

# Affrumað roð: eðliseiginleikar sem styðja vefjaviðgerð

Skúli Magnússon<sup>1</sup> líffræðingur, Baldur Tumi Baldursson<sup>1,2</sup> læknir, Hilmar Kjartansson<sup>1,2</sup> læknir, Guðný Ella Thorlacius<sup>3</sup> ónæmisfræðingur, Ívar Axelsson<sup>1</sup> frumlíffræðingur, Óttar Rolfsson<sup>4</sup> lífefnafræðingur, Pétur Henry Petersen<sup>3</sup> líffræðingur, Guðmundur Fertram Sigurjónsson<sup>1</sup> efna- og verkfræðingur

## ÁGRIP

**Inngangur:** Affrumað roð Atlantshafsporsks (*Gadus morhua*) hefur verið notað undanfarin ár til meðhöndlunar á þrálátum sárum. Tíðni sykursýki hefur aukist mikið í heiminum en ein af afleiðingum hennar eru þrálát sár. Markmið rannsóknanna var að kanna vefjasamrýmanleika og eiginleika sem skipta máli fyrir nýtingu roðsins til viðgerðar á líkamsvef.

**Efniviður og aðferðir:** Bygging affrumaðs roðs var metin með smásjárskoðun. Mat á vefjasamrýmanleika græðlingsins var framkvæmt af vottaðri sérhæfðri rannsóknarstofu. Próteinhluti efnisins var kannaður með próteinrafrætti. Seyting frumuboðanna interleukín-10 (IL-10) og IL-12p40, IL-6 og TNF- $\alpha$  frá einkjörnungum (*monocytes*) eða stórátrfrumum (*macrophages*) í uppleystum próteinhluta efnisins var mældur með Elísu-prófi. Áhrif roðsins á nýmyndun æða *in vivo* var metin með æða- og þvagbelgshimnulíkani í hænufostrum.

**Niðurstöður:** Smásjármyndir sýna að bygging affrumaðs roðs er holótt.

Efnið stóðst öll vefjasamrýmanleikapróf. Við rafrátt próteinsýnis komu í ljós prótein á stærðarbilinu 115-130 kDa sem er einkennandi fyrir bandvef. Roðið reyndist ekki hafa marktæk áhrif á seytingu IL-10, IL-12p40, IL-6 eða TNF- $\alpha$  frá einkjörnungum eða stórátrfrumum. Græðlingurinn hefur marktæk örvandi áhrif á æðamyndun í æða- og þvagbelgshimnulíkani.

**Ályktun:** Niðurstöðurnar sýna að affrumað roð er skaðlaust og veldur ekki bólgusvari. Græðlingurinn inniheldur meðal annars bandvef líkt og mannhúð. Affrumað roð hefur marktæk örvandi áhrif á æðamyndun og smásjármyndir af byggingu roðsins sýna að hún sé vel til þess fallin að styðja innvöxt frumna. Samanburðarrannsókn sem hefur verið birt, tvíblind og slembiröðuð, sýndi að sár meðhöndluð með affrumuðu roði greru hraðar en sár meðhöndluð með stoðefni úr svínaþvef. Líklegt er að ástæða þessa bætta sárgróanda sé meðal annars vegna eiginleika roðsins sem hér er lýst.

## Inngangur

<sup>1</sup>Kerecis ehf.,  
<sup>2</sup>Landspítala,  
<sup>3</sup>læknadeild,  
<sup>4</sup>kerfislíffræðisætri  
Háskóla Íslands.

Árið 2014 gaf Matvæla- og lyfjastofnun Bandaríkjanna (Food and Drug Administration, FDA) íslenska nýsköpunarfyrirtækinu Kerecis markaðsleyfi til sölu á affrumuðu þorskroði ætluðu til meðhöndlunar á sárum. Markaðsleyfi á Evrópska efnahagssvæðinu fylgdi í kjölfarið, veitt af þar til bærrí samevrópskri stofnun. Í ársbyrjun 2015 gaf sjúkrasamlag bandaríska heilbrigðisráðuneytisins út sérstakan endurgreiðslulykil fyrir vöruna sem settur er í gagnagrunn sjúkrasamlaga þar vestra.<sup>1</sup> Veiting áður nefndra viðurkenninga er háð ströngum kröfum um öryggi og gagnsemi í klínískri notkun.

Græðlingurinn er markaðssettur undir vörumerkinu Kerecis Omega3 Wound. Um er að ræða affrumaðan fjargræðling en íslensku heitin sem hafa verið notuð fyrir mismunandi tegundir græðlinga eru:

- i. samgræðlingur (*autograft*, vefur fluttur á milli staða á sama einstaklingi),
- ii. mótagræðlingur (*allograft*, vefur fluttur milli einstaklinga) og
- iii. fjargræðlingur (*xenograft*, vefur fluttur frá dýri).

Forsendur markaðsleyfa eftirlitsaðila eru ýtarlegar prófanir til að staðfesta virkni og öryggi vörunnar. Framleiðsla þarf jafnframt að uppfylla staðla um góða framleiðsluhætti. Rannsóknir sem liggja að baki ofangreindum markaðsleyfum eru töluverðar og er ætlunin að gera grein fyrir nokkrum þeirra í þessari grein – og jafnframt að seðja fróðleiksþorsta vísindasamfélagsins um hvað felst í ofangreindum áföngum. Í ljósi

umfangsmikillar rannsóknaráætlunar sem stendur yfir til að staðfesta enn frekar virkni tækninnar, er einnig mikilvægt að greiður aðgangur sé að þeim gögnum sem til eru.

Kerecis Omega3 hefur verið í notkun síðan 2010, fyrst til rannsókna og síðan til meðhöndlunar á þrálátum sárum. Tvíblind, slembiröðuð samanburðarrannsókn á 162 sárum sýndi að sár meðhöndluð með affrumuðu fiskiroði gróa fyrr en sár meðhöndluð með sambærilegum vörum úr svínaþörpum.<sup>2</sup> Meginmunurinn á vörunum tveimur er fituinnihaldið.<sup>3</sup> Talsverð hætta er á smiti milli spendýra og eru spendýra-fjargræðingar því meðhöndlaðir með sterkum sápunum til að fjarlægja sem mest af efnum sem gætu borið veirur. Eftir slíka vinnslu stendur því eftir bandvefurinn einn.<sup>4</sup> Þar sem ekki er talin hætta á sjúkdómasmiti milli fiska og manna er sápun miklu minni á þorskroði Kerecis og inniheldur hið affrumaða þorskroð því ekki einungis bandvef heldur einnig fitur, þar með talið fjölómattaðar fitusýrur en handrit með þessum niðurstöðum er í bígri. Fituinnihaldið er ein af ástæðunum fyrir því að farið var að nota roðið sem sáravöru. Omega-3 fitusýrur hafa verið tengdar við bólguminnkandi áhrif<sup>5</sup> og einnig hamlandi áhrif á bæði bakteríur<sup>6</sup> og veirur.<sup>7</sup>

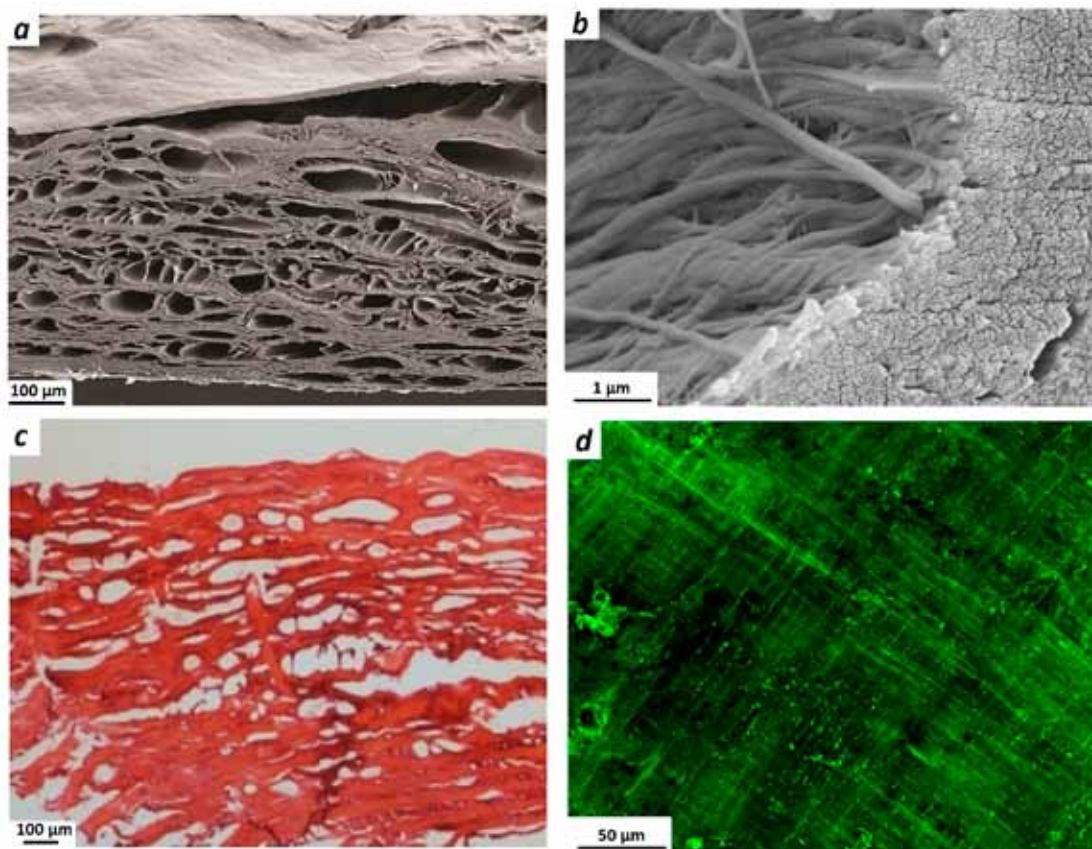
Þrálát eru þau sár sem gróa ekki þrátt fyrir að orsök þeirra hafi verið leiðrétt. Dæmi um slíkt er þegar slagæðaflæði er lagað hjá sjúklingi með æðasjúkdóm eða truflun á blóðsýkri leiðrétt hjá sykursýkisjúklingi.<sup>8</sup> Þörf er á nýjum aðferðum til meðferðar á þrálátum sárum og því mikill áhugi á að þróa ný meðferðarúræði. Ástæð-

Fyrirspurnir:  
Baldur Tumi Baldursson  
btb@kerecis.com

Greinin barst  
9. apríl 2015,  
samþykkt til birtingar  
19. nóvember 2015.

Höfundar hafa gert grein fyrir hagsmunatengslum sínum við Kerecis.

**Mynd 1 (a-b).** Rafeindasmásjarmyndir af þverskurði affrumaðs roðs. (a) Í roðinu sjást rásir og göt en það er þéttara á jaðrinum. Kvarðastika er 100  $\mu\text{m}$ . (b) Þræðir í roðinu eru bersýnilegir við meiri stækkun. Kvarðastika er einn  $\mu\text{m}$ . (c) Ljóssmásjarmynd af þverskurði affrumaðs roðs eftir vefjalitun. Roðið er holótt að innan. Kvarðastika er 100  $\mu\text{m}$ . (d) Mynd af yfirborðsfleti roðsins tekin með confocal-smásjá. Sjálfvirk flúrljómun var nýtt til að fá mynd af byggingu roðsins. Kjarnalitun var neikvæð. Bygging hins affrumaða roðs samanstendur af lögum af þráðum sem snúa þvert hverjir á öðra. Kvarðastika er 50  $\mu\text{m}$ .



an er, auk hækkaðs dánaraldurs, að algengi sykursýki í heiminum hefur aukist gríðarlega og er oft talað um faraldur í því sambandi.<sup>9</sup> Þrálát sár eru algengur fylgikvilli sykursýki, fjölmennustu aldurs hóparnir eru ekki ennþá orðnir gamlir svo búist er við að slíkum fylgikvillum fjölgi. Þannig fá um 15% allra sykursýkisjúklinga einhvern tíma fótasár, en þau eru algengasta orsök aflimunar fóta.<sup>10</sup> Eftirspurn eftir meðhöndlunaraðferðum á þrálátum sárum hefur því aukist mikið<sup>11</sup> og stöðefni úr roði er ætlað að mæta þeirri eftirspurn. Hingað til hafa öll stöðefni af þessu tagi verið gerð úr spendýravef.<sup>12</sup> Þau eru meðal annars notuð til að meðhöndla sár, til viðgerða á kviðarholtsvegg, uppbyggingar á brjóstum eftir brjóstnám og til viðgerða á heilabasti.<sup>13</sup> Prófanir á affrumuðu roði til meðhöndlunar á heilabasti í kindum hafa gefið góða raun.<sup>14</sup>

Framleiðsla affrumaða roðsins felst í því að fjarlægja varlega með söltum allar frumur roðsins þannig að sem minnst sé hreyft við náttúrulegri byggingu roðsins og efnasamsetningu. Roðið fer í gegnum staðlað framleiðsluferli sem felst í affrumun, frostþurrkun og dauðhreinun, annaðhvort með etýlenoxíði eða gammageislun. Einkum er lögð áhersla á að halda fitusýrum roðsins eftir en talið er að virkni þeirra skapi sérstöðu vörunnar og bættan sárgróanda. Affrumaða roðið er um það bil einn millimetri að þykkt og bygging þess ekki eins og ólík mannhúð og ætla mætti.<sup>15</sup> Roðið samanstendur af þremur lögum eins og húð manna; yst er yfirhúð, þar fyrir neðan leðurhúð og síðan húðbeður. Leður- og húðbeðslag roðs er bandvefur sem er sterkur og jafnframt teygjanlegur.<sup>16</sup> Meginmunurinn á byggingu roðs og mannhúðar er að hornlag (keratínlag) er varla til staðar í yfirhúðarlagi roðsins og í roðinu er hreistur í stað hára<sup>17</sup> sem er fjarlægt við framleiðslu roðsins.

Eðlilegt ferli sárgróanda skiptist í fjögur stig sem skarast: storkufasa, bólguþasa, vaxtarfasa með myndun holdfyllingar og að lokum umbyggingu og myndun örvefs. Í þrálátum sárum er bólguþasinn viðvarandi. Borið saman við eðlileg sár einkennast þrálát sár af eyðingu millifrumuefnis, færri frumuskíptingum, færri vaxtarþáttum og mikilli próteinasavirkni.<sup>18</sup> Aukið ískrið bólgufrumna í þrálátum sárum leiðir til meiri styrks próteinasu sem brjóta niður millifrumuefni, vaxtarþætti, prótein og viðtaka, og koma þar með í veg fyrir eðlilegan sárgróanda.<sup>19</sup> Þegar stöðefnum úr bandvef er komið fyrir í þrálátum sárum er almennt talið að stöðefnin stuðli að endurmyndun vefja með því að tempra próteinasavirkni og styðja við vefjauppbyggingu.<sup>20</sup>

Markmið rannsóknanna var að kanna vefjasamrýmanleika affrumaðs þorskróðs og eiginleika sem skipta máli fyrir nýtingu þess til viðgerðar á líkamsvef.

### Efniviður og aðferðir

#### Duftun

Affrumuðu roði (Keracis™ Omega3 Wound, Keracis ehf, Ísafirði) var dýft í fljótandi köfnunarefni og duftað með Mikro-Dis-membrator S (Sartorius, Göttingen, Þýskalandi) í Nýsköpunarmiðstöð Íslands.

#### Smásjarmyndir

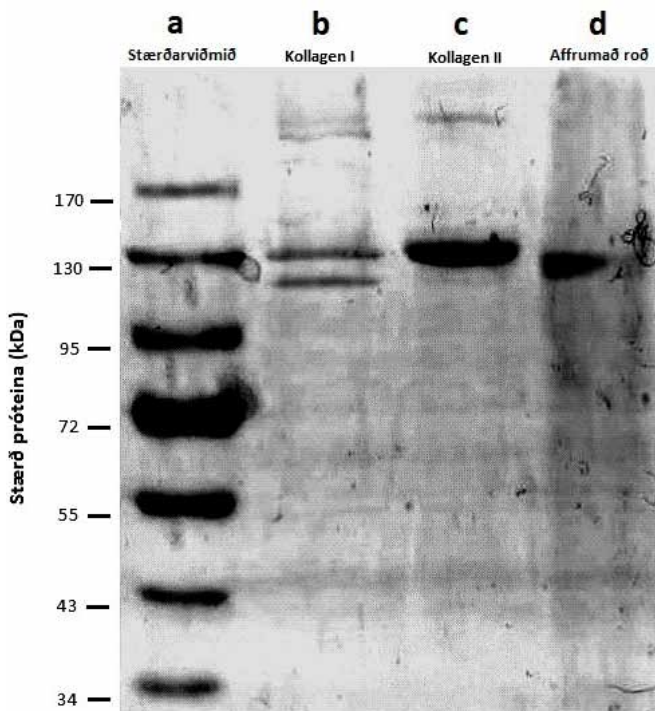
Sýni af affrumuðu roði voru undirbúin fyrir skoðun og myndatöku með rafeindasmásjá af gerðinni Supra 25 (Leo Electron Microscopy Ltd, Cambridge) hjá Nýsköpunarmiðstöð Íslands (mynd

**Tafla I.** Yfirlit yfir vefjasamrýmanleikapróf á roðinu. Öll próf voru framkvæmd af Toxicon fyrir utan inneitursprófið (endotoxin test) sem var framkvæmt af Isotron Laboratories.

Heiti og stutt lýsing prófs	Tilraunalífverur	Niðurstöður
<b>MTT-próf:</b> MTT -(3-(4,5-ímetýlpíasól-2-ýl)-2,5-difenyltetra-sólíum) ásamt affrumuðu roði var leyst í frumuæti (3 cm <sup>2</sup> /ml) og látið út á frumurækt í 24 klukkustundir. Lífandi frumur brjóta MTT niður. Niðurbrotsafurð MTT er mæld með ljósmæli.	L929 fibróblastar úr músum (stofn: C3H)	<b>Affrumað roð hafði ekki neikvæð áhrif á lífun L929 fibróblasta:</b> 79% frumna voru lífandi eftir meðferð með roðinu miðað við frumur sem fengu sömu meðferð án roðs. Metið samkvæmt ISO-reglugerð númer 10993-5.
<b>MEM-próf:</b> MEM (Minimum Essential Medium) frumuæti sem innihélt roð (3 cm <sup>2</sup> /ml) var látið út á frumurækt sem hafði náð fullri þekju í 0, 24 eða 48 klukkustundir. Eitrunaráhrif voru metin með því að skoða form og lögun frumna.	L929 fibróblastar einangraðir úr músum (stofn: C3H)	<b>Affrumað roð hafði ekki sjáanleg áhrif á lögun L929 fibróblasta.</b> Metið samkvæmt ISO-reglugerð númer 10993-5.
<b>Vökví í æð (systemic toxicity test):</b> Roð (30 cm <sup>2</sup> ) var leyst upp í vökva og gefið í æð (2 ml/min, ~50 ml/kg) músa. Mýsnar voru vigtaðar áður en að þær fengu vökva í æð og aftur eftir 24, 48 og 72 klukkustundir.	Albínóamýs, Sviss	<b>Affrumað roð gefið í æð músa reyndist ekki eitrad.</b> Allar mýs þyngdust eðlilega og engin sjáanleg merki um eitrunaráhrif. Metið samkvæmt ISO-reglugerð númer 10993-5.
<b>Ígræðsla í vöðva:</b> Ræmum (1X10 mm) af roði var komið fyrir á vöðvum (paravertebral) músa. Mýsnar voru láttnar bera ígrædda roðið í eina viku. Áhrif voru metin með því að skoða vefjasýni í ljóssmásjá.	Albínóamýs, Sviss	<b>Affrumað roð grætt í vöðva músa olli ekki eitrunaráhrifum. Það olli hins vegar vægu bólgusvari miðað við neikvætt viðmið.</b> Metið samkvæmt ISO-reglugerð númer 10993-5.
<b>Sóthitapróf (pyrogenicity test):</b> Roð uppleyst í vökva (3 cm <sup>2</sup> /ml) var gefið í æð (~≤10 ml/kg) á kaninum. Líkamshiti kaninanna var mældur rétt áður en þær voru sprautaðar og síðan með 30 mínútna millibili í þrjár klukkustundir eftir sprautun.	Hvítar kanínur, Nýja-Sjáland	<b>Affrumað roð gefið í æð olli ekki sóthita í kaninum.</b> Líkamshiti hækkaði ekki umfram 0,5°C í neinni kanínu. Metið samkvæmt ISO-reglugerð númer 10993-11.
<b>Inneiturspróf (endotoxin test):</b> Roð (21 cm <sup>2</sup> ) var sett í 200 ml af vatni í 15 mínútur við 37°C. Magn inneiturs (EU/ml) var síðan mælt í flötinu sem roðið var í.		<b>Magn inneiturs í affrumuðu roði mældist innan viðmiðunarstaðla.</b> Viðmiðunarstaðlarnir miðað við að ekki sé meira af inneitri en 20 EU/prófefni.
<b>Prófun á ertingu húðar (irritation test):</b> Roði (6,25 cm <sup>2</sup> ) var komið fyrir á húð í fjórar klukkustundir. Svæði húðar þar sem roðið var lagt á var skoðað 1, 24, 48 og 72 klukkustundum eftir að roðið var fjarlægð.	Hvítar kanínur, Nýja-Sjáland	<b>Affrumað roð veldur ekki bólgusvari í húð kanína.</b> Húð sem bar roð sýndi engin merki um roða eða þjúg eftir 72 klukkustundir. Metið samkvæmt ISO-reglugerð númer 10993-10.
<b>Buehler-próf á næmi húðar (Buehler sensitization test):</b> Roði (6,25 cm <sup>2</sup> ) var komið fyrir á húð í 6 klukkustundir. Svæði húðar sem var í snertingu við roðið var skoðað 24 og 48 klukkustundum eftir að roðið hafði verið fjarlægð.	Albínóanaggrísir	<b>Affrumað roð olli ekki aukningu í næmi húðar naggrísa miðað við viðmiðunarstaðla.</b> Metið samkvæmt ISO-reglugerð númer 10993-10.
<b>Ames-stökkbreytingarpróf:</b> Bakteríustofnarnir sem notaðir voru búa yfir stökkbreytingum sem valda því að þeir geta ekki myndað histidín eða tryptofan. Bakteríustofnunum var komið fyrir í æti sem er snautt af fyrirnefndum aminosýrum með eða án roðs (3 cm <sup>2</sup> /ml) og sáð á skálar. Skálar voru geymdar við 37±1°C í um 70 klukkustundir og eftir það voru bakteríuþyrpingar á skálunum taldar.	<i>Salmonella typhimurium</i> og <i>Escherichia coli</i>	<b>Affrumað roð leiddi ekki til marktækrar aukningar á tíðni stökkbreytinga (p≤0,05).</b> Metið samkvæmt ISO-reglugerð númer 10993-3.
<b>Litningafrávikspróf:</b> Roð var leyst í frumuæti (3 cm <sup>2</sup> /ml) og hellt út á frumurækt, eftir þrjár klukkustundir var roðið fjarlægð. Frumur var síðan leyft að vaxa í nýju frumuæti án roðs í 24 klukkustundir til viðbótar. Að lokum voru frumur litaðar með Giemsa-lit sem binst litningum.	Frumur úr eggjastokk hamsturs, Kína ( <i>chinese hamster ovary cells</i> )	<b>Affrumað roð olli ekki sjáanlegri breytingu á lögun litninga miðað við neikvætt viðmið.</b> Metið samkvæmt ISO-reglugerð númer 10993-12.
<b>Örkjarnapróf (micronucleus assay).</b> Vökva með roði (3 cm <sup>2</sup> /ml) var sprautað (~≤20 ml/kg) í kviðarhol músa. Músunum var fórnað eftir 24 klukkustundir og sneiðar úr beinmerg skoðaðar í smásjá.	Rauðkorn úr albínóamúsum, Sviss	<b>Affrumað roð olli ekki marktækri aukningu á smákjörnóttum rauðkornum, (p≤0,05).</b> Metið samkvæmt ISO-reglugerð númer 10993-3.
<b>Langtíma eitrunarpróf (subchronic toxicity test).</b> Roðið (10 cm <sup>2</sup> ) var grætt undir húð á rottum (n=20). Eftir 90 daga var rottunum sem fengu roð fórnað ásamt viðmiðunarhóp (n=20) sem fékk enga meðferð. Eitrunaráhrif voru metin með smásjárskoðun, þyngdarmælingum og blóðfræði.	Albínóarottur	<b>Affrumað roð grætt undir húð olli ekki marktækum eitrunaráhrifum miðað við viðmiðunarhóp (p≤0,05).</b> Metið samkvæmt ISO reglugerð númer 10993-11.

1a-b). Fyrir myndatöku með ljóssmásjá af gerðinni Leica DMIRB (Kerfislíffræðisetur, Háskóli Íslands) voru sýni af roðinu fest með 10% formalíni og síðan lituð með hematoxýlíni og eosíni undir stöðluðum aðstæðum hjá Vefjarannsóknarstofunni í Reykjavík

(mynd 1c). Fyrir myndatöku með confocal-smásjá af gerðinni Olympus FV1200 (Lífvísindasetri Háskóla Íslands) voru sýni af roðinu fest í 10% formalíni. Ekki þurfti að lita roðið fyrir skoðun með confocal-smásjá þar sem roðið gefur frá sér sjálfvirka flúr-



**Mynd 2.** Próteinrafráttur á póliakrýlamíðgeli. (a) Stærðarviðmið. (b) Kollagen I. (c) Kollagen II. (d) Rafdráttarróf affrumaða roðsins einkennist af veiku bandi á bilinu 130-115 kDa. (b-d) Aðalpróteinband roðsins er á stærðarbilinu 130-115 kDa og skarast við kollagen I og að hluta til kollagen II (n=3).

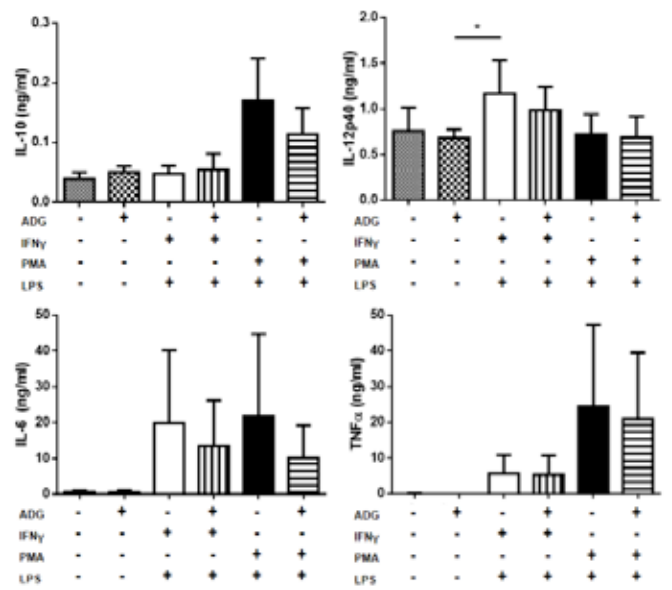
ljómum við vissar bylgjulengdir, í þessu tilviki var roðið örvað með 488 nm ljósi (mynd 1d). Kjarnalitun (NucBlue, Life technologies) var neikvæð.

*Vefjasamrýmanleiki*

Ýmis próf á lífsamrýmanleika roðsins voru framkvæmd af vottuðum rannsóknarstofum sérhæfðum í slíkum rannsóknum (Toxikon, Massachusetts, Bandaríkjunum og Isotron Laboratories, Tullamore, Írlandi). Vefjasamrýmanleikapróf eru eitt af fjölmörgum skilyrðum eftirlitsstofnana fyrir markaðsleyfum. Öll próf á græðlingnum voru framkvæmd samkvæmt stöðlum Alþjóðlegu staðlasamtakanna (International Organization for Standardization, ISO) (tafla I).

*Rafdráttur á pólyakrýlamíðgeli*

Til þess að greina bandvefsgerð roðsins var duftuðu roði blandað við glúkólastuðþúðalausn (0,2 M Tris, 0,4 M NaCl, 0,4 M CaCl<sub>2</sub> og 1 M glúkósi). Kollagenlausnir (Sigma-Aldrich, Missouri, Bandaríkjunum) ásamt próteinkvarða (*protein ladder*) (Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, Bandaríkjunum) voru notaðar sem stærðarviðmið. Kollagenlausnirnar innihéldu annaðhvort kollagen I, einangrað úr rottuhala, eða kollagen II, einangrað úr hænuþrjóski. Öllum sýnum var blandað saman við hleðslulausn (*loading buffer*) (62,5 mM Tris-HCl, 2% SDS, 10% glýseról, 5% 2-beta-merkaftóetanól og 0,01% blátt brómófenól) í hlutföllunum 1:1 áður



**Mynd 3.** IL-6, IL-10, IL-12 og TNF- $\alpha$  voru mæld í floti einkjörnunga eða stórátfrumna með Elísuprófi. THP-1 frumur voru ýmist ómeðhöndlaðar (48 klst., neikvætt viðmið, gráar súlur), ræktaðar með affrumuðu roði án örvarnar (48 klst.), for-örvaðar með IFN $\gamma$  (3 klst.) og svo örvaðar með LPS (48 klst., jákvætt viðmið, hvítar súlur) eða örvaðar með IFN $\gamma$  og LPS auk stodefnis. Einnig voru THP-1 frumurnar þroskaðar yfir í stórátfrumur með formeðhöndlun með PMA (48 klst.) auk örvarnar með LPS (48 klst., svartar súlur) með og án roðs. Enginn marktækur munur var á seytingu frumubodanna milli meðferðarhóps og viðmiðunarhóps fyrir hverja rækt fyrir sig. Skekkjumörkin sýna staðalskekkju meðaltala 6 tilrauna (n = 6). \*(p $\leq$ 0,05)

en þeim var hlaðið á 15% pólyakrýlamíðgel og þau rafdregin. Sýni voru rafdregin við 4°C og 70 volt í rúmar 120 mínútur (mynd 2).

*Bólguvakapróf*

Einkjörnungafrumulína af gerð THP-1 var keypt frá DSMZ, Leibnitz, Þýskalandi. THP-1 frumurnar voru ræktaðar í RPMI-1640 frumuæti ásamt eftirfarandi íbætiefnum (Thermo Fischer Scientific): pensillíni (100 U/mL) og streptómýsini (100  $\mu$ g/mL) og hitaóvirkjuðu kálfasermi (10%). Einkjörnungum var sáð með þéttleikanum 5x10<sup>5</sup> frumur/cm<sup>2</sup> í 24-holu bakka og ræktaðar í frumu-ræktarskáp við 90% raka, 5% koltvíoxíð og 37°C. Frumur fengu þrjár mismunandi meðferðir (mynd 3) með eða án roðs: enga örvun, interferón gamma (IFN $\gamma$ ) (100 U/mL) og lípópólýsakkaríð (LPS) (0,75  $\mu$ g/mL) (Sigma-Aldrich), eða forból-12-mýristat-13-asetat (PMA) (50 ng/mL) (Calbiochem, Darmstadt, Þýskalandi) ásamt LPS (0,75  $\mu$ g/mL). Einkjörnungar sem voru örvaðar fengu fyrst IFN $\gamma$  í þrjár klukkustundir og síðan hringskífu (1 cm<sup>2</sup>) af roði ásamt LPS í 48 klukkustundir til viðbótar. Til að virkja einkjörnunga yfir í stórátfrumur fengu þær fyrst PMA í 48 klukkustundir. Stórátfrumurnar voru síðan örvaðar með LPS í 48 klukkustundir, með eða án hringskífu (1 cm<sup>2</sup> = 0,024 g) af roði. Að lokum var lífvænleiki frumurækta metinn með XTT (2,3-bis-(2-metoxý-4-nítró-5-súlfófenýl)-2H-tetrasólíum-5-karbóanilíð) prófi (Biotium, Kaliforníu, Bandaríkjunum). Floti af frumuræktum var safnað og styrkur Interleukín-10 (IL-10), Interleukín-6 (IL-6), Tumor Necrosis Factor-alfa (TNF $\alpha$ ) og Interleukín-12 (IL-12p40) mæld með Elísu-

prófi (R&D Systems, Minneapolis, Bandaríkjunum). Munur milli meðhöndlunar með roði og án var metinn með stúdents-T prófi og marktækur munur táknaður með \*:  $p \leq 0,05$ .

#### Æða- og himnuþvagbelgspróf *in vivo*

Til að meta áhrif græðlingsins á æðamyndun *in vivo* var notað æða- og þvagbelgshimnuþróf í hænufóstri (chick chorioallantoic membrane assay, chick CAM).<sup>22</sup> Frjó hænuegg voru geymd í 7 daga í hitaskáp og prófefnum komið fyrir á mælisvæði sem var skilgreint með plastskífu fyrir innan gat á skurninni. Öll prófefni sem sett voru á æða- og þvagbelgshimnuna voru fyrst sæfð með 96% etanóli, sem innihélt einnig hýdrókortísón (2,5 mg/mL) (Sigma-Aldrich) síðan leyft að þorna. Filterpappírskífur (Sigma-Aldrich) vættar með VEGF (1 µg/mL) (Thermo Fischer Scientific) í afjónuðu vatni voru notaðar sem jákvætt viðmið, skífur vættar með afjónuðu vatni sem neikvætt. Roðið var einnig vætt í afjónuðu vatni áður en það var sett á æða- og þvagbelgshimnuna. Myndir voru teknar með með víðsjá (Leica MZ7,5, Mayer Instruments, Houston, Bandaríkjunum) fyrir og eftir að prófefni voru sett á mælisvæði æða- og þvagbelgshimnunnar. Eftir 48 klukkustundir í hitaskáp voru egginn tekin út og prófefnin tekin af æða- og þvagbelgshimnunni. Teknar voru myndir af mælisvæðinu sem prófefnin voru í snertingu við (mynd 4a). Breyting á æðamyndun fyrir og eftir ísetningu prófefna var metin, annars vegar með því að telja æðagreinar innan tiltekens stærðarbils (mynd 4b) og hins vegar með því að meta hlutfallslega breytingu á flatarmáli æða (mynd 4c). ImageJ var notað til skerpa myndirnar til þess að auðvelda greinatalningu á æðum og meta hlutfall flatarmáls æða á æða- og þvagbelgshimnunni.

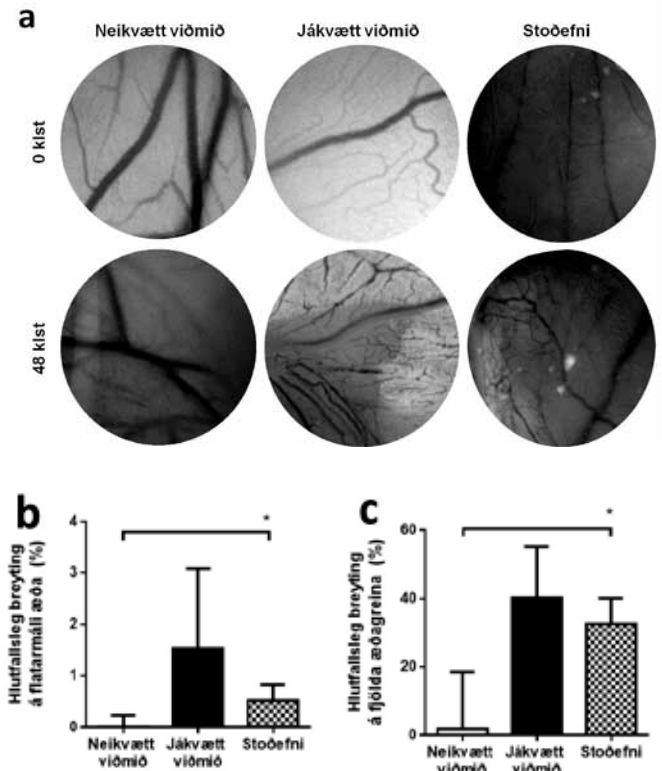
#### Niðurstöður

##### Bygging græðlingsins opin og treffjótt

Til að greina byggingu affrumaða roðsins og athuga hvernig hún hentar fyrir innvöxt frumna var stuðst við þrjár mismunandi myndgreiningaraðferðir: rafeindasmásjá, ljóssmásjá og confocal-smásjá. Rafeinda- og ljóssmásjármyndir af þverskurði roðsins sýna að það er holótt en við jadarinn er efnið þéttast (mynd 1a-c). Engar frumur sjást á myndum teknum með rafeindasmásjá (mynd 1a-b) og engir kjarnar sjást í ljóssmásjá, sem gefur til kynna að allar frumur hafi verið fjarlægðar úr roðinu (mynd 1c). Mynd tekin með confocal-smásjá sýnir að roðið virðist vera byggt upp af þráðum sem snúa hornrétt hverjir á aðra svipað og í ofnu klæði (mynd 1d). Allar aðferðir við myndgreiningu voru framkvæmdar að minnsta kosti þrisvar ( $n=3$ ).

##### Græðlingurinn er skaðlaus

Eftirfarandi próf á vefjasamrýmanleika græðlingsins voru framkvæmd af óháðum aðilum undir stöðluðum aðstæðum (tafla I): 3-(4,5-ímetýlþíasól-2-ýl)-2,5-dífenýltetrasólíum-próf (MTT) gaf til kynna að roðið hefði ekki marktæk áhrif á lifun frumna (MTT-próf, tafla I). Niðurstöður minimum essential medium-prófs (MEM) gaf til kynna að roðið hefði ekki sjáanleg áhrif á lögum frumna (MEM-próf, tafla I). Þegar roðið var grætt í kanínuvöðva greindust engin sjáanleg eitrunaráhrif en merki um vægt bólgusvar greindist í upp-



**Mynd 4.** Æða- og þvagbelgshimnuþróf. Hænufóstur voru meðhöndluð með hýdrókortísóni og einu af eftirfarandi prófefnum (hringskífur, 6 mm í þvermál): filterpappírskífu vættri í afjónuðu vatni (neikvætt viðmið), filterpappírskífu vættri með 1 µg/mL af VEGF (jákvætt viðmið), affrumuðu roði vættu í afjónuðu vatni. (a) Í efri röðinni sjást myndir af svæðinu á æða- og þvagbelgshimnunni þar sem sýnin voru lögð á í upphafi. Í neðri röðinni er mynd af sama svæði á æða- og þvagbelgshimnunni eftir að sýnin höfðu verið fjarlægð eftir 48 klukkustundir. (b) Súlnurn sýna hlutfallslega breytingu á fjölda æðagreina eftir 48 klukkustundir. Einhliða fersvikagreinin gaf til kynna að það sé annars vegar marktækur munur á milli roðsins og neikvæða viðmiðsins og hins vegar á milli jákvæða viðmiðsins og neikvæða viðmiðsins, einkennt með \* ( $p \leq 0,05$ ). Skekkjumörkin sýna staðalskekkju meðaltala ( $n=3$ ). (c) Súlnurn sýna hlutfallslega breytingu á flatarmáli æða eftir 48 klukkustundir. Skekkjumörkin sýna staðalskekkju meðaltala ( $n=3$ ). Einhliða fersvikagreining gaf til kynna að það sé marktækur munur á milli neikvæða viðmiðsins og roðsins, einkennt með \* ( $p \leq 0,05$ ).

hafi (ígræðsla í vöðva, tafla I). Roðið hafði ekki áhrif á bólgusvar í húð kanína (prófun á ertingu húðar, tafla I) og framkallaði ekki ofnæmisviðbrögð í húð naggrisa (Buehler-próf, tafla I). Magn innreiturs (endotoxin) í roðinu var mælt og reyndist vera innan viðmiðunarmarka (inneiturspróf, tafla I). Uppleyst roð sem gefið var í æð á tilraunadýrum reyndist hvorki vera eittrað í músum (vökví í æð, tafla I) né kaninum (sótthitapróf, tafla I). Hvað krabbameinsvaldandi áhrif varðar hafði roðið ekki marktæk ( $p \leq 0,05$ ) áhrif á tíðni stökkbreytinga í bakteríum (Ames-próf, tafla I) og ekki sjáanleg áhrif á form litninga í frumuræktun (litningafrávikspróf, tafla I). Roðið hafði heldur ekki marktæk ( $p \leq 0,05$ ) áhrif á aukningu örkjarna við mergfrumuskiptingar í músum (örkjarnapróf, tafla I). Engin eitrunaráhrif mældust þegar roðið var sett undir húð á rottum í 90 daga (subchronic toxicity próf, tafla I). Niðurstöður vefjasamrýmanleikaprófanna sýna að græðlingurinn er skaðlaus.

##### Græðlingurinn inniheldur kollagen I

Kollagen II er samsett úr þremur  $\alpha 1$  (130 kDa) peptíðkeðjum, kollagen I er samsett úr tveimur  $\alpha 1$  peptíðkeðjum og einni  $\alpha 2$  (115

kDa) peptíðkeðju<sup>23</sup> og eru rafdráttarróf kollagens I og kollagens II í samræmi við það. Rafdráttur á roði sýnir dauft band í kringum stærðarbilið 115-130 kDa sem talið er að svari til  $\alpha 1$  og  $\alpha 2$  undir- eininga kollagens I ( $n=3$ ) (mynd 2).

#### Græðlingurinn hafði ekki marktæk áhrif á seytingu bólguvaka

Engin marktæk breyting varð á seytingu IL-10, IL-12p40, IL-6 eða TNF- $\alpha$  milli eftirtalinnna para af hópum: einkjörnunga sem fengu roð eða enga meðferð (mynd 3a), einkjörnunga sem fengu roð ásamt örvun með LPS eða enga meðferð (mynd 3b), stórátfrumna sem fengu roð ásamt örvun með LPS eða enga meðferð (mynd 3c). Affrumað roð hafði auk þess engin marktæk áhrif á lífvænleika stórátfrumna miðað við niðurstöður XTT-prófs (sjá viðauka á heimasíðu blaðsins).

#### Græðlingurinn hafði marktæk áhrif á æðamyndun

Marktæk aukning var á fjölda æðagreina á æða- og þvagbelgshimnum kjúklingafóstra sem fengu roð ( $p \leq 0,01$ ) (mynd 4a-b) og einnig á flatarmáli æða á æða- og þvagbelgshimnunni sem var í snertingu við roð ( $p \leq 0,01$ ) (mynd 4a og 5c).

### Umræða

Markmið verkefnisins var að athuga hvort affrumað roð er öruggt fyrir klíniska notkun og athuga nánar eðliseiginleika roðsins sem eru taldir skipta máli fyrir vefjavíðgerðir. Bygging og próteinsamsetning roðsins var metin með smásjárskoðunum og próteinrafdrætti. Áhrif roðsins á bólgusvar frumna var athuguð með *in vitro* tilraunum og áhrif á æðamyndun með *in vivo* líkani.

**Smásjárskoðun.** Græðlingurinn var skoðaður með þremur mismunandi myndgreiningaraðferðum (myndir 1a-d) og gefa þær allar til kynna að engar frumur sé að finna í roðinu. Þessar myndir staðfesta að affrumunarfasi framleiðslunnar á roðinu hefur tilætlaða verkan. Í vefjalitun binst eosín próteinunum ósértækt (mynd 1c). Á myndum af roðinu með confocal-smásjá sjást bandvefsþræðir sem radast hornrétt hverjir á aðra. Roðsýnið var örvað með 488 nm ljósi í confocal-smásjanni og gaf við það frá sér ljós á bilinu 505-525 nm (mynd 1d). Millifrumuefni gefur frá sér sjálfvirka flúrljómun sem kemur aðallega frá elastíni og kollageni.<sup>24</sup> Á rafeindasmásjármyndunum má sjá hólfaskiptinguna í efninu og smásæja byggingu þess (mynd 1a-b). Þræðirnir í roðinu minna á byggingu kollagenþráða (mynd 1b og 1d). Hólfaskiptingin vakti vonir um að roðið gæti myndað hagstæðan grundvöll fyrir innvöxt og bólfestu fyrir frumur líkamans (mynd 1a-c).

**Próteinrafdráttur.** Rafdráttarrófi roðsins svipar til rafdráttarrófs kollagens I sem er algengasta gerð kollagens í húð manna.<sup>25</sup> Ef roðið inniheldi aðallega kollagen II væri þess að vænta að sjá band við stærðarbilið 130 kDa þar sem kollagen II er samsett úr þremur  $\alpha 1$  peptíðkeðjum.<sup>26</sup> Önnur ástæða þess að kollagen II er ekki talið vera til staðar í roðinu er að anti-kollagen II mót efni mælast ekki í sermi músa sem voru bólusettar með uppleystu roði.<sup>27</sup>

**Vefjasamræmanleiki.** Niðurstöður prófana á eitrunaráhrifum roðsins sem framkvæmdar voru af vottuðum og þar til bærum

rannsóknarstofum sýna að roðið er skaðlaust (tafla I). Kerfi þeirra stofnanna sem veita markaðsleyfi fyrir lækningavörur byggja á sérstökum ISO-stöðlum um vefjasamræmanleika og skilgreina þeir aðferðir sem sýna með óyggjandi hætti fram á skaðleysi. Í töflu I eru ýmsum vefjasamræmanleikaprófum lýst, allt frá einföldum prófunum þar sem efnið er leyst upp og penslað á húð dýra, í rannsóknir á litningum og músamerg. Niðurstaðan er sú að affrumað roð er skaðlaust. Þessi grein fjallar um notkun roðsins á rofna húð en til þess að uppfylla reglugerðarákvæði um notkun í ígræðslur þarf að framkvæma fleiri vefjasamræmanleikapróf. Meðal annars svokallað *subchronic toxicity test* próf sem sýndi ekki fram á eitrunaráhrif (tafla I).

**Bólgvakapróf.** Óeðlilega háir styrkur bólguboðefna er meðal þess sem einkennir þrálátt sáraástand.<sup>28</sup> Það er því mikilvægt að lækningavörur ætlaðar til meðhöndlunar á þrálátum sárum örvi ekki bólgusvar. Engin marktæk áhrif á bólgusvar greindust þegar roðið var sett í tæri við kanínuhúð (tafla I) og niðurstöður Elísuprófs á seytingu frumuboða bendir til þess að roðið hafi ekki teljandi áhrif á bólgusvar í einkjörnungum né stórátfrumum (mynd 3a-c). Vægt bólgusvar sem sást þegar roðið var grætt við vöðva kanína (tafla I) á fyrstu vikum ígræðslu er eðlilegt þegar um framandi hlut er að ræða og í samræmi við það sem áður hefur verið lýst við ígræðslu hliðstæðra stoðefna í vöðva.<sup>29</sup>

**Æðamyndun.** Nýmyndun æða er nauðsynleg til að byggja upp nýjan vef í sárum<sup>30</sup> og því er æskilegt að græðlingur stuðli að eða hindri ekki nýmyndun æða. Roðið hafði marktæk örvandi áhrif á æðamyndun í hænufóstri (mynd 4a-c). Óljóst er hvort þessi eiginleiki roðsins til að örva æðamyndun sé tilkominn vegna æðavaxtarþátta eða fólginna í byggingu roðsins. Mögulegt er að þessi virkni sé ástæða þess að sár meðhöndluð með affrumuðu þorskroði lokast fyrr en sár meðhöndluð með affrumuðum svínþörmum eins og áður var nefnt.

### Lokaorð

Affrumaða þorskroðið gæti búið yfir fleiri ókönnuðum eiginleikum sem stuðla að sárgróanda og þá sérstaklega eiginleikum sem tengjast fituinnihaldi efnisins. Vegna sjúkdómasmithættu<sup>31</sup> þarf að nota harkalegri aðferðir til að affruma samkeppnisvörur úr spendýravef, sem veldur því að fiturnar eru fjarlægðar úr vefnum.<sup>32</sup> Þekkt er að þurrvigt roðs úr Atlantshafsporskinum samanstendur aðallega af próteinum og fitu.<sup>33</sup> Fituinnihald hins affrumaða roðs hefur verið staðfest og er unnið að birtingu þeirra gagna. Omega-3 fitusýrur eru taldar geta temprað óeðlilegt bólgústand í þrálátum sárum<sup>34</sup> og gætu því verið mikilvægar fyrir eiginleika roðsins til að örva sárgróanda.

Á heildina litið sýna niðurstöðurnar sem hér hafa verið til umfjöllunar að affrumað roð er skaðlaust, vel vefjasamræmanlegt og býr yfir eiginleikum sem styðja vefjavíðgerð. Framtíðarrannsóknir á roðinu felast meðal annars í því að efnagreina hið affrumaða roð, og þá aðallega fituinnihald. Einnig standa yfir samanburðarrannsóknir við samkeppnisvörur á markaði sem allar eru unnar úr spendýrum. Ýmis rannsóknarverkefni á affrumuðu roði eru nú í bígerð, bæði grunn- og klínískar rannsóknir. Þessar rannsóknir munu varpa betra ljósi á eiginleika roðsins fyrir enduruppbyggingu líkamsvefja.

## Heimildir

- accessdata.fda.gov/cdrh\_docs/pdf13/K132343.pdf - febrúar 2015.
- Baldursson BT, Kjartansson H, Konradsdóttir F, Guðnason P, Sigurjonsson GF, Lund SH. Healing rate and autoimmune safety of full-thickness wounds treated with fish skin acellular dermal matrix versus porcine small-intestine submucosa: a noninferiority study. *Int J Low Extrem Wounds* 2015; 14: 37-41.
- Chang J, DeLillo NJ, Khan M, Nacinovich MR. Review of small intestine submucosa extracellular matrix technology in multiple difficult-to-treat wound types. *Wounds Compend Clin Res Pract* 2013; 25: 113-20.
- Hodde J, Hiles M. Virus safety of a porcine-derived medical device: evaluation of a viral inactivation method. *Biotechnol Bioeng* 2002; 79: 211-6.
- Calder PC. Marine omega-3 fatty acids and inflammatory processes: Effects, mechanisms and clinical relevance. *Biochim Biophys Acta* 2015; 1851: 469-84.
- Mil-Homens D, Bernardes N, Fialho AM. The antibacterial properties of docosahexaenoic omega-3 fatty acid against the cystic fibrosis multiresistant pathogen *Burkholderia cenocepacia*. *FEMS Microbiol Lett* 2012; 328: 61-9.
- Imai Y. Role of omega-3 PUFA-derived mediators, the protectins, in influenza virus infection. *Biochim Biophys Acta* 2015; 1851: 496-502.
- O'Meara S, Cullum N, Majid M, Sheldon T. Systematic reviews of wound care management: (3) antimicrobial agents for chronic wounds; (4) diabetic foot ulceration. *Health Technol Assess Winch Engl* 2000; 4: 1-237.
- Lam DW, LeRoith D. The worldwide diabetes epidemic. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2012; 19: 93-6.
- Reiber GE, Lipsky BA, Gibbons GW. The burden of diabetic foot ulcers. *Am J Surg* 1998; 176: 5S-10S.
- Sen CK, Gordillo GM, Roy S, Kirsner R, Lambert L, Hunt TK, et al. Human skin wounds: a major and snowballing threat to public health and the economy. *Wound Repair Regen Off Publ Wound Heal Soc Eur Tissue Repair Soc* 2009; 17: 763-71.
- Iorio ML, Shuck J, Attinger CE. Wound healing in the upper and lower extremities: a systematic review on the use of acellular dermal matrices. *Plast Reconstr Surg* 2012; 130: 232S-41S.
- Badyalak SF. Decellularized allogeneic and xenogeneic tissue as a bioscaffold for regenerative medicine: factors that influence the host response. *Ann Biomed Eng* 2014; 42: 1517-27.
- Kjartansson H, Olafsson IH, Karason S, Thorisson H, Baldursson BT, Gunnarsson E, et al. Use of Acellular Fish Skin for Dura Repair in an Ovine Model: A Pilot Study. *Open J Mod Neurosurg* 2015; 5: 124-36.
- Rakers S, Gebert M, Uppalapati S, Meyer W, Maderson P, Sell AF, et al. "Fish matters": the relevance of fish skin biology to investigative dermatology. *Exp Dermatol* 2010; 19: 313-24.
- Hawkes JW. The structure of fish skin. I. General organization. *Cell Tissue Res* 1974; 149: 147-58.
- Rakers S, Niklasson L, Steinhagen D, Kruse C, Schaubert J, Sundell K, et al. Antimicrobial peptides (AMPs) from fish epidermis: perspectives for investigative dermatology. *J Invest Dermatol* 2013; 133: 1140-9.
- Rayment EA, Upton Z. Finding the culprit: a review of the influences of proteases on the chronic wound environment. *Int J Low Extrem Wounds* 2009; 8: 19-27.
- Gibson D, Cullen B, Legerstee R, Harding K, Schultz G. MMps Made Easy. *Wounds Int* 2009; 1: 1-6.
- Harding K, Kirsner R, Lee D, Mulder G, Serena T. International consensus: Acellular matrices for the treatment of wounds. An expert working group review. *Wounds International*, London 2010.
- Olafsdóttir A, Thorlacius GE, Omarsdóttir S, Olafsdóttir ES, Víkingsson A, Freysdóttir J, et al. A heteroglycan from the cyanobacterium *Nostoc commune* modulates LPS-induced inflammatory cytokine secretion by THP-1 monocytes through phosphorylation of ERK1/2 and Akt. *Phytomedicine Int J Phytother Phytopharm* 2014; 21: 1451-7.
- Storgard C, Mikolon D, Stupack DG. Angiogenesis assays in the chick CAM. *Methods Mol Biol Clifton NJ* 2005; 294: 123-36.
- Kafienah W, Buttle DJ, Burnett D, Hollander AP. Cleavage of native type I collagen by human neutrophil elastase. *Biochem J* 1998; 330 ( Pt 2): 897-902.
- Monici M. Cell and tissue autofluorescence research and diagnostic applications. *Biotechnol Annu Rev* 2005; 11: 227-56.
- Epstein EHJ. (Alpha1(3))3 human skin collagen. Release by pepsin digestion and preponderance in fetal life. *J Biol Chem* 1974; 49: 3225-31.
- Cheah KS, Stoker NG, Griffin JR, Grosveld FG, Solomon E. Identification and characterization of the human type II collagen gene (COL2A1). *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985; 82: 2555-9.
- 26th Annual Meeting of the Wound Healing Society: SAWC-Spring/WHS Joint Meeting Sept 26-28, 2015. *Wound Repair Regen* 2015; 23: A49-53.
- Pradhan L, Cai X, Wu S, Andersen ND, Martin M, Malek J, et al. Gene expression of pro-inflammatory cytokines and neuropeptides in diabetic wound healing. *J Surg Res* 2011; 167: 336-42.
- Turner NJ, Badyalak SF. Biologic scaffolds for musculo-tendinous tissue repair. *Eur Cell Mater* 2013; 25: 130-43.
- Li J, Zhang Y-P, Kirsner RS. Angiogenesis in wound repair: angiogenic growth factors and the extracellular matrix. *Microsc Res Tech* 2003; 60: 107-14.
- Medical devices containing materials derived from animal sources (except for in vitro diagnostic devices), guidance for FDA reviewers and industry; availability--FDA. *Notice. Fed Regist* 1998; 63: 60009-10.
- Crapo PM, Gilbert TW, Badyalak SF. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials* 2011; 32: 3233-43.
- Bechtel PJ. Properties of Different Fish Processing By-Products from Pollock, Cod and Salmon. *J Food Process Preserv* 2003; 27: 101-16.
- McDaniel JC, Massey K, Nicolaou A. Fish oil supplementation alters levels of lipid mediators of inflammation in microenvironment of acute human wounds. *Wound Repair Regen Off Publ Wound Heal Soc Eur Tissue Repair Soc* 2011; 19: 189-200.

## ENGLISH SUMMARY

## Decellularized fish skin: characteristics that support tissue repair

Skuli Magnusson<sup>1</sup>, Baldur Tumi Baldursson<sup>1,2</sup>, Hilmar Kjartansson<sup>1,2</sup>, Gudny Ella Thorlacius<sup>3</sup>, Ivar Axelsson<sup>1</sup>, Ottar Rolfsson<sup>4</sup>, Petur Henry Petersen<sup>3</sup>, Gudmundur Fertram Sigurjonsson<sup>1</sup>

**Introduction:** Acellular fish skin of the Atlantic cod (*Gadus morhua*) is being used to treat chronic wounds. The prevalence of diabetes and the comorbidity of chronic wounds is increasing globally. The aim of the study was to assess the biocompatibility and biological characteristics of acellular fish skin, important for tissue repair.

**Materials and methods:** The structure of the acellular fish skin was examined with microscopy. Biocompatibility of the graft was conducted by a specialized certified laboratory. Protein extracts from the material were analyzed using gel electrophoresis. Cytokine levels were measured with an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Angiogenic properties were assessed with a chick chorioallantoic membrane (chick CAM) assay.

**Results:** The structure of acellular fish skin is porous and the material is biocompatible. Electrophoresis revealed proteins around the size 115-130 kDa, indicative of collagens. The material did not have significant effect on IL-10, IL-12p40, IL-6 or TNF- $\alpha$  secretion from monocytes or macrophages. Acellular fish skin has significant effect on angiogenesis in the chick CAM assay.

**Conclusion:** The acellular fish skin is not toxic and is not likely to promote inflammatory responses. The graft contains collagen I, promotes angiogenesis and supports cellular ingrowth. Compared to similar products made from mammalian sources, acellular fish skin does not confer a disease risk and contains more bioactive compounds, due to less severe processing.

<sup>1</sup>Kerecis Limited, Eyragata 2, 400 Isafjordur, Iceland, <sup>2</sup>Landspítali - The National University Hospital of Iceland, <sup>3</sup>Faculty of Medicine, University of Iceland, <sup>4</sup>Center for Systems Biology, University of Iceland.

**Key words:** Fish skin, extracellular matrix, acellular dermal graft, wound healing, tissue repair.

**Correspondence:** Baldur Tumi Baldursson, [btb@kerecis.com](mailto:btb@kerecis.com)