

**Streszczenie rozprawy doktorskiej lek. Sebastiana Borysa pt. „*Evaluation of molecular mechanisms of action of negative pressure wound therapy in the treatment of neuropathic ulcers in diabetic foot syndrome*”**

**(„*Ocena mechanizmów molekularnych działania terapii podciśnieniowej w leczeniu owrzodzeń neuropatycznych w zespole stopy cukrzycowej*”)**

Pacjenci z cukrzycą mają krótszy oczekiwany czas przeżycia, co wynika głównie z przewlekłych powikłań tej choroby, w tym zespołu stopy cukrzycowej (Diabetic Foot Syndrome - DFS). Owrzodzenie stopy cukrzycowej (Diabetic foot ulceration - DFU) jest najczęściej diagnozowanym wariantem DFS. Standardowa terapia DFU, obejmująca kontrolę glikemii, odciążenie dotkniętej kończyny, opracowanie rany, rewaskularyzację czy systemową antybiotykoterapię, u wielu pacjentów jest niewystarczająca i chorzy doświadczają przedłużonego okresu gojenia oraz wysokiej nawrotowości DFU. W związku z powyższym istnieje realna potrzeba badań i wprowadzania nowych terapii, które poprawiłyby rokowanie u chorych z DFU. Terapia podciśnieniowa ran (Negative pressure wound therapy - NPWT) jest jedną z najczęściej stosowanych dodatkowych terapii w DFU. NPWT skutkuje zwiększonym miejscowym przepływem krwi i regeneracją tkanek oraz zmniejszeniem liczby bakterii. Pomimo badań mechanizmy molekularne związane z działaniem NPWT u chorych z DFU nie są jednak wystarczająco poznane. Przeprowadzona w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej prospektywna obserwacja oceniała skuteczność krótkotrwałego zastosowania NPWT oraz odległych punktów końcowych u pacjentów z neuropatycznym, niezakażonym owrzodzeniem stopy cukrzycowej w T2DM. Weryfikowano również hipotezę naukową, że NPWT działa przez mechanizmy molekularne związane z regulacją ekspresji genów w tym metylacją DNA w obrębie dna rany.

#### CELE

Celem ogólnym rozprawy doktorskiej było badanie wybranych aspektów klinicznego zastosowania i mechanizmów molekularnych działania NPWT.

Cele szczegółowe obejmowały:

1. Ocenę w prospektywnym badaniu obserwacyjnym krótkoterminowej skuteczności zastosowania NPWT oraz odległych punktów końcowych u pacjentów z neuropatycznym, niezakażonym DFU w T2DM.
2. Badanie wpływu NPWT na miejscową ekspresję genów w ranie u pacjentów z T2DM i neuropatycznym, niezakażonym DFU .
3. Badanie wpływu NPWT na miejscowy profil miejscowy metylacji DNA w ranie u pacjentów z T2DM i neuropatycznym, niezakażonym DFU.

## METODYKA I WYNIKI BADAŃ

1. Artykuł oryginalny: *Borys S et al.: Negative-pressure wound therapy for management of chronic neuropathic noninfected diabetic foot ulcerations - short-term efficacy and long-term outcomes. Endocrine. 2018 62:611-616.*

Do prospektywnej, nierandomizowanej, obserwacji klinicznej włączono 75 pacjentów z neuropatycznym, niezakażonym DFU leczonych w Gabinecie Stopy Cukrzycowej Oddziału Klinicznego Chorób Metabolicznych SU w Krakowie. Pacjenci zostali przypisani do NPWT (n=53) lub też terapii standardowej (n=22) na podstawie zaleceń klinicznych i rutynowej praktyki klinicznej na świecie oraz w ośrodku macierzystym. Podstawowymi przeciwwskazaniami do włączenia do badania było klinicznie istotne niedokrwienie lub też zakażenie w obrębie stopy. Grupa porównawcza rekrutowana była spośród pacjentów z T2DM cechujących się współistniejącymi niezakażonymi klinicznie DFU o wielkości  $< 1\text{cm}^2$ , lub niezakwalifikowanych do NPWT z powodu trudnościami technicznymi z aplikacją efektywnej NPWT. Jako wczesny efekt terapii oceniano zmniejszenie powierzchni rany po  $8\pm 1$  dniach od wejścia do badania. W długoterminowej obserwacji, w trakcie której prowadzono rutynowo standardowe leczenie, monitorowano całkowite zamknięcie DFU oraz odsetek nawrotów.

Pacjenci leczeni za pomocą NPWT charakteryzowali się wyjściowo większą powierzchnią rany ( $15.7$  vs.  $2.9\text{ cm}^2$   $p=0,0000$ ). Redukcję powierzchni DFU zaobserwowano w obu grupach - NPWT ( $-1,1\text{ cm}^2$ ,  $-10,2\%$ ,  $p=0,0001$ ) i grupie porównawczej ( $-0,3\text{ cm}^2$ ,  $-18,0\%$ ,  $p=0,0038$ ). W okresie jednego roku od momentu wejścia do badania  $55.1\%$  DFUs uległo całkowitemu zamknięciu w grupie NPWT oraz a w grupie porównawczej  $73.7\%$  ( $p=0,15$ ). W analizie regresji wieloczynnikowej, czas utrzymywania się rany przed wejściem do badania oraz mniejsza

powierzchnia DFU, choć nie sposób leczenia, były związane z zamknięciem rany. W trakcie roku prowadzonej otwartej obserwacji okazało się, że po zamknięciu DFU nawroty nastąpiły u około 30.0% w obu grupach ( $p=0.88$ ).

2. Artykuł oryginalny: *Borys S et al. Negative pressure wound therapy in the treatment of diabetic foot ulcers may be mediated through differential gene expression. Acta Diabetol 2019 56:115-120.*

W badaniu wzięło udział 36 pacjentów z T2DM i neuropatycznym, niezakażonym DFU w przebiegu DFS, 25 leczonych metodą NPWT oraz 11 leczonych jedynie terapią standardową (grupa kontrolna). Próbki tkanki pobrano z łoży rany na początku eksperymentu i po  $8\pm 1$  dniach leczenia. Oznaczenie ekspresji genów przeprowadzono przy pomocy macierzy ekspresyjnych firmy Illumina. Analiza ekspresji różnicowej została przeprowadzona z użyciem pakietu 'limma' w programie R.

Do analizy końcowej zakwalifikowano materiał od 21 pacjentów z T2DM leczonych z użyciem NPWT i 8 pacjentów na terapii standardowej. Grupy nie różniły się istotnie pod względem cech klinicznych. Po zakończeniu terapii, ale nie na jej początku, stwierdzono różnicę w ekspresji 4 genów: *GFRA2* (GDNF family receptor alpha-2;  $\log_{FC}=-0,38$ ), *C1QB* (Complement C1q Binding Protein;  $\log_{FC}= 0,62$ ), *Rab35* (member of RAS oncogene family;  $\log_{FC}=-0,30$ ) i *SYNJI* (Synaptojanin 1;  $\log_{FC}=-0.50$ ). Ekspresja *C1QB* była wyższa w grupie pacjentów leczonych z użyciem NPWT, zaś pozostałe zidentyfikowane geny miały w tej grupie niższą ekspresję. Wszystkie zidentyfikowane geny mogą mieć związek z procesem gojenia rany poprzez wpływ na re-epitelializację i angiogenezę, regulację przeżycia i różnicowania neuronów (*GFRA2*) wpływ na migrację komórek (*SYNJI*), apoptozę i stan zapalny (*C1QB*) czy regulację mechanizmów adhezji komórek (*Rab35*). Na podstawie analizy ko-ekspresji, przy użyciu publicznie dostępnych baz danych sekwencjonowania RNA (The Genotype Tissue Expression Project data - [www.gtexportal.org](http://www.gtexportal.org)), oceniano molekularne funkcjonowanie *GFRA2* i *C1QBP*. Analiza ta dostarczyła dodatkowych argumentów na rolę obu genów w procesach gojenia.

3. Artykuł oryginalny: *Ludwig-Slomeczyńska A, Borys S, et al.: DNA methylation analysis of negative pressure therapy effect in diabetic foot ulcers. Resubmitowano po recenzji do Endocrine Connections.*

Do badania włączono 36 pacjentów z DMt2 - 23 do NPWT i 13 do postępowania standardowego. Przydział do NPWT nie miał charakteru losowego i był oparty na zaleceniach

klinicznych oraz na powierzchni rany. Próbki tkanek zostały pobrane z dna rany na początku badania i  $8\pm 1$  dni po inicjacji terapii/pierwszej wizycie. Profil metylacji DNA badano za pomocą macierzy metylacyjnych (zestaw Illumina Methylation EPIC kit). Obie grupy nie różniły się w zakresie podstawowego profilu klinicznego, natomiast pacjenci poddani NPWT charakteryzowali się większą powierzchnią DFU, co było zgodne z kryteriami przydziału do grup; 16,8 vs. 1,4 cm<sup>2</sup> ( $p=0,0003$ ). W analizie wyjściowej dotyczącej dnia włączenia do badania tylko jeden region na chromosomie 5 kodujący podrodzinę gamma protocadheriny (*PCDHGA4*) był metylowany w znamienne różnym stopniu w badanych grupach. Po ukończeniu terapii stwierdzono różnicę w metylacji 57 genów, zlokalizowanych głównie na chromosomach: 6 (chr6p21) oraz 20 (chr20p13); Geny te kodują białka związane z procesami naprawczymi DNA i sygnalizacją autokrynną przez receptor kwasu retinowego. Analiza “per arm”, w której porównywano próbki przed i po terapii, w grupie NPWT wykazała istnienie aż 426 regionów zmetylowanych w różnym stopniu, podczas gdy w grupie terapii standardowej takich różnic nie znaleziono. Analiza ścieżek sygnalizacyjnych umożliwiła znalezienie 11 statystycznie znamienne regulowanych procesów, spośród których 4 związane były z aktywacją układu dopełniacza. Poza genem *CLU* (hipometylowany - wzrost ekspresji), będącym inhibitorem układu dopełniacza, wszystkie analizowane geny były hipermetylowane (spadek ekspresji).

## WNIOSKI

1. NPWT jest postępowaniem bezpiecznym w neuropatycznych, nieischemicznych i niezakażonych DFUs u pacjentów z T2DM.
2. Przeprowadzona obserwacja kliniczna nie wykazała bezpośrednich dowodów na większą efektywność NPWT w stosunku do terapii standardowej. Biorąc jednak pod uwagę wykazaną porównywalną efektywność NPWT w stosunku do postępowania standardowego przy bardziej obciążającej charakterystyce ran (znacząco większa powierzchnia DFU w kohorcie na terapii podciśnieniowej), NPWT wydaje się charakteryzować lepszą skutecznością.
3. Neuropatyczne, nieischemiczne, niezakażone DFUs w T2DM cechował wysoki odsetek wygojenia ran, ale także nawrotów w okresie obserwacji. W przypadku tego drugiego punktu końcowego odsetek ten był niezależny od powierzchni DFU.
4. Efekt terapeutyczny NPWT w DFU może wynikać z wpływu na lokalną ekspresję genów kodujących białka biorące udział w procesie gojenia rany.

5. Efekt działania terapeutycznego NPWT może być związany z jego oddziaływaniem na procesy epigenetyczne, w szczególności te związane z procesem hamowania aktywacji układu dopełniacza.

6. Opisane odkrycia mogą mieć potencjalne znaczenie kliniczne, w tym także przez wpływ na rozwój nowych terapii stosowanych w leczeniu DFUs. Prezentowane wyniki wymagają jednak dalszego potwierdzenia i interpretacji funkcjonalnej.

## **ABSTRACT**

The number of people living with diabetes in the world has probably already exceeded 400 million. Life expectancy in people with DM is shorter compared to the general population. This is mainly attributable to its chronic complications including DFS. DFS is frequently occurring together with ulceration (DFU). The standard therapy of DFU should include glycemic control, off-loading of the affected foot, surgical debridement of the injury bed, revascularization procedures, systemic administration of antibiotics; nevertheless, in some patients, these conventional procedures are not effective, resulting in prolonged healing of DFU. Among adjuvant methods that appear to accelerate wound healing NPWT seems to be particularly effective in DFU. Proposed mechanisms of NPWT action include reduction of the edema, local blood flow improvement, granulation and angiogenesis induction, epithelialization of the wound borders, and facilitation of cell migration and proliferation. Its mechanism of action, however, is not fully understood and there is still a need for real world observational data concerning NPWT. The research conducted as part of this doctoral dissertation focused on short-term efficacy and long-term outcomes of NPWT for management of chronic neuropathic noninfected DFUs and its mechanism of action on the molecular level such as gene expression and methylation in the wound bed.

### **OBJECTIVE:**

The general objective of this doctoral thesis was examination of selected aspects of clinical use and molecular mechanisms of action of NPWT.

### **SPECIFIC AIMS:**

1. The assessment of the short-term efficacy, safety, and long-term outcomes of NPWT in patients with T2DM and neuropathic, noninfected DFUs in prospective observational study.
2. The examination of the effect of NPWT on gene expression in patients with T2DM and neuropathic, noninfected DFU.
3. The assessment of the effect of NPWT on the profile of gene methylation in patients with T2DM and neuropathic, noninfected DFU.

#### METHODS AND RESULTS:

1. Original research article: *Borys S et al.: Negative-pressure wound therapy for management of chronic neuropathic noninfected diabetic foot ulcerations - short-term efficacy and long-term outcomes.* Endocrine. 2018 Dec;62(3):611-616.

Based on wound characteristics, mainly area ( $>1$  vs.  $\leq 1$  cm<sup>2</sup>), 75 patients with DFUs treated in an outpatient clinic were assigned to NPWT (n=53) or standard therapy (n=22). Wound area reduction was evaluated after  $8 \pm 1$  days. Long-term outcomes assessed included complete ulceration closure and recurrence rate. Patients assigned to NPWT were characterized by greater wound area (15.7 vs. 2.9 cm<sup>2</sup> p=0.0000). Reduction in wound area was found in both the NPWT (-1.1 cm<sup>2</sup>, -10.2%, p = 0.0001) and comparator group (-0.3 cm<sup>2</sup>, -18.0%, p = 0.0038). No serious adverse events related to NPWT were noted. Within 1 year, 55.1% (27/49) of DFUs were closed in the NPWT group and 73.7% (14/19) in the comparator group (p = 0.15). In the logistic regression, wound duration and smaller initial area, but not treatment mode, were associated with closure. One-year follow-up after DFU resolution revealed an ~30.0% recurrence rate in both groups (p = 0.88). NPWT is a safe treatment for neuropathic, nonischemic, and noninfected DFU in patients with T2DM, although this observational study did not prove its effectiveness over standard therapy. Additionally, we report a high rate of both closure and recurrence of ulcers, the latter irrespective of initial ulcer area.

2. Original research article: *Borys S et al. Negative pressure wound therapy in the treatment of diabetic foot ulcers may be mediated through differential gene expression.* Acta Diabetol. 2019 Jan;56(1):115-120.

We included two cohorts of patients—individuals treated with either NPWT or standard therapy. The assignment to NPWT was non-randomized and based on wound characteristics. Differential gene expression profiling was performed using Illumina gene expression arrays and R Bioconductor pipelines based on the ‘limma’ package. The final cohort encompassed 21 patients treated with NPWT and 8 with standard therapy. The groups were similar in terms of clinical characteristic. We identified four genes differentially expressed between the two study arms post-treatment, but not pre-treatment: *GFRA2* (GDNF family receptor alpha-2), *C1QBP* (complement C1q binding protein), *Rab35* (member of RAS oncogene family) and *SYNJI* (Synaptotagmin 1). Interestingly, all four genes seemed to be functionally involved in wound healing by influencing re-epithelialization and angiogenesis, regulation of neurons differentiation (*GFRA2*), cells migration (*SYNJI*), apoptosis and inflammatory process (*C1QBP*) as well as regulation of cell adhesion (*Rab35*). Subsequently, we utilized co-expression analysis in publicly available RNA-seq data to reveal the molecular functions of *GFRA2* and *C1QBP*, this analysis provided additional argument of the role of these genes in wound healing. .

3. Original research article resubmitted to Endocrine Connections. *Ludwig-Slomczyńska A, Borys S, et al.: DNA methylation analysis of negative pressure therapy effect in diabetic foot ulcers*

Of 36 included patients, 23 were assigned to NPWT and 13 to standard therapy. The assignment was non-randomized and based on wound characteristics. Tissue samples were obtained before and  $8 \pm 1$  day after therapy initiation. DNA methylation patterns were checked by Illumina Methylation EPIC kit. Groups were similar in clinical characteristics. The NPWT group had greater wound area: 16.8 vs. 1.4 cm<sup>2</sup> (p=0.0003). Initially only one region at chromosome 5 was differentially methylated. After treatment, 57 differentially methylated genes were found, mainly located on chromosomes 6 (chr6p21) and 20 (chr20p13); they were associated with DNA repair and autocrine signaling via retinoic acid receptor. We performed differential analyses pre-treatment and post-treatment. The analysis revealed 426 differentially methylated regions in the NPWT group, but none in the control group. The enrichment analysis showed 11 processes significantly associated with NPWT, of which 4 were linked with complement system activation. All but one (*CLU* the complement system’s inhibitor) were hypermethylated after NPWT. The NPWT effect on DFUs may be mediated through epigenetic changes resulting in inhibition of complement system activation.

## CONCLUSIONS:

1. NPWT is a safe treatment for neuropathic, nonischemic, and noninfected DFU in patients with T2DM.
2. This observational study did not prove NPWT effectiveness over standard therapy. However, as the effectiveness of NPWT in both groups was similar, due the unfavorable, greater DFU area in NPWT group one may hypothesize that NPWT is more effective.
3. One-year follow-up revealed an DFU recurrence rate of over 30%. Interestingly, the rate of ulcer recurrence was almost the same in both groups, in spite of a large difference in the magnitude of their initial area.
4. The effect of NPWT in DFS may be mediated through differential gene expression of proteins involved in the wound healing process.
5. The NPWT effect on DFUs may be mediated through epigenetic alterations, resulting mainly in inhibition of the complement system activation.
6. These findings hold potential clinical implications and may be of value in guiding the development of new therapies for DFUs. However, it requires further confirmation in subsequent studies.