diabetes mellitus. *Int. J. Cardiol.* **2014**, *174*, 230–242. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Khamaisi, M.; Katagiri, S.; Keenan, H.; Park, K.; Maeda, Y.; Li, Q.; Qi, W.; Thomou, T.; Eschuk, D.; Tellechea, A.; et al. PKCdelta inhibition normalizes the wound-healing capacity of diabetic human fibroblasts. *J. Clin. Investig.* **2016**, *126*, 837–853. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

16. Geraldès, P.; Hiraoka-Yamamoto, J.; Matsumoto, M.; Clermont, A.; Leitges, M.; Marette, A.; Aiello, L.P.; Kern, T.S.; King, G.L. Activation of PKC- δ and SHP-1 by hyperglycemia causes vascular cell apoptosis and diabetic retinopathy. *Nat. Med.* **2009**, *15*, 1298–1306. [[CrossRef](#)]
17. Scivittaro, V.; Ganz, M.B.; Weiss, M.F. AGEs induce oxidative stress and activate protein kinase C- β (II) in neonatal mesangial cells. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* **2000**, *278*, F676–F683. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Zhou, X.Y.; Zhang, F.; Ying, C.J.; Chen, J.; Chen, L.; Dong, J.; Shi, Y.; Tang, M.; Hu, X.T.; Pan, Z.H.; et al. Inhibition of iNOS alleviates cognitive deficits and depression in diabetic mice through downregulating the NO/sGC/cGMP/PKG signal pathway. *Behav. Brain Res.* **2017**, *322*, 70–82. [[CrossRef](#)]
19. Brownlee, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* **2001**, *414*, 813–820. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Garcia Soriano, F.; Virag, L.; Jagtap, P.; Szabo, E.; Mabley, J.G.; Liaudet, L.; Marton, A.; Hoyt, D.G.; Murthy, K.G.; Salzman, A.L.; et al. Diabetic endothelial dysfunction: The role of poly(ADP-ribose) polymerase activation. *Nat. Med.* **2001**, *7*, 108–113. [[CrossRef](#)]
21. Bedard, K.; Krause, K.H. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: Physiology and pathophysiology. *Physiol. Rev.* **2007**, *87*, 245–313. [[CrossRef](#)]
22. Goldin, A.; Beckman, J.A.; Schmidt, A.M.; Creager, M.A. Advanced glycation end products: Sparking the development of diabetic vascular injury. *Circulation* **2006**, *114*, 597–605. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Roche, C.; Guerrot, D.; Harouki, N.; Duflo, T.; Besnier, M.; Remy-Jouet, I.; Renet, S.; Dumesnil, A.; Lejeune, A.; Morisseau, C.; et al. Impact of soluble epoxide hydrolase inhibition on early kidney damage in hyperglycemic overweight mice. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* **2015**, *120*, 148–154. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Vincent, A.M.; Callaghan, B.C.; Smith, A.L.; Feldman, E.L. Diabetic neuropathy: Cellular mechanisms as therapeutic targets. *Nat. Rev. Neurol.* **2011**, *7*, 573–583. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Monteiro-Soares, M.; Boyko, E.J.; Ribeiro, J.; Ribeiro, I.; Dinis-Ribeiro, M. Predictive factors for diabetic foot ulceration: A systematic review. *Diabetes Metab. Res. Rev.* **2012**, *28*, 574–600. [[CrossRef](#)]
26. Van Dam, P.S.; Cotter, M.A.; Bravenboer, B.; Cameron, N.E. Pathogenesis of diabetic neuropathy: Focus on neurovascular mechanisms. *Eur. J. Pharmacol.* **2013**, *719*, 180–186. [[CrossRef](#)]
27. Jaroslawska, J.; Korytko, A.; Zglejc-Waszak, K.; Antonowski, T.; Pomianowski, A.S.; Wasowicz, K.; Wojtkiewicz, J.; Juranek, J.K. Peripheral Neuropathy Presents Similar Symptoms and Pathological Changes in Both High-Fat Diet and Pharmacologically Induced Pre- and Diabetic Mouse Models. *Life* **2021**, *11*, 1267. [[CrossRef](#)]
28. Wang, Z.; Hasan, R.; Firwana, B.; Elraiyah, T.; Tsapas, A.; Prokop, L.; Mills, J.L., Sr.; Murad, M.H. A systematic review and meta-analysis of tests to predict wound healing in diabetic foot. *J. Vasc. Surg.* **2016**, *63*, 29S–36S.e2. [[CrossRef](#)]
29. Suri, A.; Szallasi, A. The emerging role of TRPV1 in diabetes and obesity. *Trends Pharmacol. Sci.* **2008**, *29*, 29–36. [[CrossRef](#)]
30. Fromy, B.; Lingueglia, E.; Sigaucho-Roussel, D.; Saumet, J.L.; Lazdunski, M. Asic3 is a neuronal mechanosensor for pressure-induced vasodilation that protects against pressure ulcers. *Nat. Med.* **2012**, *18*, 1205–1207. [[CrossRef](#)]
31. Vastani, N.; Guenther, F.; Gentry, C.; Austin, A.L.; King, A.J.; Bevan, S.; Andersson, D.A. Impaired Nociception in the Diabetic Ins2(+)/Akita Mouse. *Diabetes* **2018**, *67*, 1650–1662. [[CrossRef](#)]
32. Shepherd, A.J.; Downing, J.E.; Miyan, J.A. Without nerves, immunology remains incomplete -in vivo veritas. *Immunology* **2005**, *116*, 145–163. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Roosterman, D.; Goerge, T.; Schneider, S.W.; Bunnett, N.W.; Steinhoff, M. Neuronal control of skin function: The skin as a neuroimmunoendocrine organ. *Physiol. Rev.* **2006**, *86*, 1309–1379. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Peters, E.M.; Ericson, M.E.; Hosoi, J.; Seiffert, K.; Hordinsky, M.K.; Ansel, J.C.; Paus, R.; Scholzen, T.E. Neuropeptide control mechanisms in cutaneous biology: Physiological and clinical significance. *J. Invest. Dermatol.* **2006**, *126*, 1937–1947. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Bucalo, B.; Eaglstein, W.H.; Falanga, V. Inhibition of cell proliferation by chronic wound fluid. *Wound Repair. Regen.* **1993**, *1*, 181–186. [[CrossRef](#)]
36. Schaper, N.C.; Huijberts, M.; Pickwell, K. Neurovascular control and neurogenic inflammation in diabetes. *Diabetes Metab. Res. Rev.* **2008**, *24* (Suppl. 1), S40–S44. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Siudem, P.; Paradowska, K. Structure, function, and mechanism of action of the vanilloid TRPV1 receptor. *Postępy Hig. i Med. Doświadczalnej* **2020**, *74*, 481–488. [[CrossRef](#)]
38. Ayuk, S.M.; Abrahamse, H.; Houreld, N.N. The Role of Matrix Metalloproteinases in Diabetic Wound Healing in relation to Photobiomodulation. *J. Diabetes Res.* **2016**, *2016*, 2897656. [[CrossRef](#)]
39. Christman, A.L.; Selvin, E.; Margolis, D.J.; Lazarus, G.S.; Garza, L.A. Hemoglobin A1c predicts healing rate in diabetic wounds. *J. Invest. Dermatol.* **2011**, *131*, 2121–2127. [[CrossRef](#)]
40. Marhoffer, W.; Stein, M.; Maeser, E.; Federlin, K. Impairment of polymorphonuclear leukocyte function and metabolic control of diabetes. *Diabetes Care* **1992**, *15*, 256–260. [[CrossRef](#)]
41. Witko-Sarsat, V.; Rieu, P.; Descamps-Latscha, B.; Lesavre, P.; Halbwachs-Mecarelli, L. Neutrophils: Molecules, functions and pathophysiological aspects. *Lab. Invest.* **2000**, *80*, 617–653. [[CrossRef](#)]
42. Kolluru, G.K.; Bir, S.C.; Kevil, C.G. Endothelial dysfunction and diabetes: Effects on angiogenesis, vascular remodeling, and wound healing. *Int. J. Vasc. Med.* **2012**, *2012*, 918267. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Kawamura, S.; Ohteki, T. Monopoiesis in humans and mice. *Int. Immunol.* **2018**, *30*, 503–509. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

44. Constantinescu, C.S.; Farooqi, N.; O'Brien, K.; Gran, B. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS). *Br. J. Pharmacol.* **2011**, *164*, 1079–1106. [[CrossRef](#)]
45. Chistiakov, D.A.; Sobenin, I.A.; Orekhov, A.N.; Bobryshev, Y.V. Mechanisms of medial arterial calcification in diabetes. *Curr. Pharm. Des.* **2014**, *20*, 5870–5883. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Sheehan, P.G.S.A. *Peripheral Vascular Disease: Basic Diagnostic and Therapeutic Approaches*, 1st ed.; Lippincott Williams & Wilkins: Baltimore, MD, USA, 2004.
47. Ross, R. Atherosclerosis—an inflammatory disease. *N. Engl. J. Med.* **1999**, *340*, 115–126. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Kinderlerer, A.R.; Pombo Gregoire, I.; Hamdulay, S.S.; Ali, F.; Steinberg, R.; Silva, G.; Ali, N.; Wang, B.; Haskard, D.O.; Soares, M.P.; et al. Heme oxygenase-1 expression enhances vascular endothelial resistance to complement-mediated injury through induction of decay-accelerating factor: A role for increased bilirubin and ferritin. *Blood* **2009**, *113*, 1598–1607. [[CrossRef](#)]
49. Ting, H.H.; Timimi, F.K.; Boles, K.S.; Creager, S.J.; Ganz, P.; Creager, M.A. Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilation in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J. Clin. Investig.* **1996**, *97*, 22–28. [[CrossRef](#)]
50. Cosentino, F.; Hishikawa, K.; Katusic, Z.S.; Luscher, T.F. High glucose increases nitric oxide synthase expression and superoxide anion generation in human aortic endothelial cells. *Circulation* **1997**, *96*, 25–28. [[CrossRef](#)]
51. Baynes, J.W.; Thorpe, S.R. Role of oxidative stress in diabetic complications: A new perspective on an old paradigm. *Diabetes* **1999**, *48*, 1–9. [[CrossRef](#)]
52. Emerald, B.S.; Mohsin, S.; D'Souza, C.; John, A.; El-Hasasna, H.; Ojha, S.; Raza, H.; Al-Ramadi, B.; Adeghate, E. Diabetes Mellitus Alters the Immuno-Expression of Neuronal Nitric Oxide Synthase in the Rat Pancreas. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 4974. [[CrossRef](#)]
53. Penz, S.; Reiningger, A.J.; Brandl, R.; Goyal, P.; Rabie, T.; Bernlochner, I.; Rother, E.; Goetz, C.; Engelmann, B.; Smethurst, P.A.; et al. Human atheromatous plaques stimulate thrombus formation by activating platelet glycoprotein VI. *FASEB J.* **2005**, *19*, 898–909. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Hansson, G.K. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N. Engl. J. Med.* **2005**, *352*, 1685–1695. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Hansson, G.K.; Libby, P. The immune response in atherosclerosis: A double-edged sword. *Nat. Rev. Immunol.* **2006**, *6*, 508–519. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Proudfoot, A.E. The biological relevance of chemokine-proteoglycan interactions. *Biochem. Soc. Trans.* **2006**, *34*, 422–426. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Barlic, J.; Zhang, Y.; Foley, J.F.; Murphy, P.M. Oxidized lipid-driven chemokine receptor switch, CCR2 to CX3CR1, mediates adhesion of human macrophages to coronary artery smooth muscle cells through a peroxisome proliferator-activated receptor gamma-dependent pathway. *Circulation* **2006**, *114*, 807–819. [[CrossRef](#)]
58. Jude, E.B.; Douglas, J.T.; Anderson, S.G.; Young, M.J.; Boulton, A.J.M. Circulating cellular adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, P- and E-selectin in the prediction of cardiovascular disease in diabetes mellitus. *Eur. J. Intern. Med.* **2002**, *13*, 185–189. [[CrossRef](#)]
59. Malin, S.K.; Gilbertson, N.M.; Eichner, N.Z.M.; Heiston, E.; Miller, S.; Weltman, A. Impact of Short-Term Continuous and Interval Exercise Training on Endothelial Function and Glucose Metabolism in Prediabetes. *J. Diabetes Res.* **2019**, *2019*, 4912174. [[CrossRef](#)]
60. Oliver, W.R., Jr.; Shenk, J.L.; Snaith, M.R.; Russell, C.S.; Plunket, K.D.; Bodkin, N.L.; Lewis, M.C.; Winegar, D.A.; Sznajdman, M.L.; Lambert, M.H.; et al. A selective peroxisome proliferator-activated receptor delta agonist promotes reverse cholesterol transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 5306–5311. [[CrossRef](#)]
61. Han, L.; Shen, W.J.; Bittner, S.; Kraemer, F.B.; Azhar, S. PPARs: Regulators of metabolism and as therapeutic targets in cardiovascular disease. Part II: PPAR-beta/delta and PPAR-gamma. *Future Cardiol.* **2017**, *13*, 279–296. [[CrossRef](#)]
62. Drosatos, K.; Pollak, N.M.; Pol, C.J.; Ntziachristos, P.; Willecke, F.; Valenti, M.C.; Trent, C.M.; Hu, Y.; Guo, S.; Aifantis, I.; et al. Cardiac Myocyte KLF5 Regulates Ppara Expression and Cardiac Function. *Circ. Res.* **2016**, *118*, 241–253. [[CrossRef](#)]
63. Akira, S.; Uematsu, S.; Takeuchi, O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* **2006**, *124*, 783–801. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Edfeldt, K.; Bennet, A.M.; Eriksson, P.; Frostegard, J.; Wiman, B.; Hamsten, A.; Hansson, G.K.; de Faire, U.; Yan, Z.Q. Association of hypo-responsive toll-like receptor 4 variants with risk of myocardial infarction. *Eur. Heart J.* **2004**, *25*, 1447–1453. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Michelsen, K.S.; Wong, M.H.; Shah, P.K.; Zhang, W.; Yano, J.; Doherty, T.M.; Akira, S.; Rajavashisth, T.B.; Arditi, M. Lack of Toll-like receptor 4 or myeloid differentiation factor 88 reduces atherosclerosis and alters plaque phenotype in mice deficient in apolipoprotein E. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 10679–10684. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Xiao, L.; Liu, Y.; Wang, N. New paradigms in inflammatory signaling in vascular endothelial cells. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2014**, *306*, H317–H325. [[CrossRef](#)]
67. Li, J.; Jin, C.; Cleveland, J.C., Jr.; Ao, L.; Xu, D.; Fullerton, D.A.; Meng, X. Enhanced inflammatory responses to toll-like receptor 2/4 stimulation in type 1 diabetic coronary artery endothelial cells: The effect of insulin. *Cardiovasc. Diabetol.* **2010**, *9*, 90. [[CrossRef](#)]
68. Hong, C.P.; Yun, C.H.; Lee, G.W.; Park, A.; Kim, Y.M.; Jang, M.H. TLR 9 regulates adipose tissue inflammation and obesity-related metabolic disorders. *Obesity* **2015**, *23*, 2199–2206. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. Alles, V.V.; Bottazzi, B.; Peri, G.; Golay, J.; Introna, M.; Mantovani, A. Inducible expression of PTX3, a new member of the pentraxin family, in human mononuclear phagocytes. *Blood* **1994**, *84*, 3483–3493. [[CrossRef](#)]
70. Vouret-Craviari, V.; Matteucci, C.; Peri, G.; Poli, G.; Introna, M.; Mantovani, A. Expression of a long pentraxin, PTX3, by monocytes exposed to the mycobacterial cell wall component lipoarabinomannan. *Infect. Immun.* **1997**, *65*, 1345–1350. [[CrossRef](#)]

71. Jeannin, P.; Bottazzi, B.; Sironi, M.; Doni, A.; Rusnati, M.; Presta, M.; Maina, V.; Magistrelli, G.; Haeuw, J.F.; Hoeffel, G.; et al. Complexity and complementarity of outer membrane protein A recognition by cellular and humoral innate immunity receptors. *Immunity* **2005**, *22*, 551–560. [[CrossRef](#)]
72. Joanna Górka-Dynysiewicz, J.Z.-J. Pentraksyna 3 i jej rola w odbudowie tkanek. *Farm. Pol.* **2020**, *76*, 65–72.
73. Osorio-Conles, O.; Guitart, M.; Chacon, M.R.; Maymo-Masip, E.; Moreno-Navarrete, J.M.; Montori-Grau, M.; Naf, S.; Fernandez-Real, J.M.; Vendrell, J.; Gomez-Foix, A.M. Plasma PTX3 protein levels inversely correlate with insulin secretion and obesity, whereas visceral adipose tissue PTX3 gene expression is increased in obesity. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **2011**, *301*, E1254–E1261. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Alberti, L.; Gilardini, L.; Zulian, A.; Micheletto, G.; Peri, G.; Doni, A.; Mantovani, A.; Invitti, C. Expression of long pentraxin PTX3 in human adipose tissue and its relation with cardiovascular risk factors. *Atherosclerosis* **2009**, *202*, 455–460. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Nagase, H.; Visse, R.; Murphy, G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc. Res.* **2006**, *69*, 562–573. [[CrossRef](#)]
76. Newby, A.C. Matrix metalloproteinases regulate migration, proliferation, and death of vascular smooth muscle cells by degrading matrix and non-matrix substrates. *Cardiovasc. Res.* **2006**, *69*, 614–624. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Ohtani, H. Stromal reaction in cancer tissue: Pathophysiologic significance of the expression of matrix-degrading enzymes in relation to matrix turnover and immune/inflammatory reactions. *Pathol. Int.* **1998**, *48*, 1–9. [[CrossRef](#)]
78. Peeters, S.A.; Engelen, L.; Buijs, J.; Chaturvedi, N.; Fuller, J.H.; Jorsal, A.; Parving, H.H.; Tarnow, L.; Theilade, S.; Rossing, P.; et al. Circulating matrix metalloproteinases are associated with arterial stiffness in patients with type 1 diabetes: Pooled analysis of three cohort studies. *Cardiovasc. Diabetol.* **2017**, *16*, 139. [[CrossRef](#)]
79. Goncalves, I.; Bengtsson, E.; Colhoun, H.M.; Shore, A.C.; Palombo, C.; Natali, A.; Edsfeldt, A.; Duner, P.; Fredrikson, G.N.; Bjorkbacka, H.; et al. Elevated Plasma Levels of MMP-12 Are Associated with Atherosclerotic Burden and Symptomatic Cardiovascular Disease in Subjects With Type 2 Diabetes. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2015**, *35*, 1723–1731. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
80. Loftus, I.M.; Naylor, A.R.; Bell, P.R.; Thompson, M.M. Matrix metalloproteinases and atherosclerotic plaque instability. *Br. J. Surg.* **2002**, *89*, 680–694. [[CrossRef](#)]
81. Lutun, A.; Lutgens, E.; Manderveld, A.; Maris, K.; Collen, D.; Carmeliet, P.; Moons, L. Loss of matrix metalloproteinase-9 or matrix metalloproteinase-12 protects apolipoprotein E-deficient mice against atherosclerotic media destruction but differentially affects plaque growth. *Circulation* **2004**, *109*, 1408–1414. [[CrossRef](#)]
82. Fic, P.; Zakrocka, I.; Kurzepa, J.; Stepulak, A. Matrix metalloproteinases and atherosclerosis. *Postepy Hig. Med. Dosw.* **2011**, *65*, 16–27. [[CrossRef](#)]
83. Armstrong, D.G.; Jude, E.B. The role of matrix metalloproteinases in wound healing. *J. Am. Podiatr. Med. Assoc.* **2002**, *92*, 12–18. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Falanga, V. The chronic wound: Impaired healing and solutions in the context of wound bed preparation. *Blood Cells Mol. Dis.* **2004**, *32*, 88–94. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Gibson, D.J.; Schultz, G.S. Molecular Wound Assessments: Matrix Metalloproteinases. *Adv. Wound Care* **2013**, *2*, 18–23. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
86. Menke, M.N.; Menke, N.B.; Boardman, C.H.; Diegelmann, R.F. Biologic therapeutics and molecular profiling to optimize wound healing. *Gynecol. Oncol.* **2008**, *111*, S87–S91. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
87. Li, Z.; Guo, S.; Yao, F.; Zhang, Y.; Li, T. Increased ratio of serum matrix metalloproteinase-9 against TIMP-1 predicts poor wound healing in diabetic foot ulcers. *J. Diabetes Complicat.* **2013**, *27*, 380–382. [[CrossRef](#)]
88. Cardellini, M.; Menghini, R.; Martelli, E.; Casagrande, V.; Marino, A.; Rizza, S.; Porzio, O.; Mauriello, A.; Solini, A.; Ippoliti, A.; et al. TIMP3 is reduced in atherosclerotic plaques from subjects with type 2 diabetes and increased by SirT1. *Diabetes* **2009**, *58*, 2396–2401. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
89. Taleb, S.; Lacasa, D.; Bastard, J.P.; Poitou, C.; Canello, R.; Pelloux, V.; Viguerie, N.; Benis, A.; Zucker, J.D.; Bouillot, J.L.; et al. Cathepsin S, a novel biomarker of adiposity: Relevance to atherogenesis. *FASEB J.* **2005**, *19*, 1540–1542. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
90. Taleb, S.; Canello, R.; Clement, K.; Lacasa, D. Cathepsin s promotes human preadipocyte differentiation: Possible involvement of fibronectin degradation. *Endocrinology* **2006**, *147*, 4950–4959. [[CrossRef](#)]
91. Yang, M.; Zhang, Y.; Pan, J.; Sun, J.; Liu, J.; Libby, P.; Sukhova, G.K.; Doria, A.; Katunuma, N.; Peroni, O.D.; et al. Cathepsin L activity controls adipogenesis and glucose tolerance. *Nat. Cell Biol.* **2007**, *9*, 970–977. [[CrossRef](#)]
92. Lutgens, E.; Lutgens, S.P.; Faber, B.C.; Heeneman, S.; Gijbels, M.M.; de Winther, M.P.; Frederik, P.; van der Made, I.; Daugherty, A.; Sijbers, A.M.; et al. Disruption of the cathepsin K gene reduces atherosclerosis progression and induces plaque fibrosis but accelerates macrophage foam cell formation. *Circulation* **2006**, *113*, 98–107. [[CrossRef](#)]
93. Matsumoto, F.; Saitoh, S.; Fukui, R.; Kobayashi, T.; Tanimura, N.; Konno, K.; Kusumoto, Y.; Akashi-Takamura, S.; Miyake, K. Cathepsins are required for Toll-like receptor 9 responses. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2008**, *367*, 693–699. [[CrossRef](#)]
94. Liu, J.; Ma, L.; Yang, J.; Ren, A.; Sun, Z.; Yan, G.; Sun, J.; Fu, H.; Xu, W.; Hu, C.; et al. Increased serum cathepsin S in patients with atherosclerosis and diabetes. *Atherosclerosis* **2006**, *186*, 411–419. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
95. Jankun, J.; Al-Senaïdy, A.; Skrzypczak-Jankun, E. Can inactivators of plasminogen activator inhibitor alleviate the burden of obesity and diabetes? (Review). *Int. J. Mol. Med.* **2012**, *29*, 3–11. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

96. Yarmolinsky, J.; Bordin Barbieri, N.; Weinmann, T.; Ziegelmann, P.K.; Duncan, B.B.; Ines Schmidt, M. Plasminogen activator inhibitor-1 and type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis of observational studies. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 17714. [[CrossRef](#)]
97. Muehlenweg, B.; Sperl, S.; Magdolen, V.; Schmitt, M.; Harbeck, N. Interference with the urokinase plasminogen activator system: A promising therapy concept for solid tumours. *Expert. Opin. Biol. Ther.* **2001**, *1*, 683–691. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
98. Hao, G.H.; Niu, X.L.; Gao, D.F.; Wei, J.; Wang, N.P. Agonists at PPAR-gamma suppress angiotensin II-induced production of plasminogen activator inhibitor-1 and extracellular matrix in rat cardiac fibroblasts. *Br. J. Pharmacol.* **2008**, *153*, 1409–1419. [[CrossRef](#)]
99. Moroe, H.; Fujii, H.; Honda, H.; Arai, K.; Kanazawa, M.; Notoya, Y.; Kogo, H. Characterization of endothelium-dependent relaxation and modulation by treatment with pioglitazone in the hypercholesterolemic rabbit renal artery. *Eur. J. Pharmacol.* **2004**, *497*, 317–325. [[CrossRef](#)]
100. Kovanen, P.T. Mast cells in human fatty streaks and atheromas: Implications for intimal lipid accumulation. *Curr. Opin. Lipidol.* **1996**, *7*, 281–286. [[CrossRef](#)]
101. Kokkonen, J.O.; Kovanen, P.T. Low density lipoprotein degradation by rat mast cells. Demonstration of extracellular proteolysis caused by mast cell granules. *J. Biol. Chem.* **1985**, *260*, 14756–14763. [[CrossRef](#)]
102. Kokkonen, J.O.; Kovanen, P.T. Stimulation of mast cells leads to cholesterol accumulation in macrophages in vitro by a mast cell granule-mediated uptake of low density lipoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, *84*, 2287–2291. [[CrossRef](#)]
103. Dong, J.; Chen, L.; Zhang, Y.; Jayaswal, N.; Mezghani, I.; Zhang, W.; Veves, A. Mast Cells in Diabetes and Diabetic Wound Healing. *Adv. Ther.* **2020**, *37*, 4519–4537. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
104. Conti, P.; Ronconi, G.; Kritas, S.K.; Caraffa, A.; Theoharides, T.C. Activated Mast Cells Mediate Low-Grade Inflammation in Type 2 Diabetes: Interleukin-37 Could Be Beneficial. *Can. J. Diabetes* **2018**, *42*, 568–573. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
105. Gofman, J.W.; Lindgren, F.; Elliott, H.; Mantz, W.; Hewitt, J.; Strisower, B.; Herring, V.; Lyon, T.P. The Role of Lipids and Lipoproteins in Atherosclerosis. *Science* **1950**, *111*, 166–186. [[CrossRef](#)]
106. Han, S.; Liang, C.P.; DeVries-Seimon, T.; Ranalletta, M.; Welch, C.L.; Collins-Fletcher, K.; Accili, D.; Tabas, I.; Tall, A.R. Macrophage insulin receptor deficiency increases ER stress-induced apoptosis and necrotic core formation in advanced atherosclerotic lesions. *Cell Metab.* **2006**, *3*, 257–266. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
107. Chavez-Sanchez, L.; Garza-Reyes, M.G.; Espinosa-Luna, J.E.; Chavez-Rueda, K.; Legorreta-Haquet, M.V.; Blanco-Favela, F. The role of TLR2, TLR4 and CD36 in macrophage activation and foam cell formation in response to oxLDL in humans. *Hum. Immunol.* **2014**, *75*, 322–329. [[CrossRef](#)]
108. Puchalowicz, K.; Rac, M.E. The Multifunctionality of CD36 in Diabetes Mellitus and Its Complications-Update in Pathogenesis, Treatment and Monitoring. *Cells* **2020**, *9*, 1877. [[CrossRef](#)]
109. Handberg, A.; Levin, K.; Hojlund, K.; Beck-Nielsen, H. Identification of the oxidized low-density lipoprotein scavenger receptor CD36 in plasma: A novel marker of insulin resistance. *Circulation* **2006**, *114*, 1169–1176. [[CrossRef](#)]
110. Ekici, M.; Kisa, U.; Arikan Durmaz, S.; Ugur, E.; Nergiz-Unal, R. Fatty acid transport receptor soluble CD36 and dietary fatty acid pattern in type 2 diabetic patients: A comparative study. *Br. J. Nutr.* **2018**, *119*, 153–162. [[CrossRef](#)]
111. Kulkarni, N.B.; Ganu, M.U.; Godbole, S.G.; Deo, S.S. Assessment of potential biomarkers of atherosclerosis in Indian patients with type 2 diabetes mellitus. *Indian J. Med. Res.* **2018**, *147*, 169–176. [[CrossRef](#)]
112. Ishigaki, Y.; Katagiri, H.; Gao, J.; Yamada, T.; Imai, J.; Uno, K.; Hasegawa, Y.; Kaneko, K.; Ogihara, T.; Ishihara, H.; et al. Impact of plasma oxidized low-density lipoprotein removal on atherosclerosis. *Circulation* **2008**, *118*, 75–83. [[CrossRef](#)]
113. Ludwig, A.; Weber, C. Transmembrane chemokines: Versatile ‘special agents’ in vascular inflammation. *Thromb. Haemost.* **2007**, *97*, 694–703.
114. Grada, A.; Mervis, J.; Falanga, V. Research Techniques Made Simple: Animal Models of Wound Healing. *J. Investig. Dermatol.* **2018**, *138*, 2095–2105.e2091. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
115. Gerritsen, G.C. The Chinese hamster as a model for the study of diabetes mellitus. *Diabetes* **1982**, *31*, 14–23. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
116. Guerre-Millo, M. Regulation of ob gene and overexpression in obesity. *Biomed. Pharmacother.* **1997**, *51*, 318–323. [[CrossRef](#)]
117. Velander, P.; Theopold, C.; Hirsch, T.; Bleiziffer, O.; Zuhaili, B.; Fossum, M.; Hoeller, D.; Gheerardyn, R.; Chen, M.; Visovatti, S.; et al. Impaired wound healing in an acute diabetic pig model and the effects of local hyperglycemia. *Wound Repair Regen.* **2008**, *16*, 288–293. [[CrossRef](#)]
118. Deeds, M.C.; Anderson, J.M.; Armstrong, A.S.; Gastineau, D.A.; Hiddinga, H.J.; Jahangir, A.; Eberhardt, N.L.; Kudva, Y.C. Single dose streptozotocin-induced diabetes: Considerations for study design in islet transplantation models. *Lab. Anim.* **2011**, *45*, 131–140. [[CrossRef](#)]
119. Fang, R.C.; Kryger, Z.B.; Buck, D.W., II; De la Garza, M.; Galiano, R.D.; Mustoe, T.A. Limitations of the db/db mouse in translational wound healing research: Is the NONcNZO10 polygenic mouse model superior? *Wound Repair Regen.* **2010**, *18*, 605–613. [[CrossRef](#)]
120. Sanapalli, B.K.R.; Yele, V.; Singh, M.K.; Thaggikuppe Krishnamurthy, P.; Karri, V. Preclinical models of diabetic wound healing: A critical review. *Biomed. Pharmacother.* **2021**, *142*, 111946. [[CrossRef](#)]
121. Huynh, P.; Phie, J.; Krishna, S.M.; Golledge, J. Systematic review and meta-analysis of mouse models of diabetes-associated ulcers. *BMJ Open Diabetes Res. Care* **2020**, *8*, e000982. [[CrossRef](#)]

122. Mestas, J.; Hughes, C.C. Of mice and not men: Differences between mouse and human immunology. *J. Immunol.* **2004**, *172*, 2731–2738. [[CrossRef](#)]
123. Mieczkowski, M.; Mrozikiewicz-Rakowska, B.; Siwko, T.; Bujalska-Zadrozny, M.; de Corde-Skurska, A.; Wolinska, R.; Gasinska, E.; Grzela, T.; Foltynski, P.; Kowara, M.; et al. Insulin, but Not Metformin, Supports Wound Healing Process in Rats with Streptozotocin-Induced Diabetes. *Diabetes Metab. Syndr. Obes.* **2021**, *14*, 1505–1517. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
124. Tesfaye, S.; Chaturvedi, N.; Eaton, S.E.; Ward, J.D.; Manes, C.; Ionescu-Tirgoviste, C.; Witte, D.R.; Fuller, J.H.; Group, E.P.C.S. Vascular risk factors and diabetic neuropathy. *N. Engl. J. Med.* **2005**, *352*, 341–350. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
125. Bujalska, M.; Tatarkiewicz, J.; de Corde, A.; Gumulka, S.W. Effect of cyclooxygenase and nitric oxide synthase inhibitors on streptozotocin-induced hyperalgesia in rats. *Pharmacology* **2008**, *81*, 151–157. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
126. Xie, P.; Jia, S.; Tye, R.; Chavez-Munoz, C.; Vracar-Grabar, M.; Hong, S.J.; Galiano, R.; Mustoe, T.A. Systemic administration of hemoglobin improves ischemic wound healing. *J. Surg. Res.* **2015**, *194*, 696–705. [[CrossRef](#)]
127. Constantine, B.E.; Bolton, L.L. A wound model for ischemic ulcers in the guinea pig. *Arch. Dermatol. Res.* **1986**, *278*, 429–431. [[CrossRef](#)]
128. Peirce, S.M.; Skalak, T.C.; Rodeheaver, G.T. Ischemia-reperfusion injury in chronic pressure ulcer formation: A skin model in the rat. *Wound Repair Regen.* **2000**, *8*, 68–76. [[CrossRef](#)]
129. Sullivan, T.P.; Eaglston, W.H.; Davis, S.C.; Mertz, P. The pig as a model for human wound healing. *Wound Repair Regen.* **2001**, *9*, 66–76. [[CrossRef](#)]
130. Falanga, V. Wound healing and its impairment in the diabetic foot. *Lancet* **2005**, *366*, 1736–1743. [[CrossRef](#)]
131. Lee, J.; Hong, E.M.; Kim, J.H.; Jung, J.H.; Park, S.W.; Koh, D.H.; Choi, M.H.; Jang, H.J.; Kae, S.H. Metformin Induces Apoptosis and Inhibits Proliferation through the AMP-Activated Protein Kinase and Insulin-like Growth Factor 1 Receptor Pathways in the Bile Duct Cancer Cells. *J. Cancer* **2019**, *10*, 1734–1744. [[CrossRef](#)]
132. Biancari, F.; Giordano, S. Glycated Hemoglobin and the Risk of Sternal Wound Infection After Adult Cardiac Surgery: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Semin. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **2019**, *31*, 465–467. [[CrossRef](#)]
133. Mrozikiewicz-Rakowska, B.; Tomasz, M.M.; Siwko, J.; Bujalska-Zadrozny, M.; de Corde, A.; Gasińska, E.; Kulik, K.; Grzela, T.; Krejmer, A.; Dulski, R.; et al. Nowy Model Ran Przewlekłych W Cukrzycy—Badanie Pilotażowe U Szczurów Rasy Wistar. *Leczenie Ran* **2015**, *12*, 33–39.
134. Galiano, R.D.; Michaels, J.T.; Dobryansky, M.; Levine, J.P.; Gurtner, G.C. Quantitative and reproducible murine model of excisional wound healing. *Wound Repair Regen.* **2004**, *12*, 485–492. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
135. Yao, Z.; Huang, Y.; Luo, G.; Wu, J.; He, W. A biological membrane-based novel excisional wound-splinting model in mice (With video). *Burns Trauma* **2014**, *2*, 196–200. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
136. Reiss, M.J.; Han, Y.P.; Garcia, E.; Goldberg, M.; Yu, H.; Garner, W.L. Matrix metalloproteinase-9 delays wound healing in a murine wound model. *Surgery* **2010**, *147*, 295–302. [[CrossRef](#)]
137. Wang, A.N.; Carlos, J.; Fraser, G.M.; McGuire, J.J. Zucker Diabetic-Sprague Dawley (ZDSD) rat: Type 2 diabetes translational research model. *Exp. Physiol.* **2022**, *107*, 265–282. [[CrossRef](#)]
138. Yokoi, N.; Hoshino, M.; Hidaka, S.; Yoshida, E.; Beppu, M.; Hoshikawa, R.; Sudo, K.; Kawada, A.; Takagi, S.; Seino, S. A Novel Rat Model of Type 2 Diabetes: The Zucker Fatty Diabetes Mellitus ZFDM Rat. *J. Diabetes Res.* **2013**, *2013*, 103731. [[CrossRef](#)]
139. Ruzicka, J.; Grajciarova, M.; Vistejnova, L.; Klein, P.; Tichanek, F.; Tonar, Z.; Dejmek, J.; Benes, J.; Bolek, L.; Bajgar, R.; et al. Hyperbaric oxygen enhances collagen III formation in wound of ZDF rat. *Physiol. Res.* **2021**, *70*, 787–798. [[CrossRef](#)]
140. Mendez, L.; Munoz, S.; Miralles-Perez, B.; Nogues, M.R.; Ramos-Romero, S.; Torres, J.L.; Medina, I. Modulation of the Liver Protein Carbonylome by the Combined Effect of Marine Omega-3 PUFAs and Grape Polyphenols Supplementation in Rats Fed an Obesogenic High Fat and High Sucrose Diet. *Mar. Drugs* **2019**, *18*, 34. [[CrossRef](#)]
141. Walicka, M.; Raczynska, M.; Marcinkowska, K.; Lisicka, I.; Czaicki, A.; Wierzba, W.; Franek, E. Amputations of Lower Limb in Subjects with Diabetes Mellitus: Reasons and 30-Day Mortality. *J. Diabetes Res.* **2021**, *2021*, 8866126. [[CrossRef](#)]

7. Zakończenie

7.1. Podsumowanie

Na podstawie przeglądu dostępnego piśmiennictwa, dokładnie przytoczonego w **pracy pogładowej nr 3** wraz z odniesieniem do własnych doświadczeń z **prac oryginalnych 1 i 2**, można stwierdzić, że odwzorowanie w modelu zwierzęcym złożoności procesów patofizjologicznych zmian zachodzących w wieloletniej, niewyrównanej cukrzycy oraz powstałych w jej wyniku ran przewlekłych (m.in zespół stopy cukrzycowej) pozostają nadal wyzwaniem współczesnego projektowania badań klinicznych. Stworzenie takiego modelu w istotny sposób przyspieszyłoby badania nad nowoczesnymi cząsteczkami wykorzystywanymi następnie w praktyce klinicznej.

Przedstawiona rozprawa doktorska składa się z cyklu publikacji o spójnej tematyce dotyczącej projektowania oraz wykorzystania w praktyce zwierzęcego modelu rany przewlekłej, który możliwie jak najwierniej odwzorowywałby warunki u chorych na cukrzycę. W pierwszej części rozprawy (**prace nr 1 i 2**), przedstawiono 2 modele rany u szczurów z cukrzycą streptozotocynową i dokonano analizy zachowania się ran w zależności od zastosowanego leczenia i warunków wyrównania glikemii. Model zastosowany w **pracy nr 2** jest efektem doświadczeń jakie zespół badaczy wyniósł z badania opisanego w **pracy nr 1**. Natomiast w kolejnej części rozprawy (**praca nr 3**) dokonano analizy mającej na celu optymalizację procesu przygotowania modelu rany zwierzęcej w cukrzycy.

W **pracy nr 1** przedstawiono wyniki badania pilotażowego, którego celem była ocena przydatności stworzonego po analizie dostępnego piśmiennictwa, modelu rany przewlekłej u szczurów rasy Wistar z cukrzycą streptozotocynową. Ostateczną fazę badania przeprowadzono na 14 osobnikach ze stwierdzonymi cechami neuropatii czuciowej oraz spełniającymi kryteriami średnio ciężkiej cukrzycy (glikemie w zakresie 250-350 mg/dl). Zwierzęta podzielono na dwie grupy (I - leczenie insuliną w warunkach normoglikemii 80-150 mg/dl oraz II - grupa kontrolna otrzymująca dootrzewnowo iniekcje soli fizjologicznej). W obydwu grupach dokonywano wytworzenia powierzchownej rany. W grupie I, leczonej insuliną, zaobserwowano po pierwszych 3 dniach przejściowe powiększenie powierzchni rany w stosunku do grupy II, mimo ogólnie znacznie szybszego tempa gojenia rany w grupie I w punkcie końcowym (po 12 dniach), co było wynikiem braku stabilizacji rany z uwagi na odmienny mechanizm gojenia ran u szczurów.

W **pracy nr 2** dokonano modyfikacji modelu opisanego w pracy nr 1. Z uwagi na opisywany mechanizm kontrakcji zastosowano stabilizację rany za pomocą krążka

silikonowego, co zapewniło standaryzację całego procesu gojenia rany. Kolejną modyfikacją było przyjęcie założenia odwzorowania stanu niewyrównania metabolicznego cukrzycy poprzez utrzymywanie przez cały proces obserwacji stale niewyrównanych w przedziale 350-450 mg/dl. Analiza statystyczna wykazała istotne różnice średnich zmian pól powierzchni rany przez cały okres obserwacji gojenia rany, pomiędzy grupą zwierząt, którym podawano insulinę (grupa I) a grupą, której podawano metforminę (grupa II) oraz pomiędzy grupą przyjmującą insulinę (grupa I) a grupą kontrolną (grupa III). Nie odnotowano natomiast istotnej statystycznie różnicy między grupą otrzymującą metforminę (grupa II) a grupą kontrolną (grupa III). Analiza histopatologiczna wykazała istotnie niższy poziom nacieku komórek zapalnego w grupie leczonej insuliną (grupa I) w stosunku do obrazu u szczurów leczonych metforminą (grupa II) oraz grupą kontrolną (grupa III). Analiza immunohistochemiczna wykazała, że najwyższy współczynnik gojenia ran w grupie otrzymującej insulinę (grupa I) w stosunku do grupy otrzymującej metforminę (grupa II) był związany z największą gęstością ośrodków proliferacji (indeks proliferacyjny dla Ki67 - 27,5% w grupie I vs 18% w grupie II). Wyniki naszego badania wskazują, że leczenie insuliną jest efektywniejsze w procesie gojenia ran w naszym modelu cukrzycowym niż metformina, niezależnie od efektu utrzymującej się hiperglikemii. Może to wskazywać, że insulina i metformina uruchamiają różne ścieżki molekularne, które w różny sposób wpływają na gojenie się ran.

W **pracy nr 3** porównano mechanizmy patofizjologicznych rozwoju powikłań w cukrzycy u ludzi, które skonfrontowano z analogicznymi procesami u zwierząt doświadczalnych. Następnie wykazano różnice w modelu ludzkim i zwierzęcym rany w cukrzycy. Na tej podstawie przeanalizowano badania nakierowane na analizę zarówno procesu gojenia rany *per se*, jak i z zastosowaniem różnych form interwencji farmakologicznej w modelu zwierzęcym. Ostatecznie dokonano propozycji, w jaki sposób należałoby zaprojektować badanie nakierowane na leczenie rany w zwierzęcym modelu cukrzycy. Stworzenie takiego modelu w istotny sposób przyspieszyłoby badania nad nowoczesnymi cząsteczkami wykorzystywanymi następnie w praktyce klinicznej.

7.2. Wnioski

Na podstawie przeprowadzonych badań można postawić następujące wnioski:

1. Model zwierzęcy rany przewlekłej w cukrzycy powinien uwzględniać następujące elementy:
 - a) standaryzacja metod tworzenia rany
 - zastosowanie metod umożliwiających porównanie procesu gojenia rany u różnych osobników i gatunków, np. poprzez zastosowanie krążka silikonowego,
 - sposób generowania rany zależny od zaplanowanego charakteru etiopatogenezy rany (rana o etiologii niedokrwiennej, neuropatycznej, oparzeniowej),
 - zastosowanie substancji/sposobu wywołujących obecność pożądanych cech rany, np. cech stanu zapalnego, (w prezentowanych badaniach lipopolisacharyd bakteryjny),
 - dobór metod służących monitorowaniu wielkości rany (dokładność, łatwość obsługi, cena),
 - b) optymalny dobór zwierzęcia doświadczalnego (np. dB/dB, ob/ob) oraz sposobu generowania cukrzycy (alloksanowa, streptozotocynowa z/bez zastosowania nikotynamidu) dostosowany do celu projektowanego badania,
 - c) minimalizacja cierpienia zwierząt doświadczalnych zgodnie z zasadą 3 R, np. atraumatyczne mocowanie opatrunku.
2. Poza bezpośrednim wpływem na glikemie leki przeciwcukrzycowe mają różny potencjał wpływu na proces gojenia ran. Insulina istotnie bardziej pobudza proces proliferacji komórek w procesie regeneracji rany w stosunku do metforminy w zwierzęcym modelu cukrzycy streptozotocynowej.
3. Optymalnie zaplanowany model rany zwierzęcej w cukrzycy może służyć znacznemu przyspieszeniu badań nad wprowadzeniem nowych cząsteczek farmakologicznych, w tym o pierwotnym działaniu przeciwcukrzycowym, w leczeniu trudno gojących się ran u ludzi.

8. Bibliografia

1. International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas, 10th edn. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation, 2021.
2. Bowers S, Franco E. Chronic Wounds: Evaluation and Management. *Am Fam Physician*. 2020 Feb 1;101(3):159-166. PMID: 32003952.
3. Forbes JM, Cooper ME. Mechanisms of diabetic complications. *Physiol Rev*. 2013 Jan;93(1):137-88. doi: 10.1152/physrev.00045.2011. PMID: 23303908.
4. Singh N, Armstrong DG, Lipsky BA. Preventing Foot Ulcers in Patients With Diabetes. *JAMA*. 2005;293(2):217–228. doi:10.1001/jama.293.2.217
5. Reiber GE. The epidemiology of diabetic foot problems. *Diabet Med*. 1996;13 Suppl 1:S6-11. PMID: 8741821.
6. Richard, J.-L., Lavigne, J.-P. and Sotto, A. (2012), Diabetes and foot infection: more than double trouble. *Diabetes Metab Res Rev*, 28: 46-53. <https://doi.org/10.1002/dmrr.2234>
7. Kolluru GK, Bir SC, Kevil CG. Endothelial dysfunction and diabetes: effects on angiogenesis, vascular remodeling, and wound healing. *Int J Vasc Med*. 2012;2012:918267. doi:10.1155/2012/918267
8. Society for Vascular Surgery Lower Extremity Guidelines Writing Group, Conte MS, Pomposelli FB, Clair DG, Geraghty PJ, McKinsey JF, Mills JL, Moneta GL, Murad MH, Powell RJ, Reed AB, Schanzer A, Sidawy AN; Society for Vascular Surgery. Society for Vascular Surgery practice guidelines for atherosclerotic occlusive disease of the lower extremities: management of asymptomatic disease and claudication. *J Vasc Surg*. 2015 Mar;61(3 Suppl):2S-41S. doi: 10.1016/j.jvs.2014.12.009. Epub 2015 Jan 28. Erratum in: *J Vasc Surg*. 2015 May;61(5):1382. PMID: 25638515.
9. Andrea L.Christman, ElizabethSelvin, David J.Margolis, Gerald S.Lazarus, Luis A.Garza; Hemoglobin A1c Predicts Healing Rate in Diabetic Wounds; *Journal of Investigative Dermatology*. Volume 131, Issue 10, October 2011, Pages 2121-2127
10. Marhoffer W, Stein M, Maeser E, Federlin K. Impairment of polymorphonuclear leukocyte function and metabolic control of diabetes. *Diabetes Care*. 1992 Feb;15(2):256-60.
11. Geerlings SE, Hoepelman AI. immune dysfunction in patients with diabetes melitus (DM). *FEMS Immunol Med. Microbiol* 1999; 26; 259-265
12. Kizub, I.V.; Klymenko, K.I.; Soloviev, A.I. Protein kinase C in enhanced vascular tone in diabetes mellitus. *Int. J. Cardiol*. 2014, 174, 230–242

13. Brownlee, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 2001, 414, 813–820.
14. Rask-Madsen, C.; King, G.L. Vascular complications of diabetes: Mechanisms of injury and protective factors. *Cell Metab.* 2013, 17, 20–33
15. Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev.* 2007 Jan;87(1):245-313. doi: 10.1152/physrev.00044.2005. PMID: 17237347.
16. Goldin A, Beckman JA, Schmidt AM, Creager MA. Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury. *Circulation.* 2006 Aug 8;114(6):597-605. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.621854. PMID: 16894049.
17. Vincent, A.M.; Callaghan, B.C.; Smith, A.L.; Feldman, E.L. Diabetic neuropathy: Cellular mechanisms as therapeutic targets. *Nat.Rev. Neurol.* 2011, 7, 573–583.
18. I. Halczuk, P. Halczuk, M. Tynecka-Turowska, K. Rejdak; Neuropatia cukrzycowa – wielokierunkowe postępowanie aspektem dobrostanu w chorobie; Rozdział 10, *Zdrowie Publiczne Standardem Dobrostanu*; Wydawnictwo Naukowe NeuroCentrum, Lublin, ISBN 978-83-61495-95-6
19. Suri A, Szallasi A. The emerging role of TRPV1 in diabetes and obesity. *Trends Pharmacol Sci.* 2008 Jan;29(1):29-36. doi: 10.1016/j.tips.2007.10.016. Epub 2007 Dec 4. PMID: 18055025.
20. Fromy B, Lingueglia E, Sigaud-Roussel D, Saumet JL, Lazdunski M. Asic3 is a neuronal mechanosensor for pressure-induced vasodilation that protects against pressure ulcers. *Nat Med.* 2012 Aug;18(8):1205-7. doi: 10.1038/nm.2844. Epub 2012 Jul 29. PMID: 22842475.
21. Shepherd AJ, Downing JE, Miyan JA. Without nerves, immunology remains incomplete -in vivo veritas. *Immunology.* 2005 Oct;116(2):145-63. doi: 10.1111/j.1365-2567.2005.02223.x. PMID: 16162264; PMCID: PMC1817817.
22. Roosterman D, Goerge T, Schneider SW, Bunnett NW, Steinhoff M. Neuronal control of skin function: the skin as a neuroimmunoendocrine organ. *Physiol Rev.* 2006 Oct;86(4):1309-79. doi: 10.1152/physrev.00026.2005. PMID: 17015491.
23. Peters, E.M.; Ericson, M.E.; Hosoi, J.; Seiffert, K.; Hordinsky, M.K.; Ansel, J.C.; Paus, R.; Scholzen, T.E. Neuropeptide control mechanisms in cutaneous biology: Physiological and clinical significance. *J. Investig. Dermatol.* 2006, 126, 1937–1947.
24. Siudem, P.; Paradowska, K. Structure, function, and mechanism of action of the vanilloid TRPV1 receptor. *Postępy Hig. i Med.Doswiadczalnej* 2020, 74, 481–488.

25. Sharma S, Schaper N, Rayman G. Microangiopathy: Is it relevant to wound healing in diabetic foot disease? *Diabetes Metab Res Rev.* 2020 Mar;36 Suppl 1:e3244. doi: 10.1002/dmrr.3244. Epub 2019 Dec 16. PMID: 31845461.
26. W. T. Cefalu, "Animal models of type 2 diabetes: clinical presentation and pathophysiological relevance to the human condition," *ILAR Journal*, vol. 47, no. 3, pp. 186–198, 2006.
27. Grada A, Mervis J, Falanga V. Research Techniques Made Simple: Animal Models of Wound Healing. *J Invest Dermatol.* 2018 Oct;138(10):2095-2105.e1. doi: 10.1016/j.jid.2018.08.005. PMID: 30244718.
28. Randall LO, Selitto JJ. A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue. *Arch Int Pharmacodyn Ther.* 1957;111:409–419.
29. Tesfaye, S.; Chaturvedi, N.; Eaton, S.E.; Ward, J.D.; Manes, C.; Ionescu-Tirgoviste, C.; Witte, D.R.; Fuller, J.H.; Group, E.P.C.S. Vascular risk factors and diabetic neuropathy. *N. Engl. J. Med.* 2005, 352, 341–350.
30. Sanapalli, B.K.R.; Yele, V.; Singh, M.K.; Thaggikuppe Krishnamurthy, P.; Karri, V. Preclinical models of diabetic wound healing: A critical review. *Biomed. Pharmacother.* 2021, 142, 111946
31. Deeds, M.C.; Anderson, J.M.; Armstrong, A.S.; Gastineau, D.A.; Hiddinga, H.J.; Jahangir, A.; Eberhardt, N.L.; Kudva, Y.C. Single dose streptozotocin-induced diabetes: Considerations for study design in islet transplantation models. *Lab. Anim.* 2011, 45, 131–140
32. Fang, R.C.; Kryger, Z.B.; Buck, D.W., II; De la Garza, M.; Galiano, R.D.; Mustoe, T.A. Limitations of the db/db mouse in translational wound healing research: Is the NONcNZO10 polygenic mouse model superior? *Wound Repair Regen.* 2010, 18, 605–613.
33. Szkudelski T. Streptozotocin–nicotinamide-induced diabetes in the rat. Characteristics of the experimental model. *Experimental Biology and Medicine.* 2012;237(5):481-490. doi:10.1258/ebm.2012.011372
34. Hoftiezer, V., Carpenter, A.M. Comparison of streptozotocin and alloxan-induced diabetes in the rat, including volumetric quantitation of the pancreatic islets. *Diabetologia* 9, 178–184 (1973). <https://doi.org/10.1007/BF01219780>
35. Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res.* 2001;50(6):537-46. PMID: 11829314.
36. Rohilla Ankur, Ali Shahjad; Alloxan Induced Diabetes: Mechanisms and Effects *3Int J Res Pharm Biomed Sci*; 3, 2012/01/01

37. Lenzen, S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia* 51, 216–226 (2008). <https://doi.org/10.1007/s00125-007-0886-7>
38. D. Šoltsova, I. Herichova; On The Mechanisms of Diabetogenic Effects of Alloxan And Streptozotocin; *Diabetologie Metabolismus Endokrinologie Vyziva*; 2011}, Volume 14/3};130-138}
39. Ayuk, S.M.; Abrahamse, H.; Houreld, N.N. The Role of Matrix Metalloproteinases in Diabetic Wound Healing in relation to Photobiomodulation. *J. Diabetes Res.* 2016, 2016, 2897656
40. Witko-Sarsat, V.; Rieu, P.; Descamps-Latscha, B.; Lesavre, P.; Halbwachs-Mecarelli, L. Neutrophils: Molecules, functions and pathophysiological aspects. *Lab. Investig.* 2000, 80, 617–653
41. Christman, A.L.; Selvin, E.; Margolis, D.J.; Lazarus, G.S.; Garza, L.A. Hemoglobin A1c predicts healing rate in diabetic wounds. *J. Investig. Dermatol.* 2011, 131, 2121–2127.
42. Marhoffer, W.; Stein, M.; Maeser, E.; Federlin, K. Impairment of polymorphonuclear leukocyte function and metabolic control of diabetes. *Diabetes Care* 1992, 15, 256–260
43. Dandona P, Aljada A, Mohanty P, Ghanim H, Hamouda W, Assian E, Ahmad S. Insulin inhibits intranuclear nuclear factor kappaB and stimulates IkappaB in mononuclear cells in obese subjects: evidence for an anti-inflammatory effect? *J Clin Endocrinol Metab.* 2001 Jul;86(7):3257-65. doi: 10.1210/jcem.86.7.7623. PMID: 11443198.
44. Wang J, Xu J. Effects of topical insulin on wound healing: a review of animal and human evidences. *Diabetes Metab Syndr Obes.* 2020;13:719–727. doi:10.2147/DMSO.S237294
45. Yu T, Gao M, Yang P, et al. Topical insulin accelerates cutaneous wound healing in insulin-resistant diabetic rats. *Am J Transl Res.* 2017;9(10):4682–4693
46. Verma A, Rich LJ, Vincent-Chong VK, Seshadri M. Visualizing the effects of metformin on tumor growth, vascularity and metabolism in head and neck cancer. *J Oral Pathol Med.* 2018;47(5):484–491. doi:10.1111/jop.12705
47. Lee J, Hong EM, Kim JH, et al. Metformin induces apoptosis and inhibits proliferation through the AMP-activated protein kinase and insulin-like growth factor 1 receptor pathways in the bile duct cancer cells. *J Cancer.* 2019;10(7):1734–1744. doi:10.7150/jca.26380
48. Han X, Tao Y, Deng Y, Yu J, Sun Y, Jiang G. Metformin accelerates wound healing in type 2 diabetic db/db mice. *Mol Med Rep.* 2017 Dec;16(6):8691-8698. doi: 10.3892/mmr.2017.7707. Epub 2017 Oct 4. PMID: 28990070; PMCID: PMC5779947.

49. Qing L, Fu J, Wu P, et al. Metformin induces the M2 macrophage polarization to accelerate the wound healing via regulating AMPK/ mTOR/NLRP3 inflammasome signaling pathway. *Am J Transl Res.* 2019;11(2):655–668
50. Saboo A, Rathnayake A, Vangaveti VN, Malabu UH. Wound healing effects of dipeptidyl peptidase-4 inhibitors: An emerging concept in management of diabetic foot ulcer- A review. *Diabetes Metab Syndr.* 2016 Apr-Jun;10(2):113-9. doi: 10.1016/j.dsx.2015.04.006. Epub 2015 Apr 25. PMID: 25990796.
51. Marfella R, Sasso FC, Rizzo MR, Paolisso P, Barbieri M, Padovano V, Carbonara O, Gualdiero P, Petronella P, Ferraraccio F, Petrella A, Canonico R, Campitiello F, Della Corte A, Paolisso G, Canonico S. Dipeptidyl peptidase 4 inhibition may facilitate healing of chronic foot ulcers in patients with type 2 diabetes. *Exp Diabetes Res.* 2012;2012:892706. doi: 10.1155/2012/892706. Epub 2012 Nov 1. PMID: 23197976; PMCID: PMC3503302.
52. Nagae K, Uchi H, Morino-Koga S, Tanaka Y, Oda M, Furue M. Glucagon-like peptide-1 analogue liraglutide facilitates wound healing by activating PI3K/Akt pathway in keratinocytes. *Diabetes Res Clin Pract.* 2018 Dec;146:155-161. doi: 10.1016/j.diabres.2018.10.013. Epub 2018 Oct 25. PMID: 30367901. d Association. 2016;26(4):504-11.
53. Katsuhiko M, Hui Teoh S, Yamashiro H, Shinohara M, Fatchiyah F, Ohta T, Yamada T. Effects on Glycemic Control in Impaired Wound Healing in Spontaneously Diabetic Torii (SDT) Fatty Rats. *Med Arch.* 2018 Feb;72(1):4-8. doi: 10.5455/medarh.2018.72.4-8. PMID: 29416209; PMCID: PMC5789560.

9. Opinia Komisji Bioetycznej

UCHWAŁA NR 17/2014
z dnia 25 lutego 2014r.

II Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach w Warszawie, ul. Żwirki i Wigury 61,
02-091 Warszawa.

§1

Na podstawie art.30 ust 1 pkt 1 ustawy z dnia 21 stycznia 2005r. o doświadczeniach na zwierzętach (Dz.U.Nr 33, poz. 289) i §14 ust 3 rozporządzenia Ministra Nauki i Informatyzacji z dnia 29 lipca 2005r. w sprawie Krajowej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach oraz lokalnych komisji etycznych do spraw doświadczeń na zwierzętach (Dz. U. Nr 153, poz. 1275), po rozpatrzeniu wniosku pt.

„Wpływ zastosowania różnych modeli leczenia przeciwcukrzycowego na proces gojenia rany szczurów z cukrzycą indukowaną streptozotocyną.”.

z dnia 13. 02. 2014r. złożonego

przez: **Dr Beatę MROZIKIEWICZ-RAKOWSKĄ**
z : **Katedry i Kliniki Gastroenterologii i Chorób Przemiany Materii**
ul. Banacha 1a, 02-097 Warszawa

WYRAŻA ZGODĘ ODMAWIA WYRAŻENIA ZGODY

na przeprowadzenie doświadczeń na zwierzętach w zakresie wniosku.

§2

W wyniku rozpatrzenia wniosku, o którym mowa w §1, II Lokalna Komisja Etyczna ds. Doświadczeń na Zwierzętach ustaliła, że:

1. Wniosek należy zaliczyć do kategorii:

Badania naukowe na zwierzętach
Doświadczenia na zwierzętach w dydaktyce
Doświadczenia na tkankach, narządach odzwierzęcych

2. Najwyższy stopień inwazyjności proponowanych procedur i nie przekracza wartości⁴.....

3. Doświadczenia będą przeprowadzone na zwierzętach :(gatunek, liczba zwierząt)

Gatunek (liczba zwierząt) :

Szczury²⁰⁰.....

4. Doświadczenia będą przeprowadzone przez : (nazwisko i imię, nazwa jednostki doświadczalnej)

Imię i nazwisko wnioskodawcy:

Dr Beata MROZIKIEWICZ-RAKOWSKA

Nazwa jednostki doświadczalnej:

Katedry i Kliniki Gastroenterologii i Chorób Przemiany Materii
ul. Banacha 1a, 02-097 Warszawa

§3

Integralną częścią niniejszej uchwały stanowi uzasadnienie i kopia wniosku, o którym mowa w §1.

II LOKALNA KOMISJA ETYCZNA

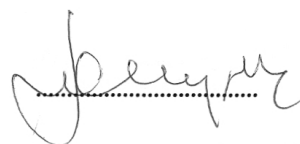
Ds. Doświadczeń na Zwierzętach
przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym
ul. Żwirki i Wigury 61, 02-091 Warszawa
tel. 022 5720-110, 5720-304, fax. 022 5720-169
pok. 304

Przewodnicząca II Lokalnej Komisji Etycznej

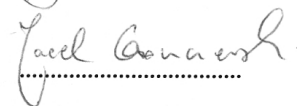
Dr hab. Ewa KUBLIK

Strona niezadowolona z niniejszej uchwały może wnieść odwołanie do Krajowej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach w terminie 14 dni od dnia otrzymania uchwały. Odwołanie składa się za pomocą lokalnych komisji etycznych do spraw doświadczeń na zwierzętach (Dz. U Nr 153 poz. 1275).

Maciej ONYSZKIEWICZ - Z-ca Przewodniczącego



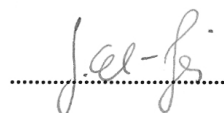
Dr Jacek GRONCZEWSKI - członek



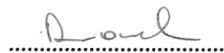
Dr hab. Robert STROSZNAJDER - członek

.....

Julita EL-JAI - członek



Artur DZWONEK - członek



Beata GRZEGRZÓŁKA - członek

.....

Dr hab. Mirosław SZUTOWSKI - członek



Janina DROZD - członek



UZASADNIENIE UCHWAŁY NR 17
z dnia 25 lutego 2014r.

II Lokalnej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach
w Warszawie, ul. Żwirki i Wigury 61, 02-091 Warszawa.

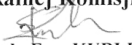
Po rozpatrzeniu wniosku pt.

„Wpływ zastosowania różnych modeli leczenia przeciwcukrzycowego na proces gojenia rany szczurów z cukrzycą indukowaną streptozotocyną.”.

z dnia 13. 02. 2014r. złożonego

przez: **Dr Beatę MROZIKIEWICZ-RAKOWSKĄ**
z : **Katedry i Kliniki Gastroenterologii i Chorób**
Przemiany Materii
ul. Banacha 1a, 02-097 Warszawa

W związku z uwzględnieniem w całości postulatów zawartych we wniosku nr 17/2014, na podstawie art. 107 par. 4 ustawy z dnia 14 czerwca 1960r. - Kodeks postępowania administracyjnego - z późniejszymi zmianami (U. Dz. z 2000 r. Nr 98, poz. 1071) odstąpiono od sporządzania uzasadnienia. Niniejsza uchwała wchodzi w życie z dniem wydania i jest ważna przez 24 miesiące do

Przewodniczący
II Lokalnej Komisji Etycznej

Dr hab. Ewa KUBLIK

Pieczęć II LKE

II LOKALNA KOMISJA ETYCZNA
Ds. Doświadczeń na Zwierzętach
przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym
ul. Żwirki i Wigury 61, 02-091 Warszawa
tel. 022 5720-110, 5720-304, fax. 022 5720-169
pok. 304

10. Oświadczenia współautorów

Warszawa, 06.10.2022
.....(miejsowość, data)

Dr hab. n. med. Beata Mrozikiewicz-Rakowska

(imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „The Problem of Wound Healing in Diabetes—From Molecular Pathways to the Design of an Animal Model” oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi:

*model molekularny, opracowanie koncepcji
pracy, pisanie manuskryptu*

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako *35* %.

Wkład Mateusza Mieczkowskiego w powstawanie publikacji określam jako *35* %, (imię i nazwisko kandydata do stopnia)

obejmował on: *koncepcję pracy, udział w badaniach, pisanie manuskryptu*

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji) *

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej lek. Mateusza Mieczkowskiego

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

Beata Mrozikiewicz-Rakowska
.....

(podpis oświadczającego)

*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników

Warszawa, 19.10.2022
.....(miejsowość, data)

Dr n. med. Michał Kowara

(imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „The Problem of Wound Healing in Diabetes—From Molecular Pathways to the Design of an Animal Model” oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi:

opracowanie koncepcji pracy oraz przygotowanie manuskryptu

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 13 %.

Wkład Mateusza Mieczkowskiego w powstawanie publikacji określam jako 35 %,

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

obejmował on: opracowanie koncepcji pracy, przygotowanie manuskryptu, selekcja materiału bibliograficznego

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji) *

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej lek. Mateusza Mieczkowskiego

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

2960451 | Dr n. med. Michał Kowara
lekarz specjalista
chorób wewnętrznych

(podpis oświadczającego)

*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników

Warszawa 17.03.22 (miejsowość, data)

Marcin Kleibert

(imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „*The Problem of Wound Healing in Diabetes—From Molecular Pathways to the Design of an Animal Model*” oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi:

.....
krytyczną korektę manuskryptu, przygotowanie
rysunów oraz akceptację ostatecznej wersji
pracy
.....

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 12 %.

Wkład Mateusza Mieczkowskiego w powstawanie publikacji określam jako 35 %.

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

obejmował on: koncepcję pracy, kwerendę
literatury, pisanie manuskryptu
.....

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji) *

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej lek.
Mateusza Mieczkowskiego

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)



(podpis oświadczającego)

*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników

Waniewa 6.10.22 (miejsowość, data)

Prof. dr hab. n. med. Leszek Czupryniak

(imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „The Problem of Wound Healing in Diabetes—From Molecular Pathways to the Design of an Animal Model” oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi:

opracowanie koncepcji i metodyki wykonania

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 5 %.

Wkład Mateusza Mieczkowskiego w powstawanie publikacji określam jako 35 %,

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

obejmował on: koncepcję pracy, metodykę wykonania
opracowanie manuskryptu

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji) *

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej lek. Mateusza Mieczkowskiego

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

prof. dr hab. med.
Leszek Czupryniak
specjalista chorób wewnętrznych
2176677

(podpis oświadczającego)

*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników

Warszawa 06.10.2022
.....(miejsowość, data)

Dr hab.n. med. Beata Mrozikiewicz-Rakowska

(imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „Insulin, but Not Metformin, Supports Wound Healing Process in Rats with Streptozotocin-Induced Diabetes” oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi:

metoda merytoryczna, opracowanie koncepcji pracy,
pisanie manuskryptu

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako..... 6 %.

Wkład Mateusza Mieczkowskiego w powstawanie publikacji określam jako..... 60 %,

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

obejmował on: koncepcji o pracy, udział o
badaniach, pisanie manuskryptu

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji) *

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej lek.
Mateusza Mieczkowskiego

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

Beata Mrozikiewicz-Rakowska

(podpis oświadczającego)

*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników

Wazna 17.10.22
.....(miejsowość, data)

Tomasz Siwko

(imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „Insulin, but Not Metformin, Supports Wound Healing Process in Rats with Streptozotocin-Induced Diabetes” oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi:

Opracowanie koncepcji pracy oraz przeprowadzenie badań

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 5 %.

Wkład Mateusza Mieczkowskiego w powstawanie publikacji określam jako 67 %,

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

obejmował on: opracowanie koncepcji pracy, przeprowadzenie badań, opracowanie wyników, przygotowanie manuskryptu

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji) *

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej lek.

Mateusza Mieczkowskiego

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

Tomasz Siwko

(podpis oświadczającego)

*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników

Warszawa, 6.10.2022 (miejsowość, data)

Prof. dr hab. n. med. Magdalena Bujalska-Zadrozny

(imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „Insulin, but Not Metformin, Supports Wound Healing Process in Rats with Streptozotocin-Induced Diabetes” oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi:

koncepty pracy, korekta manuskryptu, udział merytoryczny

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 5%.

Wkład Mateusza Mieczkowskiego w powstawanie publikacji określam jako 60%,

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

obejmował on: koncepty pracy, udział w przeprowadzonym badaniu, pisanie manuskryptu

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji) *

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej lek. Mateusza Mieczkowskiego

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

Chmjalne

(podpis oświadczającego)

*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników

Cum gratia, 6.10.22
.....(miejsowość, data)

mgr farm. Anna de Cordé-Skurska

(imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „Insulin, but Not Metformin, Supports Wound Healing Process in Rats with Streptozotocin-Induced Diabetes” oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi:

udział w przeprowadzeniu eksperymentów,
konceptje pracy

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 4 %.

Wkład Mateusza Mieczkowskiego w powstawanie publikacji określam jako 60 %,

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

obejmował on: udział w przeprowadzonym badaniu,
konceptje pracy, pisanie manuskryptu

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji) *

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej lek.

Mateusza Mieczkowskiego

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

Anna de Cordé-Skurska
.....
(podpis oświadczającego)

*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników

Warszawa, 06.10.2020.
.....(miejsowość, data)

dr n. farm. Renata Wolińska

(imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „Insulin, but Not Metformin, Supports Wound Healing Process in Rats with Streptozotocin-Induced Diabetes” oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi:

..... udział u przygotowaniu doświadczeń i opracowaniu wyników

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 4 %.

Wkład Mateusza Mieczkowskiego w powstawanie publikacji określam jako 60 %,

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

obejmował on: koncepcja pracy, udział u przeprowadzenia

..... badań, pisanie manuskryptu

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji) *

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej lek.

Mateusza Mieczkowskiego

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

..... Renata Wolińska

(podpis oświadczającego)

*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników

Wrocław 26/1/2023
.....(miejsowość, data)

Dr hab. n. med. Tomasz Grzela

(imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „Insulin, but Not Metformin, Supports Wound Healing Process in Rats with Streptozotocin-Induced Diabetes” oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi:

wykonanie i omówienie badań histologicznych
.....
.....

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 4 %.

Wkład Mateusza Mieczkowskiego w powstawanie publikacji określam jako 60 %,

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

obejmował on: koncepcja pracy, udział w badaniach
przygotowanie manuskryptu
.....

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji) *

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej lek. Mateusza Mieczkowskiego

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

dr hab. n. med. Tomasz Grzela
Specjalista chirurgii ogólnej
.....

(podpis oświadczającego)

*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników

Warszawa, 2022-10-06
.....(miejsowość, data)

Prof. dr hab. inż. Piotr Foltyński

(imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „Insulin, but Not Metformin, Supports Wound Healing Process in Rats with Streptozotocin-Induced Diabetes” oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi:

opracowanie koncepcji pomiaru pola powierzchni rany i analiza statystyczna wyników

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 4 %.

Wkład Mateusza Mieczkowskiego w powstawanie publikacji określam jako 60 %,

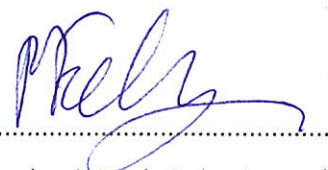
(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

obejmował on: koncepcja pracy, udział w badaniach i napisanie manuskryptu publikacji

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji) *

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej lek. Mateusza Mieczkowskiego

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)



(podpis oświadczającego)

*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników

Warszawa 14.10.2022
.....(miejsowość, data)

Dr n. med. Michał Kowara

(imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „Insulin, but Not Metformin, Supports Wound Healing Process in Rats with Streptozotocin-Induced Diabetes” oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi:

.....
opracowanie koncepcji pracy oraz przygotowanie manuskryptu
.....
.....

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 5 %.

Wkład Mateusza Mieczkowskiego w powstawanie publikacji określam jako 60 %,

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

obejmował on:
opracowanie koncepcji pracy, przeprowadzenie badań,
opracowanie wyników, przygotowanie manuskryptu
.....

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji) *

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej lek. Mateusza Mieczkowskiego

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

2960451 | Dr n. med. Michał Kowara
lekarz specjalista
.....chorób wewnętrznych.....

(podpis oświadczającego)

*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników

Warszawa 6.10.22 (miejsowość, data)

Prof. dr hab. n. med. Leszek Czupryniak

(imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „Insulin, but Not Metformin, Supports Wound Healing Process in Rats with Streptozotocin-Induced Diabetes” oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi:

nadszón metformyną

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określám jako 25 %.

Wkład Mateusza Mieczkowskiego w powstawanie publikacji określám jako 100 %,

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

obejmował on: konapję pracy, przygotowanie manuskryptu korekta literatury, udział w przeprowadzeniu badań

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji) *

Jednocześnie wyrażám zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej lek.

Mateusza Mieczkowskiego

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

prof. dr hab. med.
Leszek Czupryniak
specjalista chorób wewnętrznych
diabetologia

(podpis oświadczającego)

*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników

Stoniew 06. 10. 2022
.....(miejsowość, data)

Dr hab. n. med. Beata Mrozikiewicz-Rakowska

(imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „Nowy model ran przewlekłych w cukrzycy – badanie pilotażowe u szczurów rasy Wistar” oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi:

redakcja merytoryczna, opracowanie koncepcji
pracy, pisanie manuskryptu

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 33 %.

Mateusza Mieczkowskiego w powstawanie publikacji określam jako 32 %,

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

obejmował on: koncepcja pracy, redakcja i badanie
pisanie manuskryptu

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji)*

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej lek.
Mateusza Mieczkowskiego

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

Beata Mrozikiewicz-Rakowska

(podpis oświadczającego)

*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników

Wesoła 17.10.22 (miejsowość, data)

Tomasz Siwko

(imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „Nowy model ran przewlekłych w cukrzycy – badanie pilotażowe u szczurów rasy Wistar” oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi:

Opracowanie koncepcji pracy oraz przeprowadzenie badań

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 5 %.

Mateusza Mieczkowskiego w powstawanie publikacji określam jako 32 %,

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

obejmował on: Opracowanie koncepcji pracy, przeprowadzenie badań, opracowanie wyniku i przygotowanie manuskryptu

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji)*

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej lek.

Mateusza Mieczkowskiego

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

Tomasz Siwko

(podpis oświadczającego)

*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników

Warszawa, (miejsowość, data)
6.10.2022

Prof. dr hab. n. med. Magdalena Bujalska-Zadrozny

(imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „Nowy model ran przewlekłych w cukrzycy – badanie pilotażowe u szczurów rasy Wistar” oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi:

konceptja pracy, korekta manuskryptu, nadzór
merytoryczny

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 5 %.

Mateusza Mieczkowskiego w powstawanie publikacji określam jako 32 %,

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

obejmował on: konceptja pracy, udział w przeprowadzonym
badaniu, pisaniu manuskryptu

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji)*

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej lek.
Mateusza Mieczkowskiego

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

.....
C. Mieczkowski
(podpis oświadczającego)

*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników

Warszawa, 6.10.22
.....(miejsowość, data)

mgr farm. Anna de Cordé-Skurska

(imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „Nowy model ran przewlekłych w cukrzycy – badanie pilotażowe u szczurów rasy Wistar” oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi:

udział w przeprowadzeniu doświadczeń,
konceptje pracy
.....
.....

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 5 %.

Mateusza Mieczkowskiego w powstawanie publikacji określam jako 32 %,

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

obejmował on: udział w przeprowadzonym badaniu,
konceptje pracy, pisanie manuskryptu
.....

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji)*

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej lek.

Mateusza Mieczkowskiego

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

Anna de Cordé-Skurska
.....

(podpis oświadczającego)

*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników

Warszawa, 6/10/22
.....(miejsowość, data)

mgr farm. Kamila Kulik

(imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „Nowy model ran przewlekłych w cukrzycy – badanie pilotażowe u szczurów rasy Wistar” oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi:

..... udział w przeprowadzeniu doświadczeń,
..... koncepcje pracy
.....

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 25 %.

Mateusza Mieczkowskiego w powstawanie publikacji określam jako 38 %,

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

obejmował on: koncepcje pracy, udział w przeprowadzeniu
..... badania, pisanie manuskryptu
.....

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji)*

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej lek.

Mateusza Mieczkowskiego

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

..... Kamila Kulik (Druk)
.....

(podpis oświadczającego)

*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników

Warszawa 26/01/2022
.....(miejsowość, data)

Dr hab. n. med. Tomasz Grzela

(imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „Nowy model ran przewlekłych w cukrzycy – badanie pilotażowe u szczurów rasy Wistar” oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi:

wykonanie i analiza badań histopatologicznych
.....
.....

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 25 %.

Mateusza Mieczkowskiego w powstawanie publikacji określam jako 30 %,

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

obejmował on: koncepcja pracy, udział w badaniach
przygotowanie manuskryptu
.....
(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji)*

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej lek.

Mateusza Mieczkowskiego

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

dr hab. n. med. Tomasz Grzela
Specjalista chirurgii ogólnej
7802017

(podpis oświadczającego)

*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników

Wanna 29.03.2017 (miejsowość, data)

ppłk dr inż. Rafał Piotr Dulski

(imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „Nowy model ran przewlekłych w cukrzycy – badanie pilotażowe u szczurów rasy Wistar” oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi:

preparowanie badań termowizyjnych i analiza powstanych danych

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 2,5%.

Mateusza Mieczkowskiego w powstawanie publikacji określam jako 32%.

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

obejmował on: udział w przeprowadzonym badaniu
konsepja pracy, pisanie manuskryptu

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji)*

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej lek.

Mateusza Mieczkowskiego

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

Rafał Dulski

(podpis oświadczającego)

*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników