

Streszczenie

Wstęp

Przewlekła niewydolność żylna to problem społeczny w krajach rozwiniętych. Szacuje się, że w Wielkiej Brytanii leczenie samych owrzodzeń żylnych kosztuje około 400 - 600 mln funtów, a w USA ponad miliard rocznie. Z badań przeprowadzonych w krajach Europy Zachodniej wynika, że żylaki kończyn dolnych występują u 35% do 53% populacji: cierpi na nie 25% do 33% kobiet i 10% do 20% mężczyzn. Ostatnio opublikowane prace z dziedziny flebologii donoszą o możliwości zastosowania klejów tkankowych do leczenia niewydolności żylny. Kleje mimo bardzo obiecujących wyników klinicznych nie są pozbawione wad, np. mogą wywoływać reakcję zapalną lub bardzo szybko ulegają degradacji w wilgotnym środowisku biologicznym.

Cel rozprawy

Celem przeprowadzonych badań było opracowanie składu kleju, który ma służyć do zamykania niewydolnych naczyń układu żylnego lub wrodzonych anomalii naczyniowych (malformacje, tętniaki, torbiele) oraz do wypełniania martwych przestrzeni będących potencjalnym miejscem retencji płynu tkankowego oraz krwi.

Metodyka badawcza

- Zaprojektowanie kleju.
- Określenie parametrów wyjściowych zaprojektowanych próbek klejów.
- Badania wpływu sterylizacji na parametry fizykochemiczne oraz mechaniczne.
- Określenie zachowania kleju podczas procesu starzenia (test krótkoterminowy w roztworach SBF) i długoterminowy (roztwór Ringera i woda destylowana).
- Ocena działania cytotoksycznego: test bezpośredni, pośredni (badania przeprowadzono na linii komórkowej mysich fibroblastów L929).
- Właściwości zaprojektowanego kleju testowano na królikach albinosach. Powodzenie techniczne polegało na całkowitym zamknięciu żyły i wyłączeniu jej z krążenia. W planowanych terminach sekcji 14, 30, 90 dni od wykonania zabiegu pobrane zostały fragmenty ucha z zaaplikowanym klejem, sporządzono preparaty histologiczne badając odczyn tkankowy ze szczególnym uwzględnieniem śródbłonna żylnego, stopnia jego uszkodzenia, postępującej regeneracji oraz przebiegu resorpcji zastosowanych klejów, sporządzono również dokumentację zdjęć SEM po każdej sekcji.

Wyniki badań

Przeprowadzenie badań degradacji krótko- i długoterminowej wykazało, że zaprojektowany klej zachowuje się bardzo stabilnie w środowisku biologicznym - sztucznej krwi. Sterylizacja tlenkiem etylenu i w autoklawie UV stosowana w diagnostyce i leczeniu nie miała wpływu parametry przygotowanych mieszanek klejów.

Przeprowadzone badania *in vitro* zaprojektowanych klejów na linii komórkowej mysich fibroblastów L929 (zgodnie z normą PN-EN ISO 10993-5:2009) pokazały że zaprojektowane mieszanki klejowe nie są cytotoksyczne. W przypadku klejów R_4 i R_8 testowanych na zwierzętach żywotność hodowli wyniosła przy R_4 - 92,04%, przy R_8 żywotność hodowli 96,92%. Jedynym obserwowanym oddziaływaniem badanych klejów metodą pośrednią i bezpośrednią było lekkie zahamowanie wzrostu komórek dla lepiszcza, klejów R_3 i R_5.

W trakcie zabiegów na zwierzętach podany stopniowo do żyły brzeżnej ucha klej R_8 i R_4 jest w stanie całkowicie wypełnić światło żyły. Gojenie się rany w obrębie ucha następowało szybko, wzdłuż żyły pod skórą wyczuwalne były wałowate zgrubienia w postaci elastycznej masy tworzącej trwałe uszczelnienie. Nie odnotowano miejscowych reakcji zapalnych tkanki, nie stwierdzono obrzęku ucha, łuszczenia, silnego podrażnienia czy martwicy skóry. W otoczeniu miejsca implantowanego nie pojawiły się cechy alergizacji (rumień, pęcherzyki, grudki); brak świądu w otoczeniu implantowanego miejsca, miejscowych reakcji zapalnych tkanki, nie stwierdzono obrzęku, łuszczenia, silnego podrażnienia czy martwicy. Ocena histologiczna odczynu tkankowego - w planowanych terminach sekcji dały obraz mikroskopowy prawidłowej skóry, tkanki chrzęstnej oraz naczyń krwionośnych. W świetle naczyń widoczne liczne erytrocyty. Przedstawiony model doświadczalny może być wzorcem do dalszych badań podstawowych i przedklinicznych.

Uzyskane wyniki badań pozwoliły na sformułowanie następujących wniosków:

1. Przeprowadzenie badań degradacji krótko i długoterminowej wykazały że zaprojektowany klej zachowuje się bardzo stabilnie w środowisku biologicznym-sztucznej krwi, w roztworze Ringera oraz w roztworach SBF o różnym stężeniu. Samo działanie środowiska biologicznego nie wpływa na biostabilność spoiny klejowej.
2. Korelacje właściwości mechanicznych i termoanalitycznych z wynikami badań mikrostruktury kleju wykazały, że wprowadzone napełniacze zależą od rodzaju i ilości modyfikatora. Prowadzą do wzrostu twardości, ścieralności, wytrzymałości, dobrej przyczepności. Wpływają na stabilność termiczną kleju w funkcji czasu, zwiększenie odporności na starzenie.
3. Przeprowadzenie badań *in - vitro* zaprojektowanych klejów na linii komórkowej mysich fibroblastów L929 pokazało, że zaprojektowane mieszanki klejowe nie są cytotoksyczne.
4. Podczas zabiegu wszczepiania kleju- podany stopniowo klej R_8 i R_4 jest w stanie całkowicie wypełnić światło żyły, dopasowując się do jej kształtu: wnika w szczeliny dzięki swojej kapilarności. Wprowadzony do żyły inicjuje kompleksową reakcję pomiędzy składnikami krwi a powierzchnią kleju, a ulegając polimeryzacji w wilgotnym środowisku, pozostaje w żyły i nie zostaje usunięty przez krew tamując jednocześnie krwawienie z żyły.
5. Badania doświadczalne na modelu zwierzęcym wykazały że kleje R_4 i R_8 są biozgodne, przez co doskonale tolerowane przez żywy organizm.

Summary

Introduction

These days chronic venous insufficiency has been a serious social problem in the developed countries. It is estimated that annually in the UK the treatment of venous ulcers themselves cost approximately 400 - 600 million pounds and in the USA - more than 1 billion per year. It has been concluded on the grounds of the research studies conducted in the countries in Western Europe that varicose veins within lower limbs affect 35% up to 53% of the population (25% up to 33% women and 10% up to 20% men). The recent works published in the field of phlebology include reports on the applicability of tissue adhesives for the treatment of venous insufficiency. However, adhesives - in spite of their very promising clinical results - are not free of shortcomings, for example they can cause inflammatory responses or get degraded very quickly in wet biological environments.

Purpose of the paper

The developed adhesive is to close inefficient venous system vessels or congenital vascular anomalies (malformations, aneurysms, cysts) and to fill dead spaces being a potential place for retention of tissue fluid and blood.

Research methodology

- Designing adhesive mixtures.
- Specification of output parameters of the designed adhesive samples.
- Examination of sterilisation and its impact on physical-chemical and mechanical parameters.
- Specification of adhesive behaviour during the aging process (short-time test in SBF solutions and long term test - Ringer's solution and distilled water).
- Assessment of cyto-toxic effects: direct test, indirect test (tested on a cell line of mouse fibroblasts L929).
- The properties of the developed adhesive were tested on albino rabbits. When vein are completely closed and excluded from the circulation then it is considered to be the technical success. Within the planned dates of dissections - 14, 30, 90 days from the medical treatment the following were performed: ear parts with the applied adhesive were taken; histological specimen were prepared examining tissue reaction with a particular emphasis on venous endothelium, degree of its damage, progressive regeneration and course of resorption of the applied adhesives; also SEM photographic documentation was prepared after each dissection.

Research findings

The conduct of examinations on short- and long-term degradation showed that the developed adhesive reacts in a very stable manner at biological environments / artificial blood. Its sterilisation with ethylene oxide and at UV autoclaves applied in the diagnosis and treatment did not affect the parameters of the prepared adhesive mixtures. The conduct of *in-vitro* examinations of the developed adhesives at a cell line of mouse fibroblasts (according to PN-EN ISO 10993-5:2009) showed that the developed adhesive mixtures are not cyto-toxic. In case of adhesives tested at R_4 animals, their breeding viability was at 92.04%; at R_8 animals - at 96.92%. Slight inhibition of the cell growth for R_3 and R_5 binders was the only observed impact of the examined adhesives when directly and indirectly tested.

In the course of treatment on animals R8 and R4 adhesives gradually provided to marginal ear veins are able to completely fill them throughout their span. Wound healing within the ear took place quickly, a bulge in the form of elastic mass forming permanent sealing was felt under the skin along the vein. No local inflammatory tissue reactions were reported; there was no ear swelling, exfoliation, severe irritation or necrosis. Within the implanted place there were no characteristics of allergic sensitisation (erythema, blisters, lumps), no itching, no local inflammatory tissue reactions, no swelling, exfoliation, severe irritation or necrosis. The histological assessment of tissue reaction - within the planned dates of dissections - gave a microscope presentation of normal skin, cartilage and blood vessels. Numerous erythrocytes can be seen within vessels throughout their span. The presented experimental model can be a pattern for further basic and preclinical research studies.

The obtained research study results allowed to draw the following conclusions:

1. The operation of the biological environment does not affect the bio-stability of the adhesive. The examined adhesive is permanent and behaves in a very stable manner in the environment of physiological fluids, its resulting aqueous extracts were colourless, clear and odourless
2. The correlations of mechanical and thermo-analytical properties with the results of micro-structural studies on the adhesive showed that the provided fillers depend on a the type and amount of a given modifier. They lead to an increase in hardness, strength, good adhesion and they affect the thermal stability of the adhesive in the course of time.
3. *In - vitro* tests of the developed adhesives were performed. At a cell line of mouse fibroblasts L929 it was demonstrated that the developed adhesive mixtures are not cyto-toxic.
4. Treatment of adhesive implantation. The gradually-provided R_8 and R_4 adhesives are able to completely fill in the vein span, fitting to its the shape and penetrating gaps thanks to its capillarity. When entered into the vein it initiates comprehensive reactions between blood components and the adhesive surface, undergoing polymerisation at humid environments, it stays in the vein and is not removed by blood while hampering blood bleeding from the vein.
5. The experimental research studies on animal models demonstrated that R_4 and R_8 adhesives are bio-compatible and thus perfectly tolerated by living organisms.