

LATVIJAS UNIVERSITĀTE
BIOLOĢIJAS FAKULTĀTE
MIKROBIOLOĢIJAS UN BIOTEHNOLOĢIJAS KATEDRA

**DABĪGU IMŪNMODULATORU KVALITĀTES
KONTROLES METOŽU IZVĒRTĒJUMS UN
STIMULĒJOŠĀS IEDARBĪBAS SALĪDZINĀJUMS AR
BAKTĒRIJU ENDOTOKSĪNU**

Maģistra darbs

Autors: Agija Lāce

Stud. apl. nr. al11086

Darba vadītājs: Dr. h. biol. Indriķis Muižnieks

Konsultants: Mag. biol. Anna Ramata-Stunda

Recenzents: Dr. biol. Nils Rostoks

Rīga 2016

SATURS

SATURS	2
SAĪSINĀJUMI	4
KOPSAVILKUMS	5
SUMMARY	6
IEVADS	7
1. Literatūras apskats	9
1.1. Dabīgie imūnmodulatori	9
1.1.1. Sēņu izcelsmes imūnmodulatori	10
1.1.1.1. β -glukāni un to imūnmodulējošās īpašības	13
1.1.1.2. <i>Penicillium lanoso-viride</i> AMP dezamināze un tās bioloģiskā iedarbība ...	14
1.2. Dabīgo imūnmodulatoru izraisītās atbildes reakcijas pēc stimulācijas ar tiem	15
1.3. Baktēriju endotoksīni un iespējas no tiem attīrīt dabīgas izcelsmes ekstraktus un aktīvās vielas	16
2. MATERIĀLI UN METODEDES	17
2.1. Materiāli	17
2.1.1. Šūnu kultūras	17
2.1.2. <i>Penicillium lanoso-viride</i> glikoproteīnu frakcijas	17
2.1.3. Kultivēšanas barotnes, ķīmikālijas, reaģenti, reaģentu komplekti	18
2.1.4. Laboratorijas iekārtas	21
2.1.5. Laboratorijas materiāli	22
2.1.6. Programmatūra	23
2.2. METODEDES	24
2.2.1. Endotoksīna eliminēšana no AMPD frakcijām	24
2.2.2. Endotoksīna līmeņa noteikšana	25
2.2.3. AMPD enzimatiskās aktivitātes noteikšana	25
2.2.4. AMPD dialīze pret destilētu H ₂ O	26
2.2.5. Furjē transformācijas infrasarkanā spektroskopija	26
2.2.6. Skenējošā elektronmikroskopija	27
2.2.7. Mononukleāro šūnu izdalīšana no donoru asinīm	27
2.2.8. Šūnu skaitīšana	28
2.2.9. Mononukleāro šūnu kultivēšana monoslānī dabīgu imūnmodulatoru klātbūtnē ..	28
2.2.10. Baktēriju endotoksīna neitralizēšana	28
2.2.11. Cilvēka dermas fibroblastu kultivēšana	29
2.2.12. Šūnu pārsēšana	29
2.2.13. Dermas fibroblastu kultivēšana dabīgu imūnmodulatoru, kā arī ar šiem imūnmodulatoriem stimulētu mononukleāro šūnu kultivēšanas barotņu klātbūtnē	29
2.2.14. Iekaisuma citokīnu sekrēcijas izmaiņu analīze	30
3. REZULTĀTI UN DISKUSIJA	32
3.1. AMPD frakciju attīrīšana no iespējamā endotoksīna piesārņojuma	32
3.2. Endotoksīna relatīvais daudzums dabīgos imūnmodulatoros	33
3.3. Furjē transformācijas infrasarkanā spektroskopija	34

3.4. Skenējošā elektronmikroskopija	36
3.5. Izmaiņas iekaisuma citokīnu sekrēcijā AMPD, LPS un Lentināna iedarbībā	38
3.6. Endotoksīna neitralizēšana.....	42
3.7. Dabīgu imūnmodulatoru, kā arī ar šiem imūnmodulatoriem stimulētu mononukleāro šūnu kultivēšanas barotņu ietekme uz dermas fibroblastu dzīvotspēju un proliferāciju.....	46
4. SECINĀJUMI.....	51
5. PATEICĪBAS	52
6. IZMANTOTĀ LITERATŪRA.....	53
PIELIKUMI	60

SAĪSINĀJUMI

AMP – adenoziņa monofosfāts	PRR – struktūras atpazīstošais receptors
AMPD – adenoziņa monofosfāta dezamināze	RPM – apgriezieni/minūtē
BSA – liellopu seruma albumīns	S10 – 10% FBS saturoša DMEM šūnu kultivēšanas barotne
CD14 – <i>cluster of differentiation</i> 14 (angļu val.)	TNF α – tumora nekrozes faktors α
DEPC – dietilpirokarbonāts	TLR – Toll-like receptors
DMEM – <i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i> (angļu val.)	U – enzīma vienība
EDTA – etilēndiamīn-tetra-acetilskābe	
ELISA – ar enzīmiem saistītā imunosorbentā pārbaude	
EU – enzīma vienība	
FBS – fetālais liellopa serums	
FIPs – sēņu imūnmodulējošie proteīni	
FTIR – Furjē transformācijas infrasarkanā spektroskopija	
HRP – mārrutku peroksidāze	
IL – interleikīns	
IMP – inozīna monofostāts	
INF – interferons	
LAL – limulus amebocyte lysate	
LPS – lipopolisaharīds, baktēriju endotoksīns	
NF- κ B – kodola faktors κ B	
NK – <i>natural killer</i> (angļu val.)	
PAMPs – ar patogēniem saistītās molekulārās struktūras	
PBMC – perifēro asiņu mononukleārās šūnas	
PBS – fosfāta sāļu buferšķīdums	
PMB – polimiksīns B	

KOPSAVILKUMS

Darba mērķis bija raksturot dabīga imūnmodulatora AMP dezamināzes aktivitāti saturoša glikoproteīnu kompleksa (AMPD) darbību *in vitro* un novērtēt, vai šī iedarbība nav saistīta ar iespējamo endotoksīna (LPS) piesārņojumu.

Tika izvērtētas AMPD attīrīšanas metodes, salīdzināta AMPD, LPS un lentināna ietekme uz iekaisuma citokīnu sekrēciju mononukleārajās šūnās, kā arī uz dermas fibroblastu proliferāciju.

AMPD frakcijas sastāvs un polisaharīda daļas iespējami strukturālā līdzība ar LPS sarežģīja kvalitātes kontroli. Tāpat kā LPS, AMPD stimulēja TNF α un IL-6 produkciju un veicināja dermas fibroblastu proliferāciju ar imūnšūnu sekretēto proteīnu starpniecību. LPS neutralizēšanai izmantojamās metodes maz ietekmēja AMPD imūnstimulējošo darbību, kas norāda, ka tā neveidojas endotoksīna piesārņojuma rezultātā.

Atslēgas vārdi: dabīgi imūnmodulatori, AMP dezamināze, baktēriju endotoksīns, mononukleārās šūnas, TNF α , IL-6

SUMMARY

Evaluation of quality control methods for natural immunomodulators and comparison of their stimulative effect to bacterial endotoxin

The aim of the study was to describe the activity of a natural immunomodulator glycoprotein complex containing AMP deaminase activity (AMPD) *in vitro* and to evaluate whether this activity is related to possible endotoxin (LPS) contamination.

Purification methods of AMPD were evaluated and effect of AMPD, LPS and lentinan on proinflammatory factors secretion in mononuclear cells and dermal fibroblasts proliferation were described.

Structure of AMPD fraction and possible structural similarity between its polysaccharide part and LPS complicated quality control. Similarly to LPS, AMPD stimulated TNF α and IL-6 production and promoted dermal fibroblasts proliferation by mediating proteins secreted by immune cells. Methods used to neutralize LPS had little impact on AMPD immunostimulating activity showing that it is not based on endotoxin contamination.

Keywords: natural immunomodulators, AMP deaminase, bacterial endotoxin, mononuclear cells, TNF α , IL-6

IEVADS

Pasaules Veselības organizācija turpmākajos gados prognozē sabiedrības novecošanos un līdz ar to diabēta un asinsrites slimību sastopamības pieaugumu (WHO 2013, WHO 2014). Šo slimību rezultātā bieži rodas tādas ilgi nedzīstošas brūces kā diabētiskās pēdas sindroms vai venozās un arteriālās čūlas (Brem *et al.* 2007). Svarīga brūču dzīšanas procesa daļa ir iekaisums, kura laikā imūnsūnas iztīra ievainoto vietu no svešķermeņiem, baktērijām, kā arī bojātajiem audiem (Singer and Clark 1999). Hronisku brūču gadījumā iekaisuma procesi bieži vien nenodrošina pietiekami efektīvu lokālu reakciju, kas būtu vērsta uz ievainojuma sadzīšanu (Mekkes *et al.* 2003). Līdz ar to svarīgi novērtēt dabīgu aktīvo vielu potenciālu stimulēt hronisku brūču dzīšanu, īpašu uzmanību pievēršot savienojumiem, kam piemīt spēja modulēt lokālo iekaisumu un veicināt brūču reepitelizāciju.

Savienojumus, kas spēj mijiedarboties ar imūnsistēmu, stimulējot vai supresējot atbildes reakciju, sauc par imūnmodulatoriem (Ziauddin *et al.* 1996, Tzianabos 2000). Dabīgi imūnmodulatori ir, piemēram, sēņu un augu izcelsmes polisaharīdi un glikoproteīni. Daļai no tiem piemīt spēja veicināt iekaisuma citokīnu, kā TNF α , IL-6, IL-1 α , IL-1 β un citu, sekrēciju (Wasser 2002, El Enshasy and Hatti-Kaul 2013).

Latvijas Universitātes Bioloģijas fakultātes Mikrobioloģijas un biotehnoloģijas katedrā jau vairāk nekā 20 gadus pēta *Penicillium lanoso-viride* producēto glikoproteīnu kompleksu ar AMP dezamināzes aktivitāti (AMPD), un tam aprakstīta spēja veicināt ādas brūču reepitelizāciju žurkām, kā arī pasargāt tās no eksperimentāli izraisītām infekcijām (Николаева 1982, Nikolajeva *et al.* 1996, Nikolajeva *et al.* 1999, Nikolajeva *et al.* 2009). Pētīta arī AMPD spēja stimulēt iekaisuma citokīnu sekrēciju (Ramata-Stunda *et al.* 2013), un novērota līdzīga iedarbība kā lipopolisaharīdam (LPS). Ir perspektīvas šo preparātu izmantot medicīnas ierīču sastāvā brūču, tai skaitā diabētiskās pēdas sindroma, arteriālo un venozo čūlu, apstrādei. Lai attīstītu šo ierīču izveidi, nepieciešams novērtēt AMPD iespējamo piesārņojumu ar endotoksīnu.

Maģistra darba mērķis bija raksturot dabīga imūnmodulatora AMP dezamināzes aktivitāti saturoša glikoproteīnu kompleksa (AMPD) darbību *in vitro* un novērtēt, vai šī iedarbība nav saistīta ar iespējamo endotoksīna (LPS) piesārņojumu.

Mērķa īstenošanai izvirzīja šādus **darba uzdevumus**:

1. Izvērtēt potenciālo AMPD piesārņojumu ar endotoksīnu (LPS) un tā attīrīšanas iespējas;
2. Analizēt citokīnu sekrēcijas izmaiņas mononukleārajās šūnās AMPD, LPS un lentināna ietekmē;
3. Salīdzināt AMPD ietekmi uz imūnās atbildes veidošanu ar standartvielām (LPS un lentinānu);
4. Izvērtēt AMPD, LPS un lentināna netiešo, caur imūnšūnu stimulāciju realizēto, ietekmi uz dermas fibroblastu dzīvotspēju un proliferāciju.

1. LITERATŪRAS APSKATS

1.1. DABĪGIE IMŪNMODULATORI

Imūnmodulatori ir savienojumi, kas, mijiedarbojoties ar imūnsistēmu, spēj vai nu stimulēt, vai supresēt imūno atbildi (Ziauddin *et al.* 1996, Tzianabos 2000). Tāpēc imūnmodulatorus pēc to aktivitātes galvenokārt iedala imūnstimulatoros un imūnsupresantos. Imūnstimulatori ir vielas, kas, aktivējot imūnsistēmas sastāvdaļas vai mediatorus, veicina imūnās atbildes veidošanos. Šādi tiek palielināta organisma spēja pretoties dažādām infekcijām, alergijām un audzējiem. Imūnsupresanti turpretim inhibē imūnsistēmu un var tikt lietoti, lai ierobežotu pataloģisku imūno atbildi pēc orgānu transplantācijas un lai ārstētu autoimūnās slimības, ar infekcijām saistītas imūnās patoloģijas un hipersensitīvu imūno atbildi (Patil *et al.* 2012, El Enshasy and Hatti-Kaul 2013).

To, vai noteikti savienojumi pastiprinās vai nomāks imūno atbildi, nosaka vairāki faktori, piemēram, to deva, iedarbības vieta un ilgums, kā arī darbības mehānisms (Tzianabos 2000). Iespējama arī abu šo īpašību izpausme, tikai atšķiroties imūnās atbildes reakcijām, ko imūnmodulators ietekmē. Atsevišķi izšķir vēl specifiskos imūnstimulantus, ko izmanto, lai pastiprinātu vakcīnu iedarbību, un tolerogēnus jeb imūnšūnu kostimulācijas inhibitorus (Patil *et al.* 2012, El Enshasy and Hatti-Kaul 2013).

Dabīgi imūnmodulatori iegūstami no dažādiem avotiem, piemēram, sēnēm, augiem un arī posmkājiem (Catalli and Kulka 2010, Patil *et al.* 2012, El Enshasy and Hatti-Kaul 2013). Šādas izcelsmes peptīdi, proteīni, polisaharīdi un glikoproteīni ir aprakstīti kā dabiskās bioloģiskās atbildes regulētāji (Tzianabos 2000, El Enshasy and Hatti-Kaul 2013). Šie imūnmodulatori spēj pastiprināt vāju imūno sistēmu vai regulēt imūnsistēmu, kam ir paaugstināta aktivitāte. Dabīgas izcelsmes imūnmodulatori ir mazāk aktīvi nekā sintētiskie, toties tiem retāk raksturīgi nevēlami blakus efekti (Patil *et al.* 2012).

Dabīgas izcelsmes imūnmodulatori ir, piemēram, augu steroli un sterolīni, kas atrodami neapstrādātos augļos, dārzeņos un aļģēs. Ir aprakstīts tādu augu kā *Aconitum baikalense*, *Cirsium setosum* and *Saussurea controversa* ekstraktu potenciālas imūnmodulējošās spējas. Šie ekstrakti jau ir izmantoti labdadīgu un ļaundabīgu audzēju ārstēšanā, pret antibiotiku rezistentām

infekcijām, alergijām un vairogdziedzera slimībām (Patil *et al.* 2012). Srivasta *et al.* (2010) raksturojuši kurvjziežu dzimtas augu (*Chamamelum nobile*, *Matricaria chamomilla*) terpenoīdu un flavonoīdu pretiekaisuma īpašības, savukārt Block and Mead (2003) aprakstījuši *Echinacea purpurea* alkilamīdu un glikoproteīnu imūnstimulējošos efektus. Vēl plašāk pētītas no sēnēm izdalīto imūnmodulatoru pozitīvās īpašības (Schepetkin and Quinn 2006, Catalli and Kulka 2010, El Enshasy and Hatti-Kaul 2013).

1.1.1. Sēņu izcelsmes imūnmodulatori

Tā kā starp sēņu, augu un dzīvnieku šūnu fizioloģiskajiem procesiem un ģenētiku ir svarīgas līdzības, kā arī ir atrasts praktisks pielietojums dažādu sēņu producētajiem savienojumiem, pēdējo gadu laikā ir pieaugusi interese gan par pašu sēņu, gan to ražoto aktīvo vielu izpēti (Galagan *et al.* 2005). Šobrīd pazīstamas vairāk nekā 50 sēņu sugas, kas satur imūnregulējošus organiskus savienojumus ar atšķirīgu molekulāro svaru un struktūru (Schepetkin and Quinn 2006, El Enshasy and Hatti-Kaul 2013).

Pētījumos izmantojot neapstrādātus sēņu ekstraktus, no tām izolētus proteīnus, polisaharīdus un citas bioloģiski aktīvas vielas, sēnēm imūnmodulējoša aktivitāte novērota gan *in vivo*, gan *in vitro*. Daļai no sēnēm izdalīto savienojumu raksturīga uz imūnsistēmas modulēšanu balstīta pretvēža iedarbība (Jeurink *et al.* 2008). Imūnmodulējošo aktivitāti iespējams novērtēt pēc šādu savienojumu ietekmes uz citokīnu sekrēciju cilvēka perifēro asiņu mononukleārajās šūnās (PBMC, *peripheral blood mononuclear cells*). Salīdzinājumam PBMC var stimulēt ar jau zināmiem mitogēno un imūno atbildi izraisošām vielām: baktēriju endotoksīnu lipopolisaharīdu (LPS), lektīnu ConA un citām. Izmaiņas citokīnu līmeņos var radīt dažādas patoloģijas un traucējumus citokīnu mediētajā mijiedarbībā starp dabīgo un iegūto imūno atbildi (Hirohashi *et al.* 1996, Hsu *et al.* 1997, Jeurink *et al.* 2008).

Sēņu izcelsmes imūnmodulatorus iedala četrās galvenajās grupās: imūnmodulatorajos terpēnos un terpenoīdos, imūnmodulatorajos lektīnos, sēņu imūnmodulatorajos proteīnos (FIPs, *fungus immunomodulatory proteins*) un imūnmodulatorajos polisaharīdos (El Enshasy and Hatti-Kaul 2013).

Terpēni ir organiskie savienojumi, kas sastāv no blokiem, ko veido izoprēna piecu oglekļa atomu vienības ar molekulāro formulu $(C_5H_8)_n$. Biezāk tie sastopami augos kā sveķu un ēterisko

eļļu galvenās sastāvdaļas, bet makroskopiskajās sēnēs terpēni atrodas pārveidotās formās kā terpenoīdi un izoterpenoīdi, un tiem piemīt bioloģiskā aktivitāte ar potenciālu pielietojumu medicīnā. Augsts terpenoīdu (tripterpenoīdu) sastāvs ar imūnmodulējošu un pretinfekciozu aktivitāti raksturīgs sēnēm, kas pieder *Ganoderma* ģintij, piemēram, *Ganoderma lucidum* un *Ganoderma applanatum* (Jeong *et al.* 2008, El Enshasy and Hatti-Kaul 2013).

Lektīni ir ogļhidrātus saistoša proteīnu grupa, ko var izolēt no dažādiem organismiem. Tiem, kas iegūti no sēnēm, raksturīga specifiska imūnmodulējoša, antiproliferatīva un pretvēža aktivitāte. Spēcīgākā imūnmodulējošā aktivitāte starp lektīniem aprakstīta tiem, kas izolēti no sēnes *Volvariella volacea*. Atkarībā no sēņu sugas, no kā lektīni izdalīti, tiem var piemist vai nu citotoksiska aktivitāte, vai spēja mediēt savu darbību, aktivējot imūnsistēmu (Hsu *et al.* 1997, El Enshasy and Hatti-Kaul 2013).

Pie sēņu proteīniem ar imūnmodulējošu efektu pieder arī lignocelulozi degradējoši enzīmi, proteāzes un to inhibitori. Šīm vielām piemīt antibakteriālas, pretvīrusu, pretsēņu, pretparazītu, pretiekaisuma, pretvēža u. c. īpašības. Šos sēņu metabolītus iespējams izmantot kā biotehnoloģiskos procesos, tā medikamentu ražošanā (Erjavec *et al.* 2012). Arvien atklāj, izdala un pēta jaunus sēņu proteīnus, kam raksturīgas iepriekš minētās īpašības (Kino *et al.* 1989, Ko *et al.* 1995, Jinn *et al.* 2006).

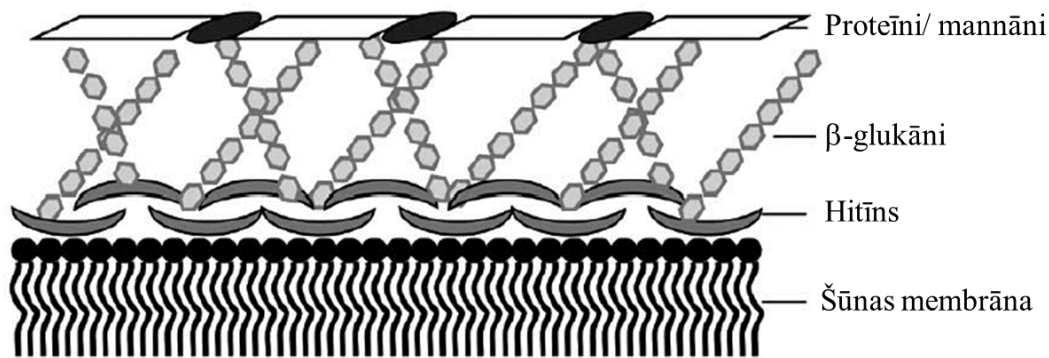
Piemēram, viena no nesenāk aprakstītajām sēņu imūnmodulējošo proteīnu grupām ir FIPs (*fungal immunomodulatory proteins*). Tie ir proteīnu imūnmodulatori, ko grupē kopā tiem raksturīgo līdzīgo aminoskābju sekvenču dēļ. FIPs uzbūve līdzinās imūnglobulīna smago ķēžu variablajiem rajoniem, bet tiem piemīt atšķirīgas iedarbības spējas (El Enshasy and Hatti-Kaul 2013). Kino *et al.* (1989) atklāja un raksturoja pirmo šāda veida proteīnu Ling Zhi-8, ko ieguva no *Ganoderma Zucidiurn*. Tam raksturīga imūnsupresīva aktivitāte un spēja nomākt autoimūnas diabēta rekcijas dzīvnieku modeļos un veicināt transplantāta izdzīvotību allogēnu peļu ādā. Šobrīd jau zināmi 11 dažādi šādu imūnmodulējošo proteīnu tipi, kā, piemēram, FIP-*fve*, FIP-*vvo*, FIP-*gts*, FIP-*gja*, kam novēroti gan imūnsupresējoši efekti, gan spēja stimulēt tādu citokīnu kā IL-2, IL-4 un IFN- γ , bet ne tumora nekrozes faktora α (TNF α) sekrēciju (Erjavec *et al.* 2012, El Enshasy and Hatti-Kaul 2013).

Visplašāk aprakstītā sēņu izcelsmes imūnmodulatoru grupa ir polisaharīdi. Polisaharīdi veidoti no monosaharīdu atlikumu polimēriem, kas savstarpēji savienoti ar glikozīdiskajām saitēm. Polisaharīdiem salīdzinājumā ar tādiem biopolimēriem kā proteīni un nukleīnskābes, iespējama daudz lielāla strukturālā daudzveidība un mainība, tādēļ tie attiecīgi var nest lielāku bioloģiskās informācijas daudzumu. Strukturālās daudzveidība dod tiem nepieciešamo elastību augstākajos organismos nodrošināt precīzus regulatoros mehānismus starpšūnu mijiedarbībai (Wasser 2002).

Lielākā daļa polisaharīdu ar imūnmodulējošu aktivitāti ir homoglukāni jeb polisaharīdi, kas satur viena veida monosaharīdu molekulu atlikumus, vai heteroglukāni – polisaharīdi, kas satur divu vai vairāk veidu monosaharīdu molekulu atlikumus. Tie var savienoties ar proteīniem, veidojot peptidoglikānus vai polisaharīdu-proteīnu kompleksus. Pirmais aprakstītais polisaharīds ar potenciālu imūnmodulējošu un pretvēža aktivitāti bija lentināns – β -1,3-D-glukāns ar β -1,6-zariem – ar trīskāršas spirāles struktūru. Lentinānu izolēja no *Lentinus edodes* augļķermeņa (Ikekawa *et al.* 1969, El Enshasy and Hatti-Kaul 2013).

Bioloģiski aktīvi polisaharīdi īpaši raksturīgi bazīdijsēnēm, piemēram, *Clavariaceae*, *Corticaceae*, *Ramariaceae*, *Hymenochaetaceae* un *Thelephoraceae* sēnēm. Lielākajai daļai polisaharīdu ir unikāla, no sēņu sugas atkarīga, struktūra (Wasser 2002).

Galvenie no sēnēm iegūstamie polisaharīdi, kam piemīt imūnmodulējošas spējas, ir β -glukāni un α -mannāni, kas ir sēņu šūnapvalka sastāvdaļas (1. attēls). Sēņu glikoproteīni satur ar mannozēm bagātas struktūras, kuru sastāvā ir ar patogēniem saistītās molekulārās struktūras (PAMPs, *pathogen-associated molecular patterns*), kam piemīt potenciāls izraisīt imūno atbildi cilvēkos (Willment and Brown 2008, Catalli and Kulka 2010).



1. attēls. Sēņu šūnapvalks. Sēņu šūnapvalku veido hitīns, β -glukāni un mannānus saturoši glikoproteīni. Precīzs šo sastāvdaļu izkārtojums attiecībā citam pret citu nav zināms (attēls pārveidots no Catalli and Kulka 2010).

Figure 1. Fungal cell wall. The fungal cell wall is comprised of chitin, β -glucans and mannan-containing glycoproteins. The precise organization of these components relative to one another is unknown (figure modified from Catalli and Kulka 2010).

1.1.1.1. β -glukāni un to imūnmodulējošās īpašības

Glukāni ir polisaharīdi, kas bez glikozes satur arī citas vielas. Atkarībā no galvenās ķēdes veidojošā cukura, tos iedala galaktānos, ksilānos, fukānos un mannānos. Kā galveno sastāvdaļu heteroglukānu sānu ķēdes var saturēt arabinozi, mannozi, galaktozi, ksilozi, fukozi, glukuronskābi un glikozi. Glukāni ir savienojumi ar dažādu veidu glikozīdiskajām saitēm, piemēram, (1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 6)- β -glukāni un (1 \rightarrow 3)- β -glukāni, bet daži ir īsti heteroglukāni, kas satur divu vai vairāku monosaharīdu veidu molekulu atlikumus un var veidot kombinācijas ar proteīniem, veidojot peptidoglikānus un polisaharīdu-proteīnu kompleksus (Wasser 2002).

Medicīnisko sēņu β -(1 \rightarrow 3)-glukānu imūnstimulējošajā aktivitātē liela nozīme ir to trīskāršajai spirālveida terciārajai konformācijai, ar kuras starpniecību aktivējas saimniekorganisma imūnā atbilde (Maeda *et al.* 1988). Spēja izmainīt imūno atbildi tiek saistīta ar glukānu spēju saistīties ar PRR (*pattern recognition receptors*), kas atpazīst PAMPs (Herre *et al.* 2004). Wasser (2002) aprakstījis β -(1 \rightarrow 3)-glukānu spēju palīdzēt organismam pielāgoties vides un citiem bioloģiskiem stresiem. Specifiski iedarbojoties, tie atbalsta nervu, hormonālo un imūno sistēmu, nekaitējot ķermenim un neradot pārmērīgu stresu.

Sēņu šūnapvalka sastāvā esošajiem (1→6) zarotajiem (1→3)-β-D-glukāniem piemīt brūču dzīšanu veicinoša aktivitāte. To ietekmē tiek veicināta granulācijas audu veidošanās, kolagēna biosintēze un pareiza organizācija ekstracelulārajā matriksā, brūces reepitelizācija un paaugstināta stiepes izturība. β-glukānu piesaistīšanās vietas ir atklātas ne tikai uz imūnšūnām, bet arī cilvēku dermas fibroblastiem (Son *et al.* 2005).

Tāpat β-glukāni apdeguma vietā spēj palielināt makrofāgu skaitu, bet samazināt neitrofilu daudzumu un aktivitāti. Mazinot neitrofilu migrāciju un nonākšanu kapilāros, tiek novērsti oksidatīvie ievainojumi, apdeguma išēmija, kā arī audu bojājumi. Neitrofiliem mijiedarbojoties ar endotēliju, tiek ierobežota mikrocirkulācija un samazināts kapilāru lūmena diametrs. β-glukāni nomāc apdeguma sākumperiodam svarīgus procesus, kā akūta iekaisuma fāzi un asinsvadu aizsprostošanos. β-glukānu antioksidatīvās īpašības potenciāli aizsargā membrānas integritāti endotēlija šūnām. Tie ir iesaistīti brūču dzīšanas iekaisuma pārejas regulācijā uz proliferatīvo fāzi (Firat *et al.* 2013).

1.1.1.2. *Penicillium lanoso-viride* AMP dezamināze un tās bioloģiskā iedarbība

Imūnmodulējošas īpašības iepriekš aprakstītas arī AMP dezamināzes jeb nespecifiskās adenilāta dezamināzes (AMP aminohidrolāze, EC 3.5.4.6) aktivitāti saturošam glikoproteīnu kompleksam (AMPD; 210 kDa). Glikoproteīnu frakcija gēlfiltrācijas ceļā izdalīta no mutagēna mikroskopiskas augsnes micēlijsēnes *Penicillium lanoso-viride* celma (Nikolajeva *et al.* 1996, Nikolajeva *et al.* 1999, Nikolajeva *et al.* 2009).

No *P. lanoso-viride* iegūtās glikoproteīnu frakcijas pozitīvā ietekme *in vivo* pierādīta jau iepriekš. Eksperimentos ar dzīvniekiem AMPD parādījusi spēju veicināt ādas čūlu reepitelizāciju, paaugstināt aizsardzību pret eksperimentāli izraisītām infekcijām un kavēt akūta eksperimentāla autoimūnā encefalomiēlīta sākumu. Pētījumi parādījuši, ka glikoproteīnu frakcijai piemīt imūnmodulējoša aktivitāte, kas var ietekmēt kā šūnu mediētās, tā humorālās imunitātes reakcijas. AMPD stimulē limfocītu proliferāciju *in vitro* un aktivē makrofāgus, inducējot citokīnu sekrēciju (Nikolajeva *et al.* 1996, Nikolajeva *et al.* 1999, Nikolajeva *et al.* 2009). Tomēr precīzi šūnu un molekulārie mehānismi, ko ierosina AMPD, pagaidām vēl nav noskaidroti.

1.2. DABĪGO IMŪNMODULATORU IZRAISĪTĀS ATBILDES REAKCIJAS PĒC STIMULĀCIJAS AR TIEM

Wasser (2002), Borchers *et al.* (2004) un Vetvicka and Vetvickova (2014) aprakstījuši tādas dabīgo imūnmodulatoru izraisītos efektus kā citokīnu sekrēciju, dabīgo galētāj- jeb NK šūnu, neitrofilu un makrofāgu aktivitātes un proliferācijas stimulāciju un veicinātu antivielu veidošanos. Sēņu izcelsmes imūnmodulatori galvenokārt spēj stimulēt dažādu citokīnu sekrēciju (Jeurink *et al.* 2008). To glikoproteīni un polisaharīdi stimulē tādu iekaisuma citokīnu kā IL-1 α/β , TNF α , IFN- γ un IL-10 sekrēciju (Berovic *et al.* 2003, Chen and Seviour 2007, Vannucci *et al.* 2013). Savukārt daļa lektīnu inducē dendrītisko šūnu nobriešanu un aktivēšanu, tādējādi stimulējot citokīnu, kā IL-6, IL-8 un TNF α , sekrēciju (El Enshasy and Hatti-Kaul 2013).

β -glukānu imūnstimulējošā aktivitāte var veicināt brūču dzīšanu divos veidos: netieši aktivējot dažādu makrofāgu citokīnu, piemēram, TNF α un IL-6, sekrēciju, vai tieši ietekmējot dermas fibroblastus, saistoties pie glukānu specifiskiem receptoriem. β -glukāni ietekmē makrofāgu aktivāciju, īpaši TNF α sekrēciju, kas savukārt aktivē transkripcijas faktoru kodola faktoru- κ B (NF- κ B). NF- κ B ir atbildīgs par iekaisuma izmaiņām vaskulārajos audos. IL-6 savukārt piemīt pirmsiekaisuma aktivitāte, un tas palielina TNF α līmeni, kas veicina ātrāku iekaisuma fāzes iestāšanos un brūci pārņēmušo patogēnu iznīcināšanu. β -glukānu migrācija tiek aktivēta, tiem piesaistoties pie receptoriem uz fibroblastu virsmas (Wei *et al.* 2002, Son *et al.* 2007). Attīrīti glukāni veicina arī makrofāgu infiltrāciju brūces apkārtnē, tādējādi saīsinot fibroplāzijas un fibroģenēzes norises ilgumu, stimulējot audu granulāciju un uzlabojot reepitelizācijas procesus dažādos eksperimentālos brūču modeļos, piemēram, diabēta gadījumā (Kwon *et al.* 2009).

Dabīgas izcelsmes polisaharīdi, kam piemīt imūnmodulējošas īpašības, var aktivēt makrofāgus caur dažādiem receptoriem, piemēram, mannozes receptoru (MR), dektīna-1 receptoru un Toll-like receptoru 2 un 4 (attiecīgi TLR-2 un TLR-4). Aktivējot mannozes receptorus, tiek stimulēta makrofāgu fagocitoze, oksidantu produkcija, endocitoze un NF- κ B aktivācija. Atbilstošajiem ligandiem pievienojoties pie TLR-2 vai TLR-4, notiek IL-1R asociētās kināzes aktivācija caur adaptoru mieloīdo diferenciācijas proteīnu 88 (MyD88), tālāk aktivējoties

arī ar TNF receptoru asociētajam faktoram 6 (TRAF-6), MAP kināzēm un arī NF-κB. Dektīna-1 receptora aktivēšanās savukārt noved pie lipīdu molekulu savienošanās ar signālmolekulām, piemēram, liesas tirozīna kināzi (Syk, *spleen tyrosine kinase*; Schepetkin and Quinn 2006, Kim *et al.* 2011).

1.3. BAKTĒRIJU ENDOTOKSĪNI UN IESPĒJAS NO TIEM ATTĪRĪT DABĪGAS IZCELSMES EKSTRAKTUS UN AKTĪVĀS VIELAS

Endotoksīns (LPS) ir gram-negatīvo baktēriju šūnapvalka sastāvdaļa. To opsonizē lipopolisaharīdus saistoši proteīni, un šo kompleksu atpazīst uz makrofāgu virsmas esošais CD14 receptors. Piesaistoties ligandam, tālāk tiek aktivēts TLR-4, kas palaiž NF-κB signālceļu, izraisot iekaisuma citokīnu sekrēciju. TLR-4 uzskatāms par galveno, ja ne vienīgo, receptoru, kas spēj aktivēt LPS inducētas reakciju kaskādes (Aderem and Ulevitch 2000).

LPS piemīt augsts imūnstimulējošais potenciāls, kas var izraisīt izmaiņas imūnās atbildes reakcijās, paaugstinot iekaisuma citokīnu sekrēciju (Matsuno *et al.* 2001). Piemēram, pētījumā ar sarkoidozes pacientiem, *in vitro* stimulējot PBMC ar attīrītu lipopolisaharīdu, novēroja paaugstinātu TNFα, IL-6, IL-10 un IL-12 sekrēciju (Stopinšek *et al.* 2010). Tomēr LPS ne vienmēr ir pozitīvs efekts, un tā izraisītie imūnsistēmas traucējumi var novest pie asinsvadu bojājumiem, sepses un orgānu atteikšanās (Cohen 2002).

Lai proteīnus attīrītu no LPS, izmanto uz dažādām, piemēram, jonapmaiņas, membrānām balstītas hromatogrāfijas metodes (Rao 2001, Teeters *et al.* 2002). Aprakstīta arī divu fāžu ūdens micellārā sistēma, kur micellārās struktūras nepolāri saistās ar lipīda A alkilķēdēm un atdala endotoksīnu no ūdens fāzes (Liu *et al.* 1998). Plaši aprakstītas metodes, kas lipopolisaharīda atdalīšanai no proteīniem izmanto Triton X-114, ļaujot proteīniem saglabāt savu funkciju (Bordier 1981, Aisa and Pabst 1990). Ir veikti pētījumi un aprakstītas arī vienas no antibiotikām – polimiksīna B – spējas piesaistīties pie lipīda A lipopolisaharīda kompleksā un neitralizēt LPS endotoksisko ietekmi (Morrison and Jacobs 1976, Jacobs and Morrison 1997, Niemetz and Morrison 1997). Izmanto arī polimiksīna B imobilizācijas šķiedru kolonnu hemoperfūziju (PMX), kas efektīvi aizvāc endotoksīnu pacientos ar septisko šoku (Sugira 2015).

2. MATERIĀLI UN METODEDES

2.1. MATERIĀLI

2.1.1. Šūnu kultūras

Darbā izmantoja no divpadsmit veselu donoru perifērajām asinīm izdalītu mononukleāro šūnu frakciju. Asins paraugi iegūti ar pacientu piekrišanu saskaņā ar LU Eksperimentālā klīniskā institūta ētikas komitejas atļauju. Perifēro asiņu paraugu iegūšanai punktēja elkoņa vēnu, savākšanai izmantoja *Vacutest* (Kima, Itālija) stobriņus ar antikoagulantu K₂EDTA.

Darbā izmantoja cilvēka primāros dermas fibroblastus sestajā un septītajā pasāžā, kas iegūti no LU Bioanalītisko un biodozimetrijas metožu laboratorijas šūnu bankas.

2.1.2. *Penicillium lanoso-viride* glikoproteīnu frakcijas

Darbā izmantotās glikoproteīnu frakcijas iegūtas no AMP dezamināzes prozducenta *Penicillium lanoso-viride* celma 8D (Николаева 1982). Izmantoja divas glikoproteīnu frakcijas (1. un 9.) ar atšķirīgu proteīnu koncentrāciju (attiecīgi 114 μg/mL un 375 μg/mL) un enzimatisko aktivitāti (attiecīgi 0,55 U/mL un 2,20 U/mL). Abas darbā izmantotās glikoproteīnu frakcijas saņemtas no LU Bioloģijas fakultātes Mikrobioloģijas un biotehnoloģijas katedras, kur tās izdalītas gēlfiltrācijas ceļā.

2.1.3. Kultivēšanas barotnes, ķīmikālijas, reaģenti, reaģentu komplekti

1. tabula

Šūnu kultivēšanas barotnes, piedevas, augšanas faktori, reaģenti un buferšķīdumi.

Table 1

Cell cultivation media, supplements, growth factors, reagents and buffer solutions.

Nosaukums	Ražotājs	Ražotājvalsts
VLE Dulbecco's MEM (<i>Modified Eagle Medium</i>) ar pievienotu NaHCO ₃ (3,7 g/L); D-glikozi (4,5 g/L); Stabilu glutamīnu; Na-piruvātu	Merck Millipore	Vācija
Fetālais liellopa serums (FBS, <i>Fetal Bovine Serum</i>)	Invitrogen	ASV
Penicilīna un streptomicīna maisījums (100 U/mL un 100 µg/mL)	Invitrogen	ASV
Tripsīns/EDTA (0,25%)	Invitrogen	ASV
Fosfāta sāļu buferšķīdums (PBS, <i>Phosphate Buffered Saline</i>) (pH 7,4)	Life Technologies	ASV
Lipopolisaharīds (LPS)	Sigma-Aldrich	Vācija
Lentināns	Elicityl	Francija
Polimiksīna B sulfāta sāls	Sigma-Aldrich	Vācija

2. tabula
 Ķīmiskie reaģenti.
 Table 2
 Chemical reagents.

Nosaukums	Ražotājs	Ražotājvalsts
NaCl (0,9%)	B. Braun	Vācija
Tween 20	Merck Schuchardt OHG	Vācija
Liellopu seruma albumīns (BSA, <i>Bovine Serum Albumin</i>)	Sigma	ASV
Etanols (96%)	Jaunpagasts Pluss	Latvija
H ₂ O-DEPC (no nukleāzēm brīvs H ₂ O) #R0601	Fermentas	Lietuva
Fikols (Ficoll-Paque)	Sigma-Aldrich	Vācija
Heparīna nātrija sāls	Panpharma	Francija
0,05 M KH ₂ PO ₄ buferis	Sigma-Aldrich	Vācija
Adenoīna 5'-monofosfāta nātrija sāls	Sigma-Aldrich	Vācija
25% HClO ₄	Sigma-Aldrich	Vācija

Nosaukums	Ražotājs	Ražotājvalsts
<p>Cilvēka IL-6 ELISA komplekts #D6050: Peles anti-cilvēka IL-6 saistīšanas antivielas (360 µg/mL); Kazas anti-cilvēka IL-6 detekcijas antivielas (biotinilēta) (36µg/mL); Standarts: rekombinants cilvēka IL-6 (110 ng/mL); Stabilizēts H₂O₂ (#895000); Stabilizēts tetrametilbenzidīns (#895001); Streptavidīns-HRP; 2 N H₂SO₄</p>	R&D Systems	ASV
<p>Cilvēka TNF-α ELISA komplekts #DY210 Peles anti-cilvēka TNF-α saistīšanas antivielas (180 µg/mL); Kazas anti-cilvēka TNF-α detekcijas antivielas (biotinilēta) (18 µg/mL); Standarts: rekombinants cilvēka TNF-α (110 ng/mL); Stabilizēts H₂O₂ (#895000); Stabilizēts tetrametilbenzidīns (#895001); Streptavidīns-HRP; 2 N H₂SO₄</p>	R&D Systems	ASV
<p>EndoTrap® HD endotoksīna attīrīšana (#321063): Līdzsvarošanas buferis; Reģenerācijas buferis; Uzglabāšanas buferis</p>	Hyglos	Vācija
<p>ToxinSensor™ hromogēnā LAL endotoksīna pārbaude (#L00350): LAL reaģenta ūdens; LAL (<i>limulus amoebocyte lysate</i>); <i>E. coli</i> endotoksīna standarts; Hromogēnais substrāts; Buferis S krāsu stabilizatoram #1; Krāsu stabilizators #1; Krāsu stabilizators #2; Krāsu stabilizators #3</p>	GenScript	ASV

2.1.4. Laboratorijas iekārtas

4. tabula

Laboratorijas iekārtas.

Table 4

Laboratory equipment.

Nosaukums	Ražotājs	Ražotājvalsts
II klases bioloģiskās drošības skapis – laminārs	Kojair	Somija
CO ₂ inkubators	Binder	Vācija
Centrifūga Hettich Universal 320R	DJB Labcare	Lielbritānija
Centrifūga/ vortekss FV-2400	Biosan	Latvija
Mikrocentrifūga 5417R	Eppendorf	Vācija
Gaismas invertmikroskops	Zeiss	Vācija
Mikroplašu spektrofotometrs ASYS Expert Plus	Biochrom LTD	Lielbritānija
Spektrofotometrs NanoDrop 2000c	Thermo Scientific	ASV
Velkmes skapis	Porsa	Krievija
Ultrazemas temperatūras saldētava (-80° C)	Sanyo	Japāna
Plašu kratītājs	Biosan	Latvija
Analītiskie svāri	Sartorius	Vācija
Pipetēšanas palīgs seroloģiskajām pipetēm	Capp	Dānija
Automātiskās mikropipetes (0,2-2 µL; 2-20 µL; 20-100 µL; 200-1000 µL)	Boeco	Vācija
Neubauera hemocitometrs (0,0025 mm ²) ar segstikliņu	Marienfeld	Vācija
Jonu ierīce JB-3	Eiko	Japāna
Skenējošais elektronmikroskops	Jeol	Japāna
Vertex 70 FTIR spektrometrs ar HTS-XT mikroplašu lasītāju	Bruker Optics	Vācija

2.1.5. Laboratorijas materiāli

5. tabula

Laboratorijas materiāli.

Table 5

Laboratory tools.

Nosaukums	Ražotājs	Ražotājvalsts
6-lauciņu šūnu kultivēšanas plates (9,5 cm ² kultivēšanas virsma)	Sarstedt	Vācija
24-lauciņu šūnu kultivēšanas plates (1,9 cm ² kultivēšanas virsma)	Sarstedt	Vācija
24-lauciņu Corning® Costar® šūnu kultivēšanas plates (1,9 cm ² kultivēšanas virsma)	Sigma-Aldrich	Vācija
96-lauciņu ELISA plates	Sarstedt	Vācija
Adhezīvas plēves 96-lauciņu platēm	Sarstedt	ASV
Graduētas polipropilēna reakcijas mēģenes ar konisku galu un vāciņu (0,2 mL; 1,5 mL; 2 mL)	Sarstedt	Vācija
Graduēti polipropilēna centrifugēšanas stobriņi ar konisku galu un aizskrūvējamu vāciņu (15 un 50 mL)	Sarstedt	Vācija
Graduētas seroloģiskās pipetes (2 mL; 5 mL; 10 mL; 25 mL)	Sarstedt	Vācija
Mikropipešu uzgaļi	Sarstedt	Vācija
No endotoksīna brīvi mikropipešu uzgaļi	Hyglos	Vācija
Šļirces bez adatām sterilizēšanai (50 mL)	BD	ASV
Membrānu filtri (poru lielums 0,45 μm)	Kornik	Polija
Centrifugēšanas stobriņu (15 un 50 mL) statīvi	Sarstedt	Vācija
Reakcijas mēģeņu (1,5 un 2 mL) turētāji	Sarstedt	Vācija
Mērcilindri (25 mL; 1000 mL)	Vitlab	Vācija
Slide-A-Lyzer MINI dialīzes ierīces a celulozes membrānu, 10K MWCO (0,5 mL)	Thermo Scientific	ASV
EndoTrap HD endotoksīna attīrīšanas kolonnas (1 mL)	Hyglos	Vācija

2.1.6. Programmatūra

Datu statistiskās apstrādes programma – GraphPad Prism 7.

Infrasarkanās spektroskopijas programma – Opus 6.5.

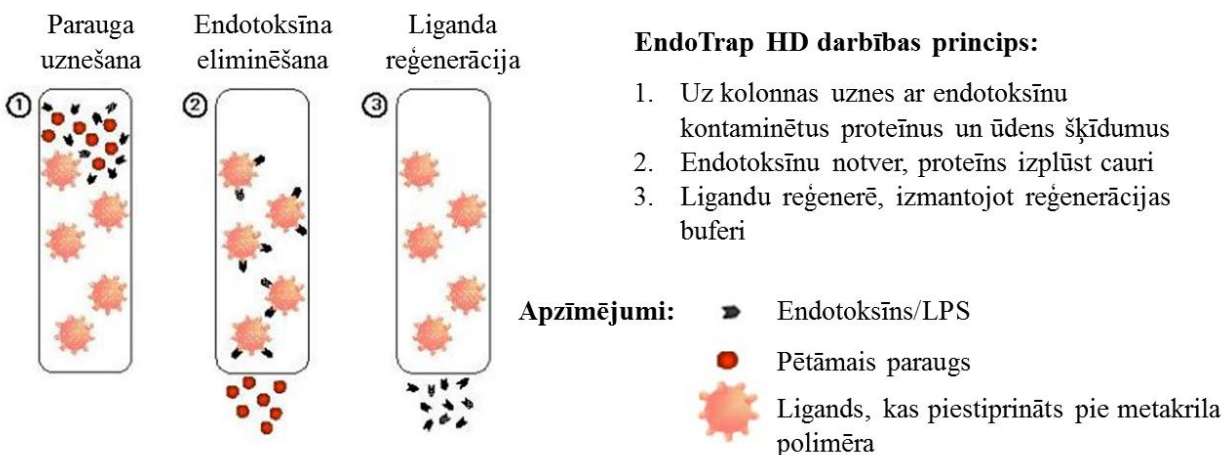
Proteīnu koncentrācijas noteikšanas programma – NanoDrop 2000.

Attēlu apstrādes programma – Adobe Photoshop CS3.

2.2. METODES

2.2.1. Endotoksīna eliminēšana no AMPD frakcijām

Lai novērstu potenciālo AMPD piesārņojumu ar lipopolisaharīdu, izmantoja EndoTrap HD attīrīšanas kolonnas (2. attēls). Šī metode ir balstīta uz hidrofilu, izmēros stabilu afinitātes matricu ar labām spiediena un plūsmas īpašībām.



2. attēls. EndoTrap HD attīrīšanas kolonnas darbības princips (attēls pārveidots pēc EndoTrap HD ražotāja protokola).

Figure 2. Principle of EndoTrap HD elimination columns (figure modified from the protocol of EndoTrap HD manufacturer).

Metodi veica pēc EndoTrap HD reaģentu komplekta ražotāja *Hyglos* rekomendācijām.

Sagatavoja attīrīšanas kolonnu, iztecinot caur to glabāšanas (*storage*) šķīdumu. Kolonnu piepildīja ar 3 mL reģenerācijas bufera un ļāva tam iztecēt caur kolonnu. Šo soli atkārtoja vēlreiz. Kolonnā iepildīja 3 mL līdzsvarošanas bufera (0,5 M NaCl, 0,1 M CaCl₂/PBS) un ļāva tam iztecēt caur kolonnu. Šo soli atkārtoja vēlreiz.

Kolonnā iepildīja 3 mL AMPD un divās 1,5 mL reakcijas mēģenēs savāca izdalītās frakcijas. Tā kā pirmajam caur kolonnu iztecējušajam AMPD tilpumam raksturīga augstāka liganda koncentrācija, nekā pārējam attīrītajam paraugam, pirmo frakciju savāca atsevišķi. Lai izdalītu visu paraugu, kolonnai pievienoja vēl 1 mL līdzsvarošanas bufera, ļāva tam iztecēt cauri, un frakciju savāca.

Tālāk ar spektrofotometru NanoDrop 2000c nomērīja proteīnu daudzumu attīrītajās AMPD frakcijās, un tās uzglabāja +4°C.

2.2.2. Endotoksīna līmeņa noteikšana

Lai noteiktu endotoksīnu līmeni dabīgajos imūnmodulatoros, izmantoja *ToxinSensor* hromogēno LAL (*limulus ameobocyte lysate*) endotoksīnu kvantitatīvās detekcijas komerciāli pieejamo reaģentu komplektu, un metodi veica pēc ražotāja *GenScript* rekomendācijām.

Pagatavoja endotoksīna standartšķīdumus diapazonā no 0,1 līdz 1,0 EU/mL. No endotoksīna brīvās reakcijas mēģenēs iepildīja 100 µL standartšķīdumus, pētāmos paraugus – AMPD, caur kolonnu attīrītu AMPD, LPS, lentinānu – un LAL reaģenta ūdeni un 30 sekundes aktīvi samaisīja. Katrai no mēģenēm pievienoja 100 µL LAL, tās aizvākoja un viegli samaisīja. Pēc tam paraugus 8-16 minūtes inkubēja 37°C.

Pēc inkubācijas katrā mēģenē pievienoja 100 µL hromogēnā substrāta šķīdumu un viegli samaisīja. Paraugus sešas minūtes inkubēja 37°C. Mēģenēm pievienoja 500 µL stop šķīdumu jeb krāsu stabilizatoru #1 un viegli samaisīja. Pēc tam pievienoja 500 µL krāsu stabilizatoru #2 un labi samaisīja. Kā pēdējo pievienoja 500 µL krāsu stabilizatoru #3 un reakcijas mēģeņu saturu maisīja trīs sekundes. Nolasīja katras reakcijas absorbciju pie 545 nm.

2.2.3. AMPD enzīmātiskās aktivitātes noteikšana

AMPD enzīmātisko aktivitāti noteica spektrofotometriski (Николаева 1982).

Metode pamatā ir adenozīna un inozīna monofostāta (AMP un IMP) absorbcijas starpība pie 240 un 265 nm viļņa garuma.

Reakcijas maisījumus 0,4 mL tilpumā pagatavoja no 0,1 mL analizējamās frakcijas, 0,25 mL 0,05 M KH₂PO₄ bufera un 0,05 ml substrāta – AMP (7,8 mg/mL). Kā substrāta pašdalīšanās kontroli izmantoja reakcijas maisījumu, kas saturēja 0,35 mL 0,05 M KH₂PO₄ bufera un 0,05 ml AMP (7,8 mg/mL).

Maisījumus 1-2 minūtes inkubēja 37°C, reakciju apstādināja ar 0,1 mL 25% HClO₄. Mērīja tās optisko blīvumu pie 240 un 265 nm viļņa garuma. Enzīmātisko aktivitāti (U/ml) aprēķināja,

izmantojot kalibrācijas līkni. Viena vienība (1 U) enzīma aktivitātes bija vienāda ar AMPD daudzumu, kas dezaminē 1,0 μmol 5'AMP par 5' IMP vienā minūtē, 37°C, pH 6. Enzīma specifiskā aktivitāte – vienības uz 1 mg proteīna (U/mg proteīna).

2.2.4. AMPD dialīze pret destilētu H₂O

Lai izvairītos no fosfāta sāļu kristālu klātbūtnes AMPD skenējošās elektronmikroskopijas attēlos un būtu iespējams precīzi novērtēt glikoproteīna frakcijas struktūru palielinājumā, AMPD, kas šķīdināta fosfāta sāļu buferšķīdumā (PBS), dializēja pret destilētu ūdeni.

Metodi ar dažām modifikācijām veica pēc ražotāja *Thermo Scientific* rekomendācijām.

200 μL frakcijas iepildīja polipropilēna mēģenē ar celulozes membrānu, un to aizvākoja. Mēģeni ievietoja turētājā tā, lai tā turētos 0,5 L destilēta ūdens. Trauku ar ūdeni novietoja uz magnētiskā maisītāja +7°C temperatūrā. Pēc 2-3 stundām destilēto ūdeni nomainīja, un iesāko procesu turpināja 16-18 stundas. Pēc tam mēģeni izņēma no ūdens un nodializēto paraugu pārnesa sterilā 1,5 mL reakcijas mēģenē un uzglabāja +4°C.

2.2.5. Furjē transformācijas infrasarkanā spektroskopija

Furjē transformācijas infrasarkanā spektroskopiju veica, lai novērtētu, vai infrasarkanajā spektrā uzskatāmi redzams, vai AMPD glikoproteīnu frakcijās ir piesārņojums ar endotoksīnu. Analīzes veica LU Mikrobioloģijas un biotehnoloģijas institūtā.

AMPD un LPS šķīdros paraugus homogenizēja ar kratītāja palīdzību. Ar automātisko pipeti uz 384-lauciņu silikona plates mērīšanai paredzētajā vietā uznesa 5-10 μL šķīduma. Paraugu 20 minūtes žāvēja temperatūrā, kas zemāka par 50°C, līdz no parauga iztvaikoja viss liekais mitrums. Plati ar nožuvušajiem paraugiem ievietoja HTS-XT iekārtā, un paraugu infrasarkanās absorbcijas spektrus reģistrēja, izmantojot OPUS Lab programmu. Pēc paraugu spektru reģistrācijas, izmantojot programmu OPUS 6.5, tiem veica bāzes līnijas korekciju un vektoru normalizāciju, lai visus spektrus izlīdzinātu uz vienas pamata līnijas. Veica vizuālo spektru analīzi, lai noteiktu līdzības un atšķirības starp paraugu spektriem, kas attiecīgi norāda uz līdzībām un atšķirībām paraugos.

Spektrus pierakstīja, izmantojot mikroplašu lasītāju, robežās no 4000 līdz 600 cm^{-1} ar izšķirtspēju 4 cm^{-1} . Veica vismaz trīs atkārtojumus, kur katrs no atkārtojumiem bija vidējais no 64 atsevišķiem mērījumiem.

2.2.6. Skenējošā elektronmikroskopija

Lai vizualizētu AMPD struktūru, noskaidrotu, vai glikoproteīnu frakciju sastāvā ir kādi agregāti, un salīdzinātu to ar LPS un standarta proteīnu liellopa seruma albumību (BSA, *bovine serum albumine*) veica skenējošo elektronmikroskopiju. Paraugu elektronmikroskopija tika veikta LU Mikrobioloģijas un biotehnoloģijas institūtā.

10 μL parauga 1,5 stundu laikā izžāvēja uz alumīnija folijas paliktņa 30°C temperatūrā. Pēc tam paraugus apputināja ar zeltu jonu ierīcē un novēroja uz skenējoša elektronmikroskopa pie 20 kV.

2.2.7. Mononukleāro šūnu izdalīšana no donoru asinīm

Asins paraugus sadalīja divās vienādās daļās un iepildīja 50 mL centrifugēšanas stobriņos. Katram stobriņam pievienoja 0,9% NaCl, kas saturēja 10 U/mL heparīna, tā, lai kopējais atšķaidīto asiņu tilpums būtu 30 mL. Ar seroloģisko pipeti lēnām uzslāņoja atšķaidīto asiņu paraugus uz 15 mL Ficoll-Paque blīvuma gradienta centrifugēšanas šķīduma. Paraugus 20 minūtes centrifugēja ar ātrumu 2200 RPM pie izslēgta centrifūgas bremsēšanas režīma. Atsūca un jaunā 50 mL centrifugēšanas stobriņā pārnesa mononukleāro šūnu slāni. Lai šūnas attīrītu no Ficoll-Paque šķīduma, mononukleārajām šūnām pievienoja 0,9% NaCl (+10 U/mL heparīna) līdz 45 mL tilpumam. Stobriņu viegli saskalināja un 20 minūtes centrifugēja ar ātrumu 2200 RPM. Pēc tam NaCl šķīdumu atsūca, atstājot stobriņā 1 mL šķīduma, kur resuspendēja šūnas. Atkārtoti pievienoja NaCl (+10 U/mL heparīna) līdz 45 mL tilpumam, stobriņu viegli saskalināja un centrifugēja 20 minūtes ar ātrumu 1600 RPM. Atsūca NaCl šķīdumu, un šūnas suspendēja 10% FBS saturošā DMEM šūnu kultivēšanas barotnē (S10). Noteica šūnu skaitu paraugā, skaitot uz Neubauera hemocitometra, un aprēķināja šūnu tilpumu, ko nepieciešams uzsēt uz katra šūnu kultivēšanas plates lauciņa.

2.2.8. Šūnu skaitīšana

No šūnu suspensijas uz Neubauera hemocitometra uznesa 10 μL suspensijas un gaismas invertmikroskopā hemocitometra režģa vidējā kvadrātā 25 lauciņos saskaitīja šūnas. Pēc tam aprēķināja šūnu skaitu 1 mL, izmantojot formulu:

$$\text{Šūnu skaits 1 mL} = \text{kopējais šūnu skaits} \times \text{atšķaidījums} \times 10^4$$

2.2.9. Mononukleāro šūnu kultivēšana monoslānī dabīgu imūnmodulatoru klātbūtnē

Pēc saskaitīšanas mononukleārās šūnas izsēja uz 6- vai 24-lauciņu šūnu kultivēšanas platēm (attiecīgi 9,5 cm^2 vai 1,9 cm^2 kultivēšanas virsmas laukums). Šūnas izsēja koncentrācijā 1-2 miljoni šūnu uz 1 cm^2 kultivēšanas virsmas. Plates ievietoja CO_2 inkubatorā 37°C temperatūrā un 5% CO_2 atmosfērā. Lai novērtētu dabīgo imūnmodulatoru ietekmi uz mononukleārajām šūnām, pēc 16-18 stundām atsūca šūnu kultivēšanas barotni, šūnas 2-3 reizes skaloja ar 1x PBS un katram lauciņam pievienoja 1 mL jaunu barotni, kas saturēja vai nu AMPD koncentrācijā 10 $\mu\text{g/mL}$, vai LPS koncentrācija 1 $\mu\text{g/mL}$, vai lentinānu koncentrācijā 10 $\mu\text{g/mL}$. Kā kontroli izmantoja šūnu kultivēšanas barotni bez pievienotiem imūnmodulatoriem. Pēc attiecīgi četrām un 24 stundām šūnu kultivēšanas barotnes savāca dupletos pa 100-500 μL no katra varianta un iepildīja 0,5 vai 1,5 mL reakcijas mēģenēs, un sasaldēja -80°C.

2.2.10. Baktēriju endotoksīna neitralizēšana

Lai novērtētu AMPD potenciālo piesārņojumu ar lipopolisaharīdu, mononukleārās šūnas kultivēja 24-lauciņu platēs dabīgo imūnmodulatoru klātbūtnē, kā aprakstīts 2.2.9. apakšnodaļā, attiecīgi gan kontroles variantam, gan katrai no analizētajām vielām pievienojot polimiksīnu B (PMB) koncentrācijā 25 $\mu\text{g/mL}$. Plates četras stundas inkubēja CO_2 inkubatorā 37°C temperatūrā un 5% CO_2 atmosfērā. Pēc tam šūnu kultivēšanas vides savāca dupletos pa 500 μL no katra varianta un iepildīja 1,5 mL reakcijas mēģenēs un sasaldēja -80°C.

Endotoksīnu neitralizēšanas eksperimentu veica arī pilnu asiņu paraugos. 1,5 mL reakcijas mēģenēs iepildīja 1 mL asiņu, kam pievienoja vai nu AMPD koncentrācijā 10 $\mu\text{g/mL}$, vai LPS koncentrācija 1 $\mu\text{g/mL}$, vai lentinānu koncentrācijā 10 $\mu\text{g/mL}$, kā arī šīs vielas kombinācijā ar

polimiksīnu B koncentrācijā (25 µg/mL). Asiņu paraugus ievietoja CO₂ inkubatorā (37°C temperatūra, 5% CO₂ atmosfēra). Pēc četrām stundām tos 10 minūtes centrifugēja ar ātrumu 1000 RPM. Tad atsūca plazmu, un pārnese to jaunā 1,5 mL reakcijas mēģenē un sasaldēja -80°C.

2.2.11. Cilvēka dermas fibroblastu kultivēšana

Audu kultivēšanas flakonā ar 75 cm² virsmas laukumu iepildīja daļu S10 barotnes, tādējādi izvairoties no virsmas sprauguma nelabvēlīgās ietekmes, un izsēja šūnas koncentrācijā 10⁴ šūnas uz 1 cm² virsmas. Pievienoja atlikušo S10 barotnes tilpumu. Flakonu ievietoja CO₂ inkubatorā 37°C temperatūrā un 5% CO₂ atmosfērā. Šūnas kultivēja, ik pēc trīs dienām mainot S10 barotni, līdz tās sasniedza 90% konfluenci. Pēc tam šūnas pārsēja, kā aprakstīts 2.2.12. apakšnodaļā, šūnas uzsējot uz 24-lauciņu šūnu kultivēšanas platēm ar koncentrāciju 800 šūnas/cm². Plates inkubēja 37°C temperatūrā un 5% CO₂ atmosfērā.

2.2.12. Šūnu pārsēšana

Šūnas pārsēja pie 90% konfluences. Atsūca šūnu kultivēšanas barotni un audu kultivēšanas flakonu skaloja ar vienu tilpumu 1x PBS. Šūnām pievienoja 2 mL 0,25% tripsīna/EDTA un piecas minūtes inkubēja 37°C temperatūrā 5% CO₂ koncentrācijā. Šūnu atdalīšanos no virsmas monitorēja gaismas invertmikroskopā. Kad šūnas bija atdalījušās no audu kultivēšanas flakona virsmas, 0,25% tripsīnu/EDTA inaktivēja ar diviem tilpumiem 20% FBS/PBS. Flakona saturu pārnese 15 mL centrifugēšanas stobriņā. Flakonu skaloja ar vienu tilpumu 1x PBS, un saturu pārnese centrifugēšanas stobiņā. Stobriņos esošās šūnas piecas minūtes centrifugēja ar ātrumu 1500 RPM. Atsūca supernatantu, un šūnas resuspendēja 1 mL šūnu kultivēšanas barotnes. Pēc tam šūnas saskaitīja, kā aprakstīts 2.2.8. apakšnodaļā, un uzsēja nepieciešamo daudzumu uz šūnu kultivēšanas plates.

2.2.13. Dermas fibroblastu kultivēšana dabīgu imūnmodulatoru, kā arī ar šiem imūnmodulatoriem stimulētu mononukleāro šūnu kultivēšanas barotņu klātbūtnē

16-24 stundas pēc dermas fibroblastu uzsēšanas, šūnām sasniedzot vismaz 30% konfluenci, uz 24-lauciņu plates šūnām pievienoja dabīgos imūnmodulatorus – attiecīgi vai nu AMPD (10 µg/mL), vai LPS (1 µg/mL) vai lentinānu (10 µg/mL) –, vai dabīgos imūnmodulatorus

kombinācijā ar polimiksīnu B (25 µg/mL), vai šūnu kultivēšanas barotnes no 2.2.9. apakšnodaļā aprakstītā eksperimenta. Vispirms atsūca šūnu kultivēšanas barotni, katru lauciņu skaloja ar 1 mL 1x PBS un pievienoja dabīgos imūnmodulatorus vai mononukleāro šūnu kondicionētās kultivēšanas barotnes. Lai šūnu kultivēšanas barotnes atšķaidījums un kopējais tilpums būtu vienāds, lauciņiem pievienoja atbilstošu tilpumu 0,9% NaCl. Katram no variantiem bija divi paralēli atkārtojumi. Kā kontroli izmantoja S10 barotni bez pievienotām papildu vielām.

Šūnas monitorēja gaismas invertmikroskopā un uzņēma fotoattēlus 100x palielinājumā. Plates ievietoja CO₂ inkubatorā 37°C temperatūrā un 5% CO₂ atmosfērā, un pēc 48 stundām atkārtoti monitorēja gaismas invertmikroskopā 100x palielinājumā un uzņēma fotoattēlus, vizuāli novērtējot šūnu skaita izmaiņas.

2.2.14. Iekaisuma citokīnu sekrēcijas izmaiņu analīze

Ar enzīmiem saistīto imunosorbento pārbaudi (ELISA, *Enzyme-linked immunosorbent assay*) novērtēja iekaisuma citokīnu TNF- α un IL-6 koncentrācijas izmaiņas vidē, šūnas kultivējot dabīgu imūnmodulatoru klātbūtnē. Analizēja cilvēka perifēro asiņu mononukleāro šūnu (PBMC) kultivēšanas barotnes, kas savāktas četras un 24 stundas pēc imūnmodulatoru pievienošanas, un kontroles paraugus bez pievienotām papildu vielām.

Metodi veica pēc reaģentu komplekta ražotāja *R&D Systems* rekomendācijām.

Saistīšanas antivielu bez nesējproteīna atšķaidīja ar 0,1% BSA, 0,05% Tween20/PBS saturošu buferi līdz norādītajai koncentrācijai un iepildīja 100 µL katrā no 96-lauciņu ELISA plates. Plati pārklāja ar adhezīvo plēvi un pa nakti inkubēja istabas temperatūrā. Pēc inkubācijas nolēja lieko saistīšanas antivielas šķīdumu un katru lauciņu trīs reizes mazgāja ar 400 µL mazgāšanas buferi (0,05% Tween 20/PBS).

Plati bloķēja, katram lauciņam pievienojot 300 µL bloķēšanas buferšķīdumu (1% BSA/PBS). Tad to pārklāja ar adhezīvo plēvi un vismaz vienu stundu inkubēja istabas temperatūrā. Plati mazgāja, kā aprakstīts iepriekšējā rindkopā.

Katrā no plates lauciņiem (duplikātos) iepildīja 100 µL parauga vai proteīnu standartus (1000 – 31,25 pg/mL), kas attiecīgi atšķaidīti ar 0,1% BSA, 0,05% Tween20/PBS buferi. Kā

kontroli izmantoja attiecīgo šūnu kultivēšanas barotni. Plati pārklāja ar adhezīvo plēvi un divas stundas inkubēja istabas temperatūrā. Atkārtoja plates mazgāšanu.

Katram lauciņam pievienoja 100 μL detekcijas antivielu, kas ar 0,1% BSA, 0,05% Tween20/PBS atšķaidīta līdz norādītajai koncentrācijai. Plati pārklāja ar adhezīvo plēvi un divas stundas inkubēja istabas temperatūrā, plati atkal mazgājot.

Katram lauciņam pievienoja 100 μL ar HRP saistītu streptavidīnu, kas attiecībā 1:40 atšķaidīts ar 0,1% BSA, 0,05% Tween20/PBS. Plati pārklāja ar adhezīvo plēvi un foliju, pasargājot to no gaismas, un 20 minūtes inkubēja istabas temperatūrā. Atkārtoja plates mazgāšanu.

Katram lauciņam pievienoja 100 μL substrāta šķīduma (1:1, H_2O_2 : tetrametilbenzidīns) un 20 minūtes inkubēja istabas temperatūrā, pirms tam plati pārklājot ar adhezīvo plēvi un foliju. Pēc inkubācijas krāsu reakciju apstādināja, katram lauciņam pievienojot 50 μL 2N H_2SO_4 . Plati viegli sašūpoja, lai nodrošinātu vielu vienmērīgu sajaukšanos.

Noteica proteīnu koncentrāciju, izmantojot mikroplašu spektrofotometru un nolasot katra lauciņa optisko blīvumu pie gaismas viļņu garuma 450 nm. Lai mērījumi būtu precīzi, gaismas viļņu korekciju noregulēja uz 540 vai 570 nm.

3. REZULTĀTI UN DISKUSIJA

3.1. AMPD FRAKCIJU ATTĪRĪŠANA NO IESPĒJĀMĀ ENDOTOKSĪNA PIESĀRŅOJUMA

EndoTrap HD attīršanas kolonnas izmantoja, lai eliminētu potenciālo AMPD piesārņojumu ar lipopolisaharīdu. Attīrīja divas glikoproteīna frakcijas ar AMPD aktivitāti (1. un 9. frakciju) un mērīja proteīnu koncentrāciju, enzimatisko un specifisko aktivitāti gan pirms, gan pēc endotoksīna eliminācijas (6. tabula).

6. tabula

Izmaiņas glikoproteīna frakcijas proteīnu koncentrācijā un AMPD enzimatiskajā un specifiskajā aktivitātē pirms un pēc attīršanas no endotoksīna.

Table 6

Changes in the protein concentration of the glycoprotein fractions and enzymatic and specific activity of AMPD before and after the elimination of endotoxin.

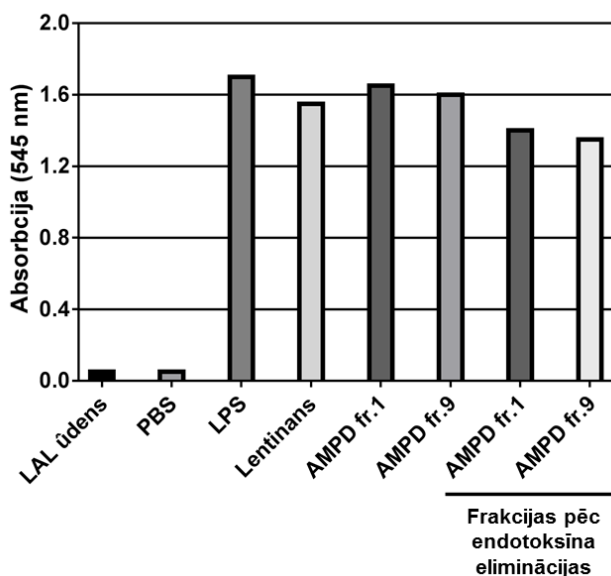
AMPD frakcija	Pirms attīršanas no endotoksīna			Pēc attīršanas no endotoksīna		
	Proteīnu koncentrācija (µg/mL)	Enzimātiskā aktivitāte (U/mL)	Īpatnējā aktivitāte (U/mg)	Proteīnu koncentrācija (µg/mL)	Enzimātiskā aktivitāte (U/mL)	Īpatnējā aktivitāte (U/mg)
1.	114	0,55	4,85	37	0,35	9,46
9.	375	2,20	5,87	154	1,40	9,09

Gan 1., gan 9. AMPD frakcijai pēc apstrādes attīršanas kolonnās proteīnu koncentrācija samazinājusies vidēji 2,5-3 reizes (attiecīgi no 114 µg/mL līdz 37 µg/mL un no 375 µg/mL līdz 154 µg/mL; 6. tabula). Apmēram 1,5 reizes samazinājusies arī glikoproteīna frakciju AMPD enzimatiskā aktivitāte (attiecīgi no 0,55 U/mL uz 0,35 U/mL un no 2,20 U/mL uz 1,40 U/mL). Savukārt īpatnējā aktivitāte, kas norāda uz enzīma tīrību, attīrītajās frakcijās ir aptuveni 1,5-2 reizes augstāka, t.i., 9,46 U/mg un 9,09 U/mg, kamēr pirms endotoksīna eliminācijas ir attiecīgi 4,85 U/mg un 5,87 U/mg. Tas, iespējams, norāda, ka EndoTrap HD kolonna aizvāc ne tikai LPS, bet arī kādus citus piesārņojuma avotus.

Lai gan ražotājs *Hyglos* par reaģentu komplektu raksta, ka proteīni saista konservatīvu reģionu LPS molekulas serdē, iegūtie rezultāti norāda, ka kolonnā esošie ligandi saista arī darbā pētīto glikoproteīnu, ar ko skaidrojams gan attīrīto frakciju proteīnu koncentrācijas, gan enzimatiskās aktivitātes samazinājums. Polisaharīda struktūra *Penicillium lanoso-viride* sintezētajam glikoproteīnam ar AMP dezamināzes aktivitāti detalizēti nav aprakstīta, bet var secināt, ka LPS un AMPD glikozilētajām daļām līdzība ir pietiekami liela, lai endotoksīna eliminācija daļēji būtu saistīta ar AMPD glikoproteīna daudzuma un aktivitātes samazināšanos. Citu glikoproteīnu, piemēram, no pelēm iegūtu fibronektīnu, un no rauga izdalītu imūnmodulatoru polisaharīdu-β-glukānu, koncentrācija un aktivitāte pēc attīrīšanas ar EndoTrap HD kolonnu nemainās tādā apjomā kā AMPD preparātiem (Anonīms A 2016).

3.2. ENDOTOKSĪNA RELATĪVAIS DAUDZUMS DABĪGOS IMŪNMODULATOROS

Lai noteiktu, vai pētīto frakciju sastāvā atrodams arī baktēriju endotoksīns, ar ToxinSensor hromogēno faktoru C noteica lipopolisaharīda relatīvo daudzumu. Endotoksīna daudzumu noteica arī darbā izmantotā lentināna paraugā. Kā kontroli izmantoja gan reaģentu komplektā iekļauto LAL ūdeni, gan PBS, kurā šķīdinātas glikoproteīna frakcijas.



3. attēls. Kolorimetriskā LAL testa uzrādītais relatīvais endotoksīna daudzums dabīgos imūnmodulatoros.

Figure 3. Relative amount of endotoxin in natural immunomodulators as detected by colorimetric LAL assay.

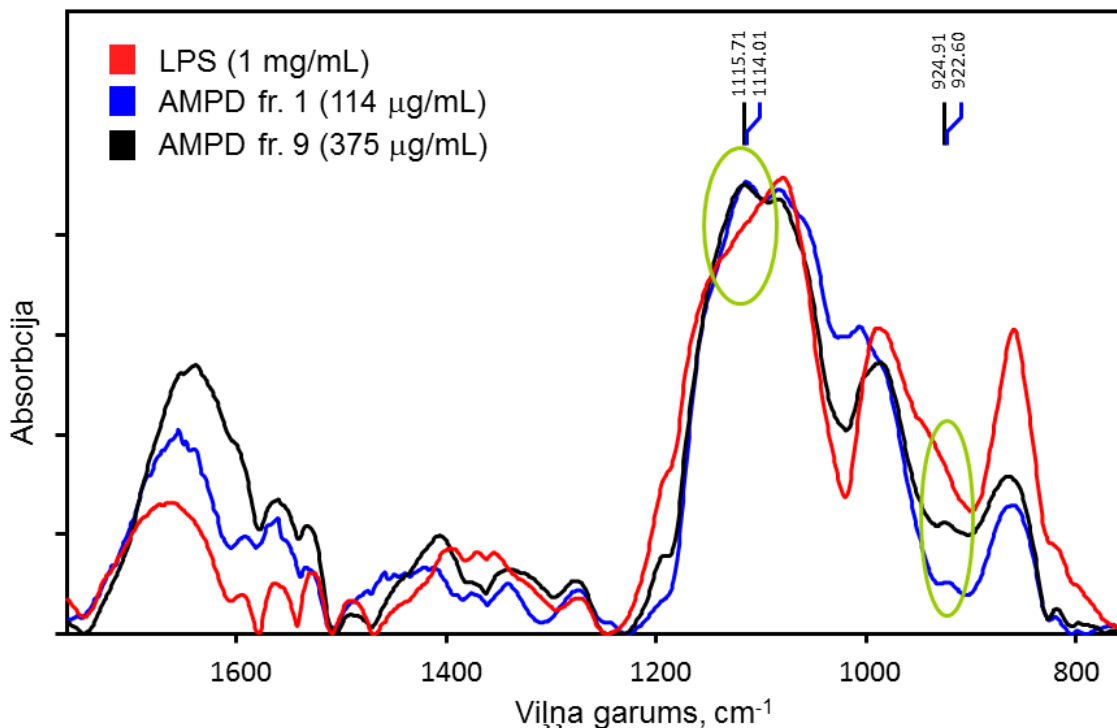
Iegūtie rezultāti rāda, ka visos pētītajos paraugos, izņemot kontroli, endotoksīna daudzums ir līdzīgs, absorbcijai pie 545 nm esot no 1,35 (AMPD 9. frakcija pēc endotoksīna eliminācijas) līdz 1,70 (LPS; 3. attēls). Tā kā lentināna paraugā esošais endotoksīna relatīvais daudzums (1,55) ir tuvs paša lipopolisaharīda paraugā esošajam, domājams, ka izmantotā metode endotoksīna noteikšanai dod arī nespecifisku, kļūdaini pozitīvu rezultātu ar citiem glikoproteīniem un polisaharīdiem. Kontroles eksperimentos izmantotais lentināns ir komerciāli iegādāts produkts (*Elicityl*, Francija), kas atbilstoši ražotāja analītiskajam aprakstam ir attīrīts un brīvs no LPS piesārņojuma. Lai gan LAL metode ne vienmēr ir precīza (Cohen 2000), tomēr kontroles testos (ūdens un PBS) endotoksīna relatīvais daudzums ir tuvs nullei. Līdz ar to var secināt, ka mērījumu gaitā paraugu kontaminācija ar baktēriju endotoksīnu nav notikusi.

Ar EndoTrap HD attīrītajās AMPD frakcijās LAL detektētais endotoksīna līmenis ir tikai nedaudz zemāks nekā apstrādātajās frakcijās, lai gan proteīna un enzīma koncentrācijas pēc apstrādes ir būtiski samazinātas (6. tabula). AMPD un LPS glikozīdiskās daļas struktūras līdzība nedod iespēju izmantot LAL testu, lai kontrolētu AMPD preparāta piesārņojumu ar LPS. Tāpēc tālākajos pētījumos būtu vēlams izmantot uz citiem principiem balstītas metodes, kas spētu diferencēt LPS no glikoproteīnus saturošiem preparātiem, kāds ir AMPD.

3.3. FURJĒ TRANSFORMĀCIJAS INFRASARKANĀ SPEKTROSKOPIJA

Lai salīdzinātu AMPD un LPS strukturālo līdzību un noskaidrotu, vai AMPD frakcijas ir kontaminētas ar endotoksīnu, tika veikta Furjē transformācijas infrasarkanā spektroskopija (FTIR), kas pēc bioloģisko makromolekulu funkcionālo grupu raksturīgajām ķīmiskajām saitēm ļauj identificēt konkrētu savienojumu tipu klātbūtni un relatīvo daudzumu. Absorbcijas spektrus apskatīja LPS 1 mg/mL koncentrācijā un 1. un 9. AMPD frakcijai (114 µg/mL un 372 µg/mL). Lai kvalitatīvi salīdzinātu un noteiktu atšķirības, spektrus normalizēja jeb daļēja mazākās daļās, līdz visiem bija aptuveni viena un tā pati absorbcijas intensitāte.

FTIR jau iepriekš izmantota kā metode, lai raksturotu lipopolisaharīda uzbūvi vai konstatētu tā klātbūtni noteiktos apstākļos (Naumann *et al.* 1989., Parikh and Chorover 2008).



4. attēls. LPS un AMPD infrasarkanās absorbcijas spektri. Sarkanā līnija apzīmē LPS, zilā – AMPD 1. frakcija, melnā – AMPD 9. frakcija. Spektri normalizēti līdz vienādai absorbcijas intensitātei.

Figure 4. Infrared absorption spectra of LPS and AMPD. Red line indicates LPS, blue – AMPD fraction 1, black – AMPD fraction 9. Spectra normalized until equal absorption intensity.

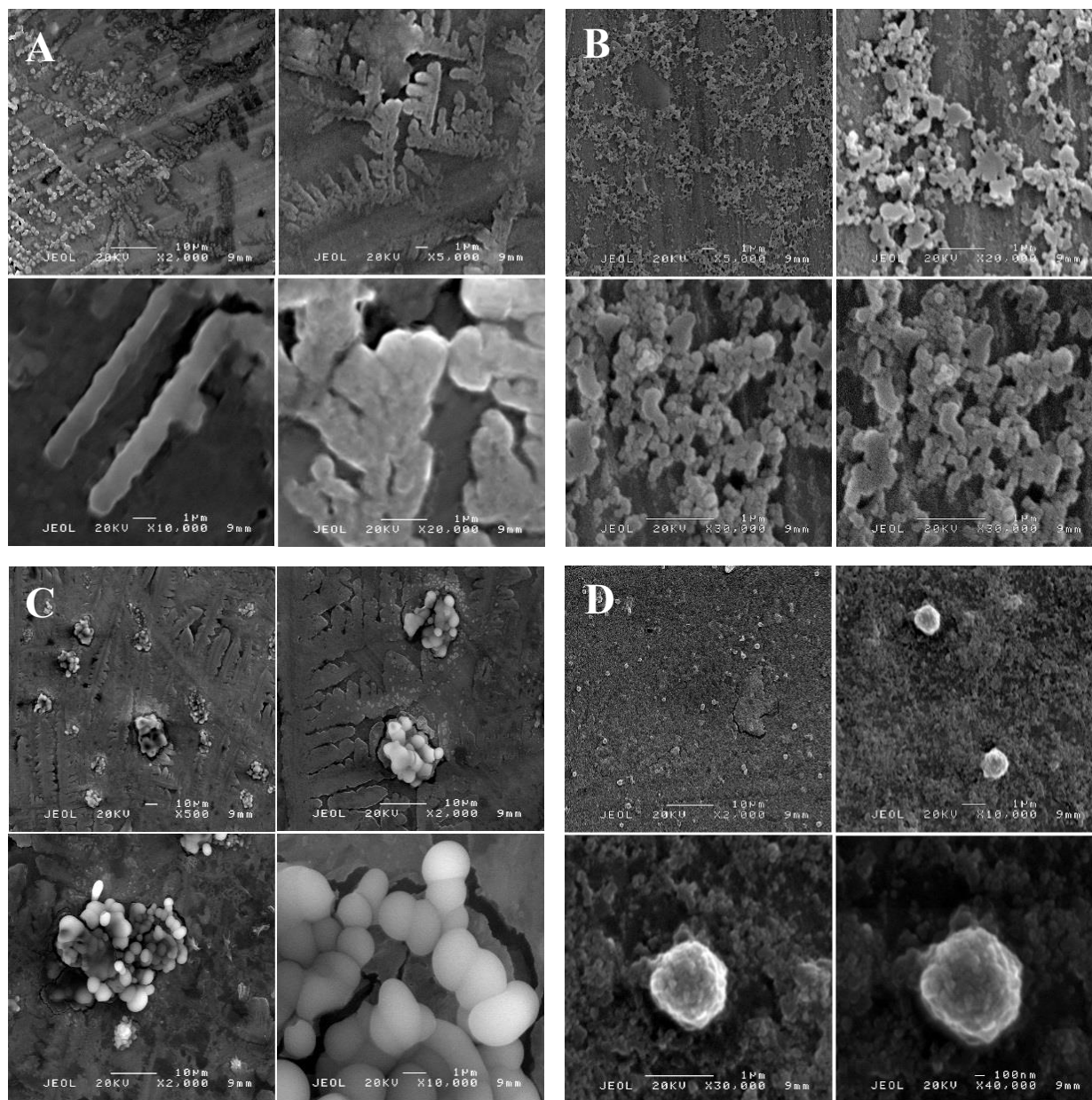
Absorbcijas spektrā redzams, ka abos AMPD paraugos ir glikozīdiskās saites pie aptuveni 1114 cm^{-1} un 923 cm^{-1} , kas nav novērojamas LPS paraugā (4. attēls). Izteiktāk AMPD 1. frakcijai pie $1050\text{--}1040\text{ cm}^{-1}$ redzams pīķis, kas atbilst O-H saitei ogļhidrātos. Tā kā 9. frakcijai ar lielāku proteīnu koncentrāciju, iespējams, vērojama AMPD koncentrācijas atkarīga agregācija, kas maskē saites, veidojot lielākus agregātus.

Kopumā infrasarkanā spektroskopija var sniegt vispārīgu novērtējumu par analizētajiem paraugiem un parādīt atšķirības starp tiem, tomēr augstvērtīga FTIR spektra iegūšanai, izmantojot HTS-XT moduli, paraugiem (t.i., abām AMPD frakcijām) ir pārāk zema koncentrācija, līdz ar to lielākā daļa spektra absorbcijas rodas no PBS, kurā glikoproteīna frakcijas šķīdinātas. Pie darbā izmantotajām glikoproteīna koncentrācijām šī metode nav piemērota AMPD kvalitātes kontrolei, lai novērtētu piesārņojumu ar endotoksīnu.

3.4. SKENĒJOŠĀ ELEKTRONMIKROSKOPIJA

Iepriekš poliakrilamīda gēla elektroforēzes rezultāti rādījuši, ka AMPD sastāv no vairākiem proteīniem. Tā kā glikoproteīnu komplekss ar AMPD aktivitāti gēlfiltrācijas ceļā caur G-200 kolonnu tiek iegūts kā kolonnas brīvā tilpuma eluētā frakcija, var izvirzīt hipotēzi, ka AMPD atrodas kāda proteīnu kompleksa sastāvā (G. Makarenkovas pers. ziņ.). Tāpēc, lai vizualizētu AMPD struktūru un noskaidrotu, vai glikoproteīna frakcijas sastāvā ir kādi agregāti, veica skenējošo elektronmikroskopiju.

Elektronmikroskopā vizualizēja AMPD 1. un 9. frakciju (proteīnu koncentrācija attiecīgi 114 µg/mL un 375 µg/mL; 6. tabula), LPS (1 un 10 µg/mL) un liellopu seruma albumīnu (BSA; 120 µg/mL) kā standarta proteīnu. Visi paraugi sākotnēji bija šķīdināti PBS, tāpēc elektronmikroskopijas attēlos vērojamas fosfāta sāļu kristālu kopas (1. pielikums). Tādēļ AMPD frakcijas dializēja pret destilētu ūdeni savukārt LPS un BSA šķīdināja destilētā ūdenī.



5. attēls. AMPD skenējošās elektronmikroskopijas attēli. A – AMPD 1. frakcija šķīdināta PBS. B – AMPD 1. frakcija dializēta pret destilētu ūdeni. C – AMPD 2. frakcija šķīdināta PBS. D – AMPD 2. frakcija dializēta pret destilētu ūdeni.

Figure 5. Scanning electronmicroscopy images of AMPD. A – AMPD fraction 1 dissolved in PBS. B – AMPD fraction 1 dialyzed in distilled water. C – AMPD fraction 2 dissolved in PBS. D – AMPD fraction 2 dialyzed in distilled water.

AMPD paraugos pēc dialīzes sāļi vairs nav redzami, un tajos novēro morfoloģiski nevienmabīgus struktūras agregātus (5. attēls C un D). Abās AMPD frakcijās ir redzamas 0,1-0,2 μm lielu lodīšu kopas, kas lielā koncentrācijā sakopotas kaudzēs ar diametru aptuveni 1 μm . Ne

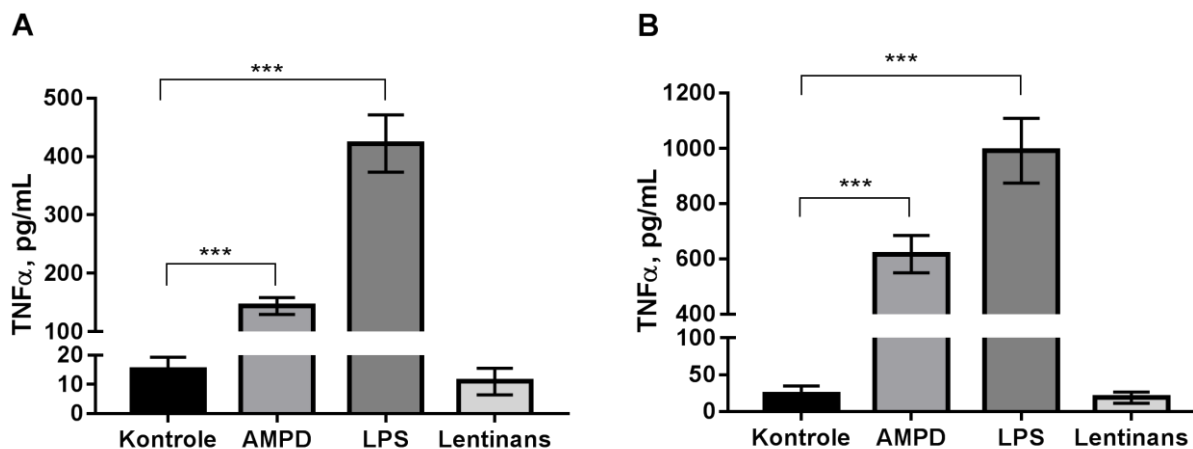
BSA, ne LPS paraugos šādas struktūras redzamas nav un pārsvarā novēro tikai fosfāta sāļu klātbūtni (2. un 3. pielikums). Līdz ar to var secināt, ka attīrīts AMPD veido stabilus, daļēji strukturētus proteīna agregātus.

Atšķiroties proteīnu koncentrācijai AMPD frakcijās, atšķiras arī struktūras agregāti. Zemākas proteīnu koncentrācijas gadījumā (1. frakcija, 114 µg/mL) attēla fonā redzams alumīnija folijas paliktis – neveidojas vienlaidus virsmas pārklājums ar mazāk izteiktas morfoloģijas struktūrām (5. attēls B), kāds redzams paraugā ar augstāko proteīnu koncentrāciju (9. frakcija, 375 µg/mL; 5. attēls D). Labāk eksponētās struktūras arī varētu skaidrot AMPD 1. frakcijas vairāk izteikto pīķi FTIR spektra 1050-1040 cm⁻¹ diapazonā – zemākās koncentrācijās strukturēti proteīni labāk eksponē ķīmiskās saites (4. attēls).

AMPD ekstrahējot ar acetonu vai ēteri, skenējošajā elektronmikroskopā varētu novērot, vai šādā veidā iespējams izjaukt struktūras agregātus, vai tomēr ir kādas membrānas, kas tos satur kopā.

3.5. IZMAIŅAS IEKAISUMA CITOKĪNU SEKRĒCIJĀ AMPD, LPS UN LENTINĀNA IEDARBĪBĀ

Ar ELISA noteica dabīgu imūnmodulatoru ietekmi uz iekaisuma citokīnu tumora nekrozes faktora α (TNF α) un interleikīna-6 (IL-6) sekrēciju perifēro asiņu mononukleārajās šūnās, kas izdalītas no septiņu veselu donoru asins paraugiem, četras un 24 stundas pēc to pievienošanas šūnām. Šūnu kultivēšanas barotnēm pievienoja attiecīgi vai nu AMPD (10 µg/mL), vai LPS (1 µg/mL), vai lentinānu (10 µg/mL), abiem pēdējiem esot imūnmodulatoriem ar iepriekš aprakstītu iedarbību un darbības mehānismu (Aderem and Ulevitch 2000, Matsuno *et al.* 2001, Stopinšek *et al.* 2010, El Enshasy and Hatti-Kaul 2013).



6. attēls. A – TNF α sekrēcijas izmaiņas monocītos pēc četrus stundu stimulācijas ar dabīgiem imūnmodulatoriem. B – TNF α sekrēcijas izmaiņas monocītos pēc 24 stundu stimulācijas ar dabīgiem imūnmodulatoriem. Standartnovirzes no septiņu donoru paraugiem apzīmētas ar kļūdu intervālu stabiņiem. Statistiski būtiskas atšķirības starp grupām noteica ar t-testu. Atšķirības attiecībā pret kontroli pie būtiskuma līmeņa $p \leq 0,001$ apzīmētas ar (***) .

Figure 6. A – Changes in TNF α secretion in monocytes after stimulation with natural immunomodulators for four hours. B – Changes in TNF α secretion in monocytes after stimulation with natural immunomodulators for 24 hours. Error bars indicate the standard deviation from seven donor samples. Significance of the differences between groups were determined by the t-test. The differences in comparison to the control cells at significance level $p \leq 0,001$ are marked by (***) .

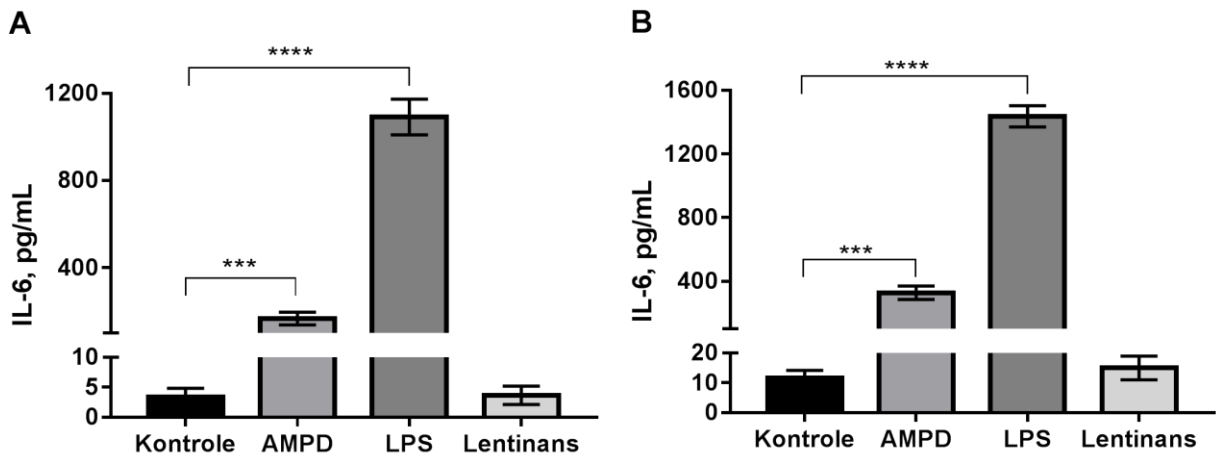
Stimulējošu ietekme uz TNF α sekrēciju mononukleārajās šūnās raksturīga lipopolisaharīdam un AMPD kā īslaicīgas (četrus stundas), tā ilglaicīgākas (24 stundas) iedarbības rezultātā. Četrus stundas kultivējot mononukleārās šūnas LPS klātbūtnē, sekretētā TNF α koncentrācija sasniedz vidēji 422 ± 28 pg/mL, būtiski ($p \leq 0,001$) atšķiroties no rezultāta kontroles paraugos, kur vidējā TNF α koncentrācija ir 15 ± 2 pg/mL (6. attēls A). AMPD ietekmē savukārt TNF α koncentrācija sasniedz vidēji 144 ± 8 pg/mL, kas, lai gan ir aptuveni trīs reizes zemāka nekā pēc stimulācijas ar LPS, tāpat būtiski ($p \leq 0,001$) atšķiras no vidējās vērtības kontroles paraugos bez pievienotiem imūnmodulatoriem. Lentinānam būtiska ietekme uz šī iekaisuma citokīna sekrēciju netiek novērota, TNF α koncentrācijai pēc 4 stundām esot 11 ± 3 pg/mL ($p > 0,05$), kas ir apmēram 10 reizes mazāk nekā AMPD gadījumā.

Pēc 24 stundām LPS būtiski ($p \leq 0,001$) stimulē TNF α sekrēciju, tā koncentrācijai salīdzinājumā ar kontroli (24 ± 6 pg/mL) esot augstākai par vidēji 967 ± 68 pg/mL (6. attēls B). Ir

vērojams arī AMPD stimulējošais efekts, TNF α koncentrācijai sasniedzot 617 ± 39 pg/mL, kas būtiski ($p \leq 0,001$) atšķiras no kontroles. Lentināna ietekmē savukārt vidējā TNF α koncentrācija ir mazāka nekā kontroles variantā jeb 19 ± 4 pg/mL, tomēr izmaiņas nav statistiski būtiskas ($p > 0,05$). AMPD ietekme šajā gadījumā ir līdz 30 reizēm spēcīgāka. Salīdzinot ar četru stundu inkubāciju, pēc 24 stundām AMPD un LPS izraisītā efekta atšķirības ir mazākas - AMPD iedarbība ir aptuveni 1,5 reizes vājāka nekā LPS.

LPS spēja stimulēt TNF α sekrēciju mononukleārajās šūnās skaidrojama ar to, ka uz monocītu, makrofāgu un neitrofilu plazmas membrānas virsmas ir ekspresēts CD14 proteīns – receptors, kas spēj saistīt endotoksīnu (Wright *et al.* 1990, Haziot *et al.* 1993, Fenton and Golenbock 1998). Tā kā šim proteīnam nav iekššūnas domēna, monocītu aktivēšana notiek, LPS signālam šūnas membrānu šķērsojot ar, piemēram, TLR-4 receptora palīdzību (Heine and Lien 2003). AMPD, domājams, darbojas līdzīgi.

TNF α kā tipisks iekaisuma citokīns ir iesaistīts sistēmiskā iekaisuma un akūtās fāzes reakcijas veidošanā. Tā galvenā loma ir imūnšūnu regulācija, bet paaugstināta TNF α koncentrācija var izraisīt gan iekaisumu, drudzi un apoptozi, gan inhibēt tumorogēnēzi (Gahring *et al.* 1996). Tomēr iekaisuma veicināšana ne vienmēr ir nevēlama. Brūces mikrovidē TNF α kopā ar IL-1 un IL-6 darbojas kā parakrīnie, autokrīnie un, iespējams, arī endokrīnie saimniekorganisma aizsardzības mediatori (Huttunen *et al.* 2000). TNF α paildzina iekaisuma šūnu atbildi, mediējot neitrofilu un monocītu piesaisti ievainojuma vietai un to aktivāciju (Heldin *et al.* 2001, MaCartney-Francis and Wahl 2001). TNF α ir viens no citokīniem, kas iesaistīts neovaskularizācijā jeb jaunu asinsvadu veidošanās procesā. Tas iesaistīts arī audu reparācijā vai nu tieši ietekmējot endotēlija šūnu un fibroblastu funkcijas, vai netieši – inducējot papildu citokīnu un augšanas faktoru produkciju (Gallucci *et al.* 2000). Balstoties uz šo informāciju, var spriest, ka attiecīgos procesos, piemēram, hronisku brūču dzīšanas gadījumā, kur raksturīgs neliels, bet ilgstošs iekaisums, nedaudz palielināta TNF α sekrēcija varētu palīdzēt iekaisumu veicināt un likt tam noritēt straujāk. Līdz ar to šādā gadījumā, iespējams, AMPD būtu piemērotāks imūnmodulators nekā LPS, jo šis glikoproteīns TNF α sekrēciju stimulē mērenāk.



7. attēls. A – IL-6 sekrēcijas izmaiņas monocītos pēc četrus stundu stimulācijas ar imūnmodulatoriem. B – IL-6 sekrēcijas izmaiņas monocītos pēc 24 stundu stimulācijas ar imūnmodulatoriem. Standartnovirzes no septiņu donoru paraugiem apzīmētas ar kļūdu intervālu stabiņiem. Statistiski būtiskas atšķirības starp grupām noteica ar t-testu. Atšķirības attiecībā pret kontroli pie būtiskuma līmeņa $p \leq 0,001$ apzīmētas ar (***) , pie $p \leq 0,0001$ ar (****).

Figure 7. A – Changes in IL-6 secretion in monocytes after stimulation with natural immunomodulators for four hours. B – Changes in IL-6 secretion in monocytes after stimulation with natural immunomodulators for 24 hours. Error bars indicate the standard deviation from seven donor samples. Significance of the differences between groups were determined by the t-test. The differences in comparison to the control cells at significance level $p \leq 0,001$ are marked by (***) , at $p \leq 0,0001$ by (****).

Arī IL-6 sekrēciju gan četrus, gan 24 stundu iedarbībā stimulēt spēj gan AMPD, gan LPS. Tāpat kā $TNF\alpha$, arī šī citokīna produkciju mononukleārajās šūnās vairāk veicina lipopolisaharīds nekā AMPD. LPS spēja stimulēt IL-6 sekrēciju aprakstīta jau iepriekš (Sawa *et al.* 2008). Četrus stundu laikā LPS ietekmē IL-6 koncentrācija sasniedz vidēji 1091 ± 47 pg/mL, kas būtiski ($p < 0,0001$) atšķiras no sekretētā IL-6 daudzuma kontroles paraugos (vidēji 3 ± 1 pg/mL; 7. attēls A). Lai gan stimulējošais efekts ir aptuveni 6,5 reizes mazāk izteikts, tomēr arī AMPD imūnstimulējošās iedarbības rezultātā IL-6 koncentrācija (167 ± 17 pg/mL) būtiski ($p \leq 0,001$) atšķiras no kontroles. Lentināns IL-6 sekrēciju īsā laika posmā neietekmē, tā koncentrācija statistiski būtiski neatšķiras no kontroles ($p \leq 0,05$).

Lai gan mazākā mērā (~4 reizes vājāk) nekā LPS (1436 ± 39 pg/mL), arī pēc 24 stundām novēroja AMPD stimulējošo iedarbību uz IL-6 sekrēciju mononukleārajās šūnās, citokīna koncentrācijai sasniedzot vidēji 327 ± 24 pg/mL, kas būtiski ($p \leq 0,001$) atšķiras no kontroles (12

± 1 pg/mL; 5. attēls B). Lentināna ietekme uz šī iekaisuma citokīna sekrēciju un koncentrācijas palielināšanos (15 ± 2 pg/mL) nav statistiski būtiska ($p > 0,05$).

Salīdzinot sekretēto iekaisuma citokīnu līmeni, redzams, ka kopumā abu dabīgo imūnmodulatoru ietekmē IL-6 produkcijas daudzums mononukleārajās šūnās palielinās vairāk nekā TNF α . Tas skaidrojams ar to, ka arī TNF α inducē IL-6 sekrēciju šūnās, līdz ar to šajā gadījumā bez AMPD vai LPS ietekmes tiek saņemts vēl papildu stimuls no TNF α (Kuldo *et al.* 2005, Cheng *et al.* 2015). Savukārt Schindler *et al.* (1990) pētījums parādījis, ka IL-6 inhibē LPS inducētu TNF α sekrēciju cilvēka mononukleārajās šūnās, kas arī varētu skaidrot to, kāpēc TNF α koncentrācija pēc stimulācijas ar LPS mononukleārajās šūnās ir mazāka nekā sekretētais IL-6 daudzums. Atšķirībā no TNF α , kur pēc 24 stundu inkubēšanas atšķirības starp AMPD un LPS efektu nav tik lielas, kā īsās, 4 stundu, indukcijas gadījumā, IL-6 sekrēcijas atšķirības starp LPS un AMPD stimulētiem paraugiem ir līdzīgas abus simulēšanas laiku gadījumā.

Iegūtie rezultāti rāda, ka AMPD līdzīgi LPS stimulē iekaisumu regulējošos citokīnus, tai skaitā IL-6. Eksperimentos ar pelēm parādīts, ka IL-6 ir nozīmīga loma brūču reepitelizācijas un granulācijas audu veidošanās procesā (Gallucci *et al.* 2000). Parādīts, ka arī AMPD veicina brūču reepitelizāciju žurkām (Nikolajeva *et al.* 2009).

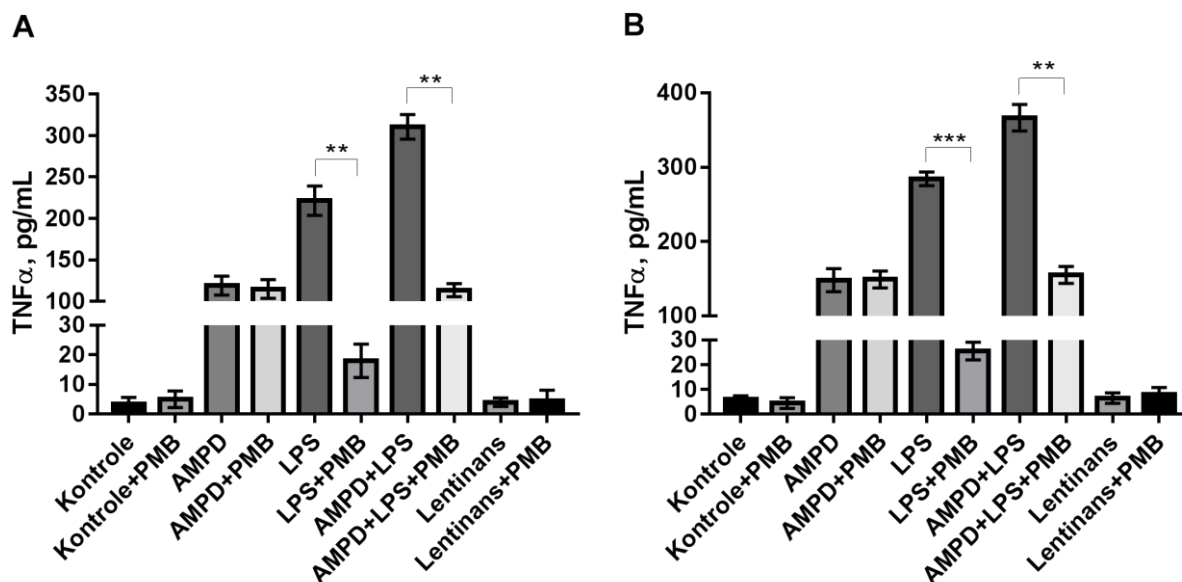
Masihi *et al.* (1997) parādīja, ka lentinānam piemīt imūnsupresējošas īpašības un tas samazina TNF α , bet ne IL-6 sekrēciju. Lai gan šajā darbā iegūtie rezultāti neparāda statistiski būtisku lentināna ietekmi uz neviena no iekaisuma citokīnu sekrēciju, redzama tendence lentinānam 24 stundu laikā attiecīgi nedaudz samazināt TNF α un palielināt IL-6 sekrēciju. Tomēr gan kontroles variantā, gan lentināna ietekmē producēto citokīnu koncentrācija ir zema un atšķirības, kā jau minēts, nav statistiski ticamas. Šūnas būtu jākultivē ilgākā laika periodā un jāizmanto lielākas lentināna koncentrācijas, lai novērtētu šī polisaharīda ietekmi uz monocītiem.

3.6. ENDOTOKSĪNA NEITRALIZĒŠANA

Tā kā LAL tests nespēja diferencēt AMPD un LPS, lai to izmatotu AMPD iespējamā piesārņojuma ar endotoksīnu raksturošanai un attīrīšanai ar EndoTrap HD, tika izmantota AMPD (10 μ g/mL), LPS (1 μ g/mL) un lentināna (10 μ g/mL) apstrāde ar polimiksīnu B (PMB; 25 μ g/mL),

lai raksturotu šīs LPS saistošās vielas iedarbību uz imūnmodulatoru spēju izraisīt izmaiņas TNF α un IL-6 sekrēcijā.

Polimiksīnu B izmanto, lai neutralizētu endotoksīnu un tā izraisītos efektus (Warren 1982). Tas saista lipopolisaharīdā esošo lipīdu A, veidojot kompleksu un neļaujot endotoksīnam saistīties pie tam atbilstošajiem receptoriem (Morrison and Jacobs 1976).



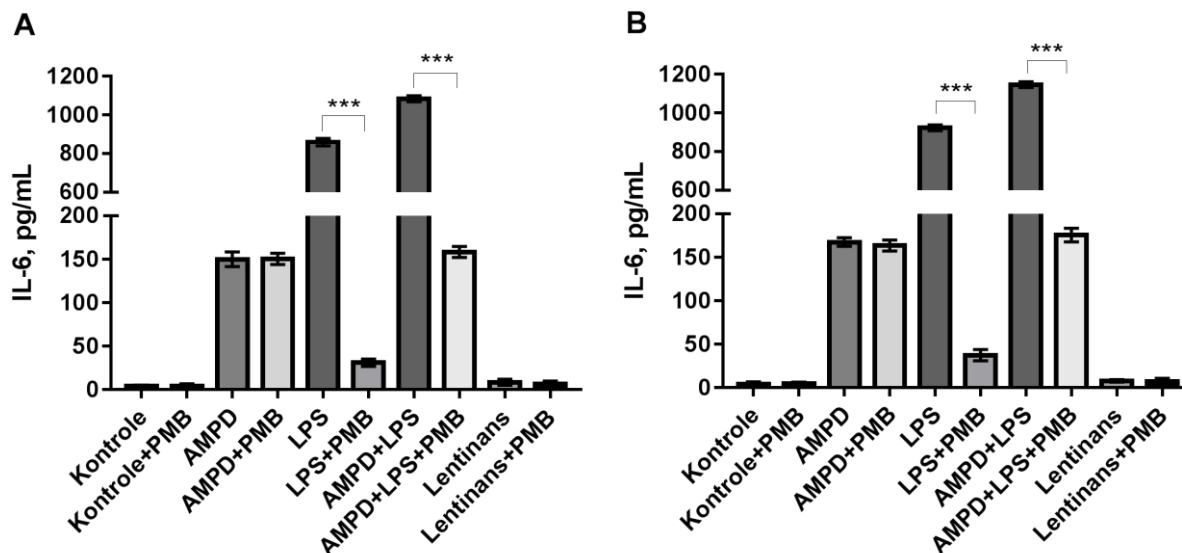
8. attēls. A – TNF α sekrēcijas izmaiņas monocītos pēc četrus stundu stimulācijas ar dabīgiem imūnmodulatoriem un endotoksīna neutralizēšanas ar polimiksīnu B (PMB). B – TNF α sekrēcijas izmaiņas pilno asiņu paraugos pēc četrus stundu stimulācijas ar dabīgiem imūnmodulatoriem un endotoksīna neutralizēšanas ar polimiksīnu B (PMB). Standartnovirzes no trīs donoru paraugiem apzīmētas ar kļūdu intervālu stabiņiem. Statistiski būtiskas atšķirības starp grupām noteica ar t-testu. Atšķirības pie būtiskuma līmeņa $p \leq 0,01$ apzīmētas ar (**), pie $p \leq 0,001$ ar (***)

Figure 8. A – Changes in TNF α secretion in monocytes after stimulation with natural immunomodulators and endotoxin neutralization with polymyxin B (PMB) for four hours. B – Changes in TNF α secretion in whole blood samples after stimulation with natural immunomodulators and endotoxin neutralization with polymyxin B (PMB) for four hours. Error bars indicate the standard deviation from three donor samples. Significance of the differences between groups were determined by the t-test. The differences at significance level $p \leq 0,01$ are marked by (**), at $p \leq 0,001$ by (***)

Vienlaikus kultivējot mononukleārās šūnas gan LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), gan polimiksīna B (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) klātbūtnē, sekretētā TNF α koncentrācija ir būtiski ($p \leq 0,01$) zemāka (18 ± 4 pg/mL) nekā tikai LPS ietekmē, kur tā paaugstinājusies līdz 222 ± 13 pg/mL (8. attēls A). Līdz ar to var spriest, ka polimiksīns B veiksmīgi neutralizē LPS un tā spēju stimulēt iekaisuma citokīnu sekrēciju, kā tas

aprakstīts iepriekš (Warren 1982). Līdzīgu polimiksīna B efektu uz AMPD nenovēro; TNF α sekrēcija mononukleārajās šūnās tiek stimulēta kā AMPD, tā vienlaicīgā AMPD un PMB klātbūtnē. TNF α koncentrācija abos variantos sasniedz attiecīgi vidēji 119 ± 8 pg/mL un 115 ± 8 pg/mL, atšķirība starp koncentrācijām nav statistiski būtiska ($p > 0,05$). Līdz ar to var spriest glikoproteīna frakcija ar AMPD aktivitāti nav piesārņota ar endotoksīnu un tai pašai raksturīga imūnstimulējošā ietekme uz iekaisuma citokīnu sekrēciju. Lai to pārbaudītu, šūnas kultivēja, tām vienlaikus pievienojot gan AMPD, gan LPS. Šādā variantā TNF α koncentrācija sasniedz vidēji vidēji 311 ± 11 pg/mL. Polimiksīna B klātbūtnē būtiski ($p \leq 0,01$) samazinās TNF α sekrēcija, tā koncentrācijai esot 114 ± 6 pg/mL, kas statistiski neatšķiras ($p > 0,05$) no variantiem, kur šūnas kultivēja AMPD, kā arī AMPD un polimiksīna B klātbūtnē (119 ± 8 pg/mL un 115 ± 8 pg/mL). Uzskatāmi redzams, ka PMB neutralizē tikai LPS, nevis AMPD. Tā kā iepriekš aprakstīts, ka polimiksīns B saista lipopolisaharīda lipīdu A (Morrison and Jacobs 1976), nevis konservatīvo reģionu tā iekšējā serdē kā EndoTrap HD kolonnas gadījumā (Anonīms B 2016), tad abu imūnmodulātru strukturālās līdzības neietekmē šo endotoksīna neutralizēšanas procesu.

Līdzīgus rezultātus uz TNF α sekrēciju novēro arī pilnu asiņu paraugos, kur polimiksīns B neutralizē LPS (8. attēls B). Tas redzams pēc tā, ka LPS ietekmē TNF α koncentrācija sasniedz vidēji 285 ± 7 pg/mL, bet, pievienojot PMB, sekretētā citokīna koncentrācija ir vien 26 ± 3 pg/mL. Atšķirība starp koncentrācijām ir statistiski būtiska ($p \leq 0,001$). Tāda pati tendence ir vērojama arī paraugos, kur uz šūnām iedarbojās kā AMPD, tā LPS – polimiksīns B saista endotoksīnu, līdz ar to TNF α koncentrācija ir par vidēji 212 ± 15 pg/mL zemāka nekā paraugos, kur šūnas kultivēja tikai AMPD un LPS klātbūtnē bez pievienota PMB. Iekaisuma citokīna koncentrācija (vidēji 155 ± 8 pg/mL) šajā gadījumā ir līdzīga tai, ko šūnas sekretēja tikai AMPD vai AMPD un polimiksīna B klātbūtnē (attiecīgi 148 ± 11 pg/mL un 149 ± 8 pg/mL), vēlreiz uzskatāmi parādot, ka polimiksīns B bloķē tikai endotoksīnu, nevis glikoproteīna frakciju, kam pašai par sevi piemīt imūnstimulējošas spējas.



9. attēls. A – IL-6 sekrēcijas izmaiņas monocītos pēc četrus stundu stimulācijas ar dabīgiem imūnmodulatoriem un endotoksīna neitralizēšanas ar polimiksīnu B (PMB). B – IL-6 sekrēcijas izmaiņas pilno asiņu paraugos pēc četrus stundu stimulācijas ar dabīgiem imūnmodulatoriem un endotoksīna neitralizēšanas ar polimiksīnu B (PMB). Standartnovirzes no trīs donoru paraugiem apzīmētas ar kļūdu intervālu stabiņiem. Statistiski būtiskas atšķirības starp grupām noteica ar t-testu. Atšķirības pie būtiskuma līmeņa $p \leq 0,001$ apzīmētas ar (***) .

Figure 9. A – Changes in IL-6 secretion in monocytes after stimulation with natural immunomodulators and endotoxin neutralization with polymyxin B (PMB) for four hours. B – Changes in IL-6 secretion in whole blood samples after stimulation with natural immunomodulators and endotoxin neutralization with polymyxin B (PMB) for four hours. Error bars indicate the standard deviation from three donor samples. Significance of the differences between groups were determined by the t-test. The differences at significance level $p \leq 0,001$ are marked by (***) .

IL-6 sekrēcijas izmaiņu datus vērojamas tādas pašas tendences kā rezultātos par izmaiņām producētā $TNF\alpha$ koncentrācijās. Gan mononukleāro šūnu, gan pilnu asiņu paraugos IL-6 sekrēcija būtiski ($p \leq 0,001$) samazinās variantos, kur LPS neitralizē ar polimiksīnu B (9. attēls A un B). PMB neietekmē AMPD stimulējošo ietekmi arī uz šī citokīna sekrēciju, parādot glikoproteīna imūnstimulējošās īpašības un izslēdzot iespējamā piesārņojuma ietekmi uz AMPD izraisīto stimulējošo efektu.

Lai gan Falagas and Kasiakou (2006) apkopojuši informāciju par polimiksīna B citotoksisko ietekmi uz šūnām, darbā negatīva PMB ietekme uz šūnām vai iekaisuma citokīnu sekrēciju nenovēro – nav statistiski būtisku atšķirību ($p > 0,05$) starp kontroles variantu un variantu, kur kultivēšanas barotnei pievienots PMB. Citotoksiskā ietekme, iespējams, būtu novērojama, ja

šūnas kultivētu ilgākā laika posmā nekā četras stundas vai arī ja ievērojami palielinātu PMB koncentrāciju.

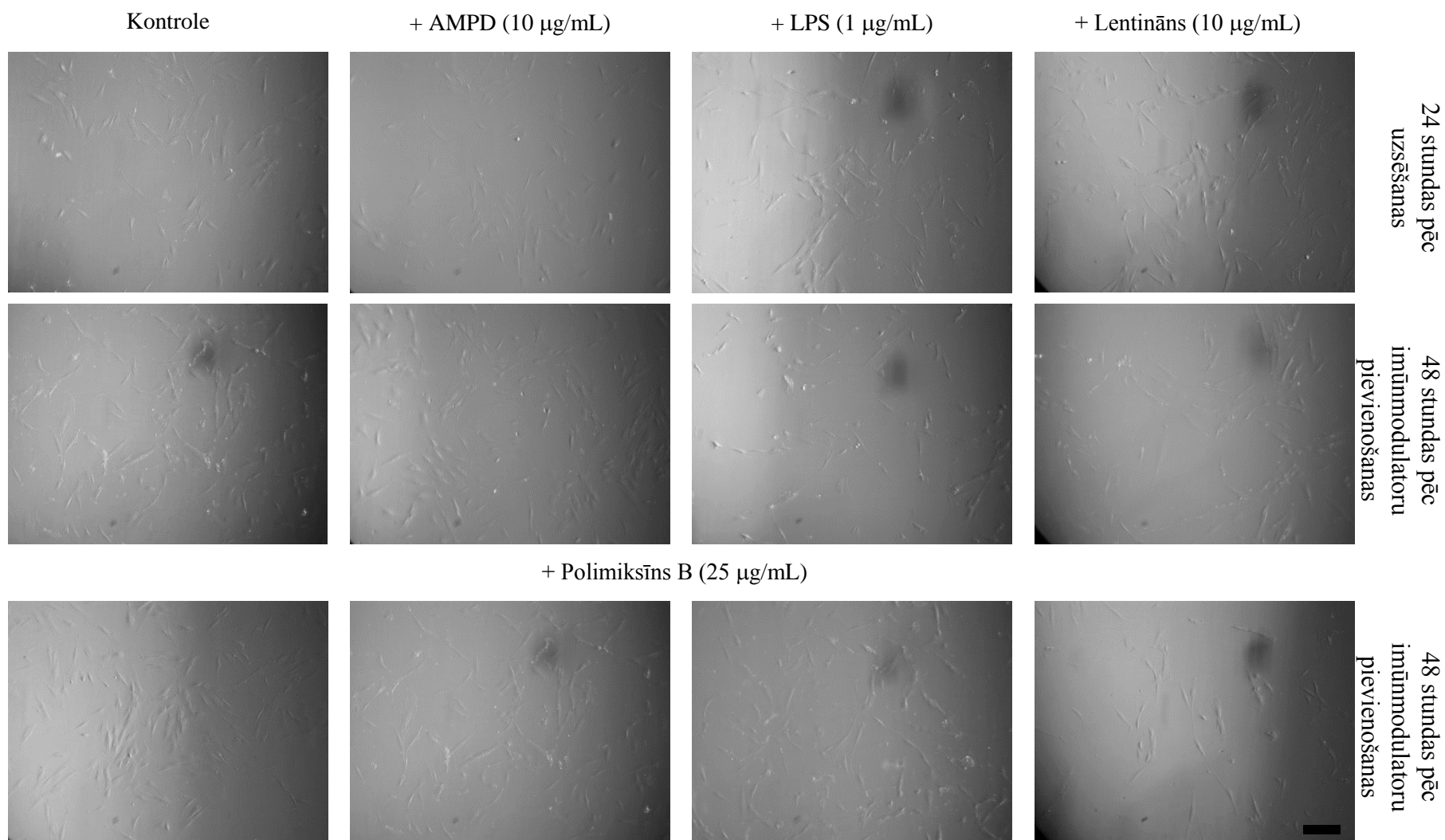
Polimiksīnam B nenovēro ietekmi arī uz lentinānu un tā imūnmodulējošajām spējām – nevienas no izmaiņām citokīnu sekrēcijā lentināna un PMB klātbūtnē nav statistiski būtiskas ($p > 0,05$). Tas skaidrojams ar lentināna strukturālajām atšķirībām no LPS – lentināns ir polisaharīds un tā sastāvā nav lipīds A, ko saista polimiksīns B (Ikekawa *et al.* 1969, Morrison and Jacobs 1976, El Enshasy and Hatti-Kaul 2013). Dati arī izslēdz iespējamību, ka lentināns ir piesārņots ar LPS.

Gan sekretētā $TNF\alpha$, gan IL-6 koncentrācija nedaudz augstāku līmeni sasniedz pilno asiņu paraugos, salīdzinot ar mononukleāro šūnu kultūrām. Tas skaidrojams ar to, ka eksperimentā izmantotā 1 mL pilno asiņu sastāvā ir gan vairāk mononukleāro šūnu ($2-9 \times 10^5$ šūnu), nekā uzseja uz platēm, gan arī citu imūnšūnu tipu, kas spējīgi sekretēt analizētos iekaisuma citokīnus (Anonīms C 2016). Līdz ar to AMPD un LPS stimulē arī šo šūnu spēju producēt $TNF\alpha$ un IL-6.

3.7. DABĪGU IMŪNMODULATORU, KĀ ARĪ AR ŠIEM IMŪNMODULATORIEM STIMULĒTU MONONUKLEĀRO ŠŪNU KULTIVĒŠANAS BAROTŅU IETEKME UZ DERMAS FIBROBLASTU DZĪVOTSPĒJU UN PROLIFERĀCIJU

Son *et al.* (2007) iepriekš aprakstījuši β -glukānu imūnstimulējošo aktivitāti, brūču dzīšanu veicinot divos veidos: netieši aktivējot dažādu makrofāgu citokīnu, piemēram, $TNF\alpha$, sekrēciju, vai tieši ietekmējot dermas fibroblastus, saistoties pie glukānu specifiskiem receptoriem.

Lai izvērtētu ar imūnšūnu stimulācijas starpniecību realizēto, AMPD, LPS un lentināna ietekmi uz dermas fibroblastu dzīvotspēju un proliferāciju, tos kultivēja 48 stundas gan imūnmodulatoru un polimiksīna B klātbūtnē tādās pašās koncentrācijās, kā aprakstīts 3.5. un 3.6. apakšnodaļā, gan pievienojot fibroblastu barotnei 25% ar imūnmodulatoriem stimulētu mononukleāro šūnu barotni. Vizuāli novērtējot šūnu skaitu gaismas invertmikroskopa redzes laukā, sprieda par imūnmodulatoru tiešo un netiešo ietekmi uz šūnu proliferāciju.

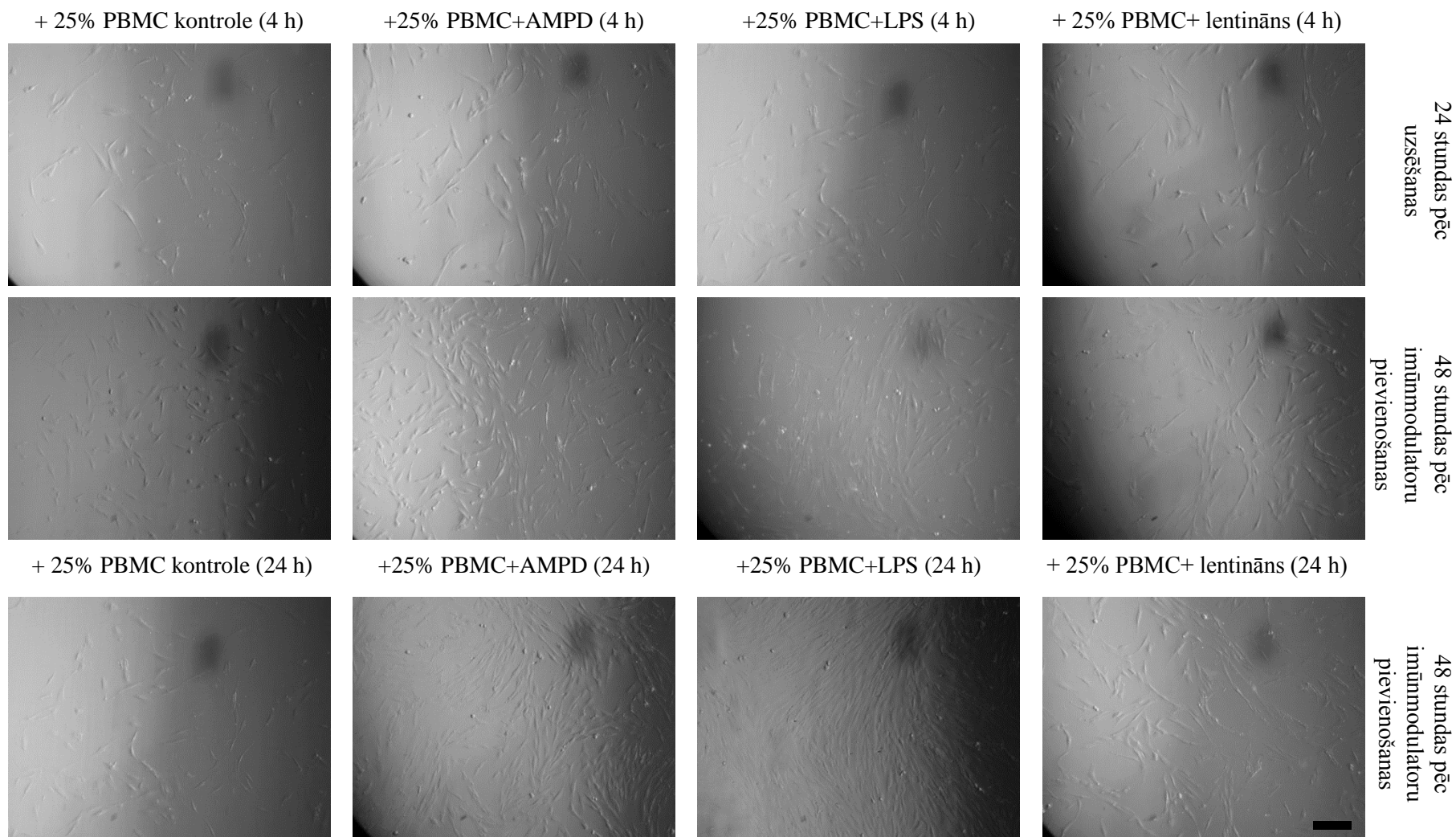


10. attēls. Izmaiņas cilvēka dermas fibroblastu šūnu kultūrās, kultivējot dabīgu imūnmodulatoru un polimiksīna B klātbūtnē. Mērogs atbilst 300 μm .

Figure 10. Changes in human dermal fibroblast cell cultures, cultivating in the presence of natural immunomodulators and polymyxin B. Scale corresponds to 300 μm .

Tā kā vizuāli redzes laukā nenovēro atšķirības šūnu skaita (konfluences) pieaugumā starp kontroli un šūnām, kas kultivētas imūnmodulatoru klātbūtnē, var spriest, ka 48 stundu iedarbības laikā analizētajiem imūnmodulatoriem nav ietekmes uz fibroblastu proliferāciju (10. attēls). Polimiksīnam B pētītajā koncentrācijā un iedarbības laikā nav raksturīgas ietekmes uz šūnu dzīvotspēju.

Iepriekš aprakstīta LPS stimulējoša ietekme uz plaušu fibroblastu proliferāciju (He et al. 2012). Tāpēc, lai novērtētu, vai LPS, kā arī AMPD un lentinānam ir stimulējoša ietekme uz dermas fibroblastu proliferāciju un dzīvotspēju, būtu nepieciešams eksperimentu atkārtot, šūnas kultivējot ilgākā laika posmā (5-12 dienas).



11. attēls. Izmaiņas cilvēka dermas fibroblastu šūnu kultūrās, kultivējot ar dabīgiem imūnmodulatoriem stimulētu mononukleāro šūnu kultivēšanas barotņu klātbūtnē. Mērogs atbilst 300 μm.

Figure 11. Changes in human dermal fibroblast cell cultures, cultivating in the presence of with natural immunomodulators stimulated monoclear cell media. Scale corresponds to 300 μm.

Dermas fibroblastus kultivējot ar AMPD un LPS stimulētu PBMC barotnes piedevu, novēro fibroblastu proliferācijas intensitātes pieaugumu, salīdzinot ar kontroles variantiem (11. attēls). Izteiktāks efekts uz dermas fibroblastu dalīšanos ir PBMC barotnēm, kas ar AMPD un LPS inkubētas 24 stundas (salīdzinot ar četru studnu inkubācijas laiku). Atšķirībā no LPS un AMPD lentinānam nav šāda izteikti stimulējoša efekta.

Ņemot vērā, ka pētījumi ar AMPD ir parādījuši, ka tā veicina brūču reepitelizāciju žurkās, kur arī iesaistītas ādas šūnas (Nikolajeva 2009) un prognozējot AMPD preparāta perspektīvas tikt izmantotam medicīnas ierīču sastāvā brūču apstrādei, šis glikoproteīnu komplekss būtu piemērotāks imūnmodulators dzīšanas procesā nekā LPS, jo gan enzīma molekulārā struktūra (210 kDa), gan tendence veidot agregātus ļautu tam topikāli saglabāties uznešanas vietā, rados mazāk riskantus sistēmiskus efektus, kādi būtu raksturīgi ~20 kDa masas LPS molekulām, difundējot organismā no uznešanas vietas brūcē.

4. SECINĀJUMI

1. Attīrīšana ar EndoTrap HD kolonnu un polimiksīnu B neuzrāda būtisku LPS piesārņojumu AMPD frakcijās, tomēr AMPD dod pozitīvu reakciju ar LAL testu, kas norāda uz tā strukturālo līdzību ar LPS un sarežģī kvalitātes kontroli;
2. Pētītajās koncentrācijās AMPD stimulē iekaisuma citokīna $\text{TNF}\alpha$ sekrēciju mononukleārajās šūnās 1,5-3 reizes vājāk nekā LPS un 10-30 reizes spēcīgāk nekā lentināns.
3. Pētītajās koncentrācijās AMPD stimulē IL-6 sekrēciju mononukleārajās šūnās mazākā mērā nekā LPS (4-6,5 reizes vājāk), bet tās imūnstimulējošā aktivitāte attiecībā pret šo iekaisuma citokīnu ir izteikti augstāka nekā lentinānam;
4. AMPD un LPS netieši jeb caur mononukleāro šūnu stimulēšanu veicina dermas fibroblastu dzīvotspēju un proliferāciju;
5. Skenējošās elektronmikroskopijas uzņēmumi parāda, ka glikoproteīnu frakcijām ir tendence veidot polimorfas agregātu struktūras, kas varētu pastiprināt imūno iedarbību un topikālas aplikācijas gadījumā aizkavēt migrāciju sistēmiskā līmenī.

5. PATEICĪBAS

Darba autore izsaka pateicību darba vadītājam Dr. h. biol. Indriķim Muižniekam un konsultantei Mag. biol. Annai Ramatai-Stundai par sniegtajiem padomiem un atbalstu darba veikšanā. Paldies Diānai Borovikovai, Gaļinai Makarenkovai un Kārlim Švirkstam par palīdzību datu ieguvē. Paldies arī LU Bioanalītisko un biodozimetrijas metožu laboratorijai, kā arī LU Bioloģijas fakultātes Mikrobioloģijas un biotehnoloģijas katedrai un to kolektīviem.

6. IZMANTOTĀ LITERATŪRA

1. Aderem A., Ulevitch R. J. 2000. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. – *Nature*, 406: 782–787.
2. Aida Y., Pabst M. J. 1990. Removal of endotoxin from protein solutions by phase separation using Triton X-114. – *Journal of Immunological Methods*, 14: 132(2): 191–5.
3. Berovic M., Habijanac J., Zore I., Wraber B., Hodzar D., Boh B., Pohleven F. 2003. Submerged cultivation of *Ganoderma lucidum* biomass and immunostimulatory effects of fungal polysaccharides. – *Journal of Biotechnology*, 103 (1): 77–86.
4. Block K. I., Mead M. N. 2003. Immune system effects of *Echinacea*, *Ginseng* and *Astragalus*: A review. – *Integrative Cancer Therapies*, 2: 247–67.
5. Borchers A. T., Keen C. L., Gershwin M. E. 2004. Mushrooms, tumors, and immunity: an update. – *Experimental Biology and Medicine*, 229 (5): 393–406.
6. Bordier C. 1981. Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution. – *Journal of Biological Chemistry*, 256: 1604–1607.
7. Brem H., Stojadinovic O., Diegelmann R. F., Entero H., Lee B., Pastar I. 2007. Molecular markers in patients with chronic wounds to guide surgical debridement. – *Molecular Medicine*, 13: 30-39.
8. Catalli A., Kulka M. 2010. Chitin and Glucan Polysaccharides as Immunomodulators of Airway Inflammation and Atopic Disease. – *Recent Patents on Endocrine Metabolic & Immune Drug Discovery*, 4: 175–189.
9. Chen J., Seviour R. 2007. Medicinal importance of fungal beta-(1→3), (1→6)-glucans. – *Mycological Research*, 111 (6): 635–652.
10. Cheng Y. F., Young G. H., Lin J. T., Jang H. H., Chen C. C., Nong J. Y., Chen P. K., Kuo C. Y., Kao S. H., Liang Y. J., Chen H. M. 2015. Activation of AMP-activated protein kinase by adenine alleviates TNF-alpha-induced inflammation in human umbilical vein endothelial cells. - *PLoS One*, 10 (11).
11. Cohen J. 2002. The immunopathogenesis of sepsis. – *Nature*, 420: 885–891.
12. El Enshasy H., Hatti-Kaul R. 2013. Mushroom immunomodulators: unique molecules with unlimited applications. – *Trends in Biotechnology*, 31 (12): 668–677.

13. Erjavec J., Kos J., Ravnikar M., Dreo T. Sabotic J. 2012. Proteins of higher fungi – from forest to application. – *Trends in Biotechnology*, 30 (5): 259–273.
14. Falagas M. E., Kasiakou S. K. 2006. Toxicity of polymyxins: a systematic review of the evidence from old and recent studies. – *Critical care*, 10 (1): r27.
15. Fenton M. J., Golenbock D. T. 1998. LPS-binding proteins and receptors. – *Journal of Leukocyte Biology*, 64: 25–32.
16. Firat C., Samdanci E., Erbatur S., Aytekin A. H., Ak M., Turtay M. G., Coban Y. K. 2013. β -glucan treatment prevents progressive burn ischaemia in the zone of stasis and improves burn healing: An experimental study in rats. – *Burns*, 39: 105–112.
17. Gahring L. C., Carlson N. G., Kulmar R. A., Rogers S. W. 1996. Neuronal expression of tumor necrosis factor alpha in the murine brain. – *Neuroimmunomodulation*, 3 (5); 289–303.
18. Galagan J. E., Henn M. R., Ma L. J., Cuomo C. A., Birren B. 2005. Genomics of the fungal kingdom: Insights into eukaryotic biology. – *Genome Research*, 15: 1620–1631.
19. Gallucci R. M., Simeonova P.P., Matheson J.M., Kommineni C., Guriel J.L., Sugawara T., Luster M. I. 2000. Impaired cutaneous wound healing in interleukin-6-deficient and immunosuppressed mice. – *FASEB Journal*, 14 (15): 252–2531.
20. Haziot A., Tsuberi B. Z., Goyert S. M. 1993. Neutrophil CD14: biochemical properties and role in the secretion of tumor necrosis factor-alpha in response to lipopolysaccharide. – *Journal of Immunology*, 150: 5556–5565.
21. Heine H., Lien E. 2003. Toll-like receptors and their function in innate and adaptive immunity. – *International Archives of Allergy and Immunology*, 130: 180–192.
22. Heldin C. H. et al. 2001. Signal transduction mechanisms for members of the TGF-beta family. – *TGF-beta and Related Cytokines in Inflammation*, Breit S. N. and Wahl S. M. Basel: Birkhauser, pp. 11–40.
23. Herre J., Marshall A. S., Caron E., Edwards A. D., Williams D. L., Schweighoffer E., Tybulewicz V., Reis e Sousa C., Gordon S. Brown G. D. 2004. Dectin-1 uses novel mechanisms for yeast phagocytosis in macrophages. – *Blood*, 104, 4038–4045.
24. Hirohashi N., Morrison D .C. 1996. Low-dose lipopolysaccharide (LPS) pretreatment of mouse macrophages modulates LPS-dependent interleukin-6 production *in vitro*. – *Infection and Immunity*, 64: 1011–5.

25. Huttunen M., Aalto M. L., Harvima R. J., Horsmanheimo M., Harvima I. T. 2000. Alterations in mast cells showing tryptase and chymase activity in epithelializing and chronic wounds. – *Experimental Dermatology*, 9 (4): 258–265.
26. Hsu H. C., Hsu C. I., Lin R. H., Kao C. L., Lin J. Y. 1997. Fip-vvo, a new fungal immunomodulatory protein isolated from *Volvariella volvacea*. – *Biochemical Journal*, 323 (2): 557–65.
27. Ikekawa T., Uehara N., Maeda Y., Nakanishi M., Fukuoka F. 1969. Antitumor activity of aqueous extracts of edible mushrooms. – *Cancer Research*, 29 (3): 734–735.
28. Jacobs D. M., Morrison D. C. 1977. Inhibition of the mitogenic response to lipopolysaccharide (LPS) in mouse spleen cells by polymyxin B. – *Journal of Immunology*, 118: 21–27.
29. Jeong Y. T., Yang B. K., Jeong S. C., Kim S. M., Song C. H. 2008. *Ganoderma applanatum*: a promising mushroom for antitumor and immunomodulating activity. – *Phytotherapy Research* 22: 614–619.
30. Jeurink P. V., Noguera C. L., Savelkoul H. F. J., Wichers H. J. 2008. Immunomodulatory capacity of fungal proteins on the cytokine production of human peripheral blood mononuclear cells. – *International Immunopharmacology*, 8: 1124–1133.
31. Kim H. S., Hong J. T., Kim Y., Han S. B. 2011. Stimulatory Effect of β -glucans on Immune Cells. – *Immune Network*, 11 (4): 191-195.
32. Kinn T. R., Wu C. M., Tu W. C., Ko J. L., Tzen J. T. C. 2006. Functional Expression of FIP-*gts*, a Fungal Immunomodulatory Protein from *Ganoderma Tsugae* in Sf21 Insect Cells. – *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 70 (11): 2627–2634.
33. Kino K., Yamashita A., Yamaoka K., Watanabe J., Tanaka S., Ko K., Shimizu K., Tsunoo H. 1989. Isolation and Characterization of a New Immunomodulatory Protein, Ling Zhi-8 (LZ-8), from *Ganoderma Zucidiurn*. – *The Journal of Biological Chemistry*, 264 (1), 472–478.
34. Ko J. L., Hsu C. I., Lin R. H., Ka C. L., Lin J. Y. 1995. A new fungal immunomodulatory protein, FIP-*fve* isolated from the edible mushroom, *Flammulina velutipes* and its complete amino acid sequence. – *European Journal of Biochemistry*, 228, 244–249.
35. Kuldo J. M., Westra J., Asgeirsdottir S. A., Kok R. J., Oosterhuis K., Rots M. G., Schouten J. P., Limburg P. C., Molema G. 2005. Differential effects of NF- κ B and p38 MAPK inhibitors and combinations thereof on TNF- α - and IL-1 β -induced proinflammatory status

- of endothelial cells *in vitro*. – American Journal of Physiology and Cell Physiology, 289 (5).
36. Kwon A. H., Qiu Z., Hashimoto M., Yamamoto K., Kimura T. 2009. Effects of medicinal mushroom (*Sparassis crispa*) on wound healing in streptozotocin-induced diabetic rats. – The American Journal of Surgery, 197: 503–509.
 37. Liu C. L., Kamei D. T., King J. A., Wang D. I. C., Blankschtein D. 1998. Separation of proteins and viruses using two-aqueous micellar systems. – Journal of Chromatography B, 711(1/2): 127–138.
 38. Maeda Y. Y., Watanabe S. T., Chihara C., Rokutanda M. 1988. Denaturation and renaturation of a beta-1,6;1,3-glucan, lentinan, associated with expression of T-cell-mediated responses. – Cancer Research, 48 (3): 671–675.
 39. Masihi K. N., Madaj K., Hintelmann H., Gast G., Kaneko Y. 1997. Down-regulation of tumor necrosis factor-alpha, moderate reduction of interleukin-1beta, but not interleukin-6 or interleukin-10, by glucan immunomodulators curdlan sulfate and lentinan. – International Journal of Immunopharmacology, 19 (9–10), 463–468.
 40. Matsuno N., Ikeda T., Ikeda K., Hama K., Iwamoto H., Uchiyama M., Kozaki K., Narumi Y., Kikuchi K., Degawa H., Nagao T. 2001. Changes of cytokines in direct endotoxin adsorption treatment on postoperative multiple organ failure, Therapeutic Apheresis and Dialysis, 5: 36–39.
 41. McCartney-Francis N. L., Wahl S. M. 2001. TGF-beta and macrophages in the rise and fall of inflammation. – TGF-beta and Related Cytokines in Inflammation, Breit S. N. Wahl S. M. Basel: Birkhauser, pp. 65–90.
 42. Mekkes J. R., Loots M. A. M., Van Der Wal, A. C., Bos J. D., 2003. Causes, investigation and treatment of leg ulceration. – British Journal of Dermatology, 148: 388–401.
 43. Morrison D.C., D.M. Jacobs. 1976. Binding of polymyxin B to the lipid A portion of bacterial lipopolysaccharides. – Immunochemistry, 13: 813–8.
 44. Naumann D., Schultz C., Sabisch A., Kastowsky M., Labischinski H. 1989. New insights into the phase behaviour of a complex anionic amphiphile: Architecture and dynamics of bacterial deep rough mutant lipopolysaccharide membranes as seen by FTIR, X-ray, and molecular modelling techniques. – Journal of Molecular Structure, 2014: 213–246.

45. Niemetz J., Morrison D. C. 1977. Lipid A as the biologically active moiety in bacterial endotoxin (LPS)-initiated generation of procoagulant activity by peripheral blood leukocytes. – *Blood*, 49: 947–56.
46. Nikolajeva V., Eze D., Kamradze A., Indulēna M., Muižnieks I. 1996. Protective effect of adenylate deaminase (from *Penicillium lanoso-viride*) against acute infections in mice. – *Immunopharmacology*, 35(2): 163 – 169.
47. Nikolajeva V., Eze D., Petriņa Z., Muižnieks I. 1999. Activation of mice peritoneal macrophages by adenylate deaminase from *Penicillium lanoso-viride*. – *Proceedings of the Latvian Academy of Sciences*, 53(1): 12–15.
48. Nikolajeva V., Eze D., Artjuha M., Mikažāns I., Petriņa Z., Antonoviča L., Babarikins D., Muižnieks I. 2009. Treatment of skin ulcers with adenylate deaminase, a glycoprotein from microscopic fungus *Penicillium lanoso-viride*. – *Acta Universitatis Latviensis*, 753: 69–79.
49. Parikh S. J., Chorover J. 2008. ATR-FTIR study of lipopolysaccharides at mineral surfaces. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 62 (2): 188– 198.
50. Patil U. S., Jaydeokar A. V., Bandawane D. D. 2012. Immunomodulators: A Pharmacological Review. – *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4 (1): 30–36.
51. Rao C. S. 2001. Purification of large proteins using ion-exchange membranes. – *Process Biochemistry*, 37(3): 247–256.
52. Ramata-Stunda A., Biluna L., Matjuškova N., Paeglīte I., Nikolajeva V., Muižnieks I. In vitro testing of skin regenerating potential of fungal polysaccharides and glycoproteins. – *Planta Medica*, 79 (13).
53. Singer A. J., Clark R. A. F. 1999. Cutaneous Wound Healing. – *The New England Journal of Medicine*, 314 (10): 738–746.
54. Schepetkin I. A., Quinn M. T. 2006. Botanical Polysaccharides: macrophage immunomodulation and therapeutic potential. – *International Immunopharmacology* 6 (3): 317–33.
55. Schindler R., Mancilla J., Endres S., Ghorbani R., Clark S. C., Dinarello C. A. 1990. Correlations and interactions in the production of interleukin-6 (IL-6), IL-1, and tumor necrosis factor (TNF) in human blood mononuclear cells: IL-6 suppresses IL-1 and TNF. – *Blood*, 75: 40.

56. Son H. J., Bae H. C., Kim H. J., Lee D. H., Han D. W., Park. J. C. 2005. Effects of β -glucan on proliferation and migration of fibroblasts. – *Current Applied Physics*, 5: 468–471.
57. Son H. J., Han D. W., Baek H. S., Lim H. R., Lee M. H., Woo Y. I., Park. J. C. 2007. Stimulated TNF- α release in macrophage and enhanced migration of dermal fibroblast by β -glucan. - *Current Applied Physics*, 7S1: 33–36.
58. Srivasta J. K., Shankar E., Gupta S. 2010. Chamomile: A herbal medicine with a bright future. – *Molecular Medicine Reports*, 3 (6): 895–901.
59. Stopinšek S., Terčelj M., Salobir B., Wra B., Ihan A., Rylander R., Simčič S. 2010. Effects of fungal cell wall polysaccharides and lipopolysaccharide on in vitro tumour necrosis factor alpha production by peripheral blood mononuclear cells of sarcoidosis patients. – *Zdravniški Vestnik*, 79: 684–689.
60. Sugiura M., Mitaka C., Haraguchi G., Tomita M., Inase N. 2015. Polymyxin B-immobilizes fiber column hemoperfusion mainly helps to construct peripheral blood vessels in treatment for septic shock. – *Journal of Intensive Care*, 3 (1): 14.
61. Teeters M. A., Root T. W., Lightfoot E. N. 2002. Performance and scale-up of adsorptive membrane chromatography. – *Journal of Chromatography A*, 25: 944(1–2):1 29–39.
62. Tziabanos A. O. 2000. Polysaccharide Immunomodulators as Therapeutic Agents: Structural Aspects and Biologic Function. - *Clinical Microbiology Reviews*, 13 (4):523–533.
63. Vannucci L., Krizan J., Sima P., Stakheev D., Caja F., Rajsiglova L., Horak V., Saich M. 2013. Immunostimulatory properties and antitumor activity of glucans. – *International Journal of Oncology*, 43, 357–364.
64. Vetvicka V., Vetvickova J. 2014. Comparison of immunological effects of commercially available β -glucans. – *Applied Scientific Reports*, 1 (2): 1–7.
65. Warren J. R. 1982. Polymyxin B suppresses the endotoxin inhibition of concanavalin a-mediated erythrocyte agglutination. – *Infection and Immunity*, 35 (2): 594–599.
66. Wasser S. P. 2002. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. – *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60: 258–274.
67. Wei D., Williams D., Browder W. 2002. Activation of AP-1 and SP1 correlates with wound growth factor gene expression in glucan-treated human fibroblasts. – *International Immunopharmacology*, 2: 1163–1172.

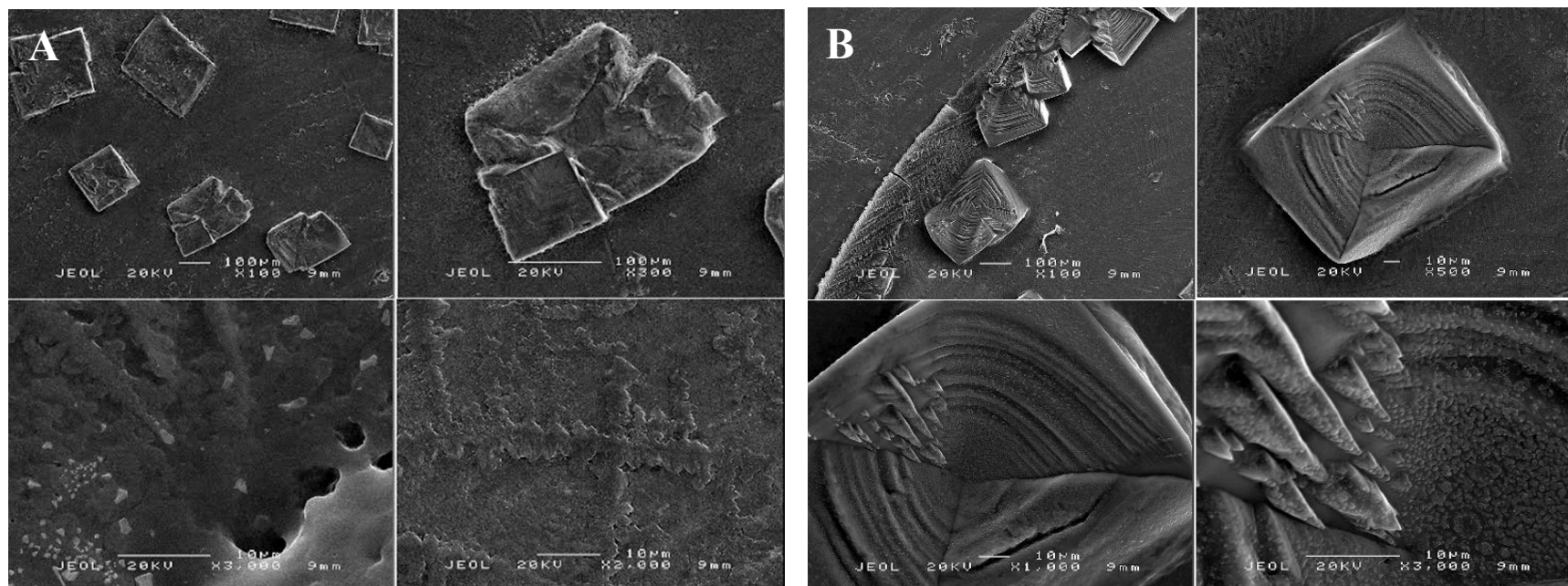
68. Willment J. A., Brown G. D. 2008. C-type lectin receptors in antifungal immunity. – Trends in Microbiology, 16 (1): 27–32.
69. Wright S. D., Ramos R. A., Tobias P. S., Ulevitch R. J., Mathison J. C. 1990. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. – Science, 249: 1431–3.
70. Ziauddin M., Phansalkar N., Patki P., Diwanay S., Patwardhan B. 1996. Studies on the immunomodulatory effects of Ashwagandha. – Journal of *Ethnopharmacology*, 50 (2): 69–76.
71. Николаева В. 1982. Каталические свойства биологическая активность аденилатдезминазы, продуцируемой *Penicillium lanoso-viride* 8D. Дисертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук, Рига, ЛГУ.
72. Anonīms A. 2016. Examples for EndoTrap applications from our customers.
http://www.hyglos.de/uploads/tx_sbdwdownloader/Customer-Applications-Endotoxin-Removal-0114.pdf
73. Anonīms B. 2016. EndoTrap® Frequently Asked Questions (FAQ).
<http://www.hyglos.de/en/products-services/products/endotoxin-removal/faq.html>
74. Anonīms C. 2016. Frequencies of Cell Types in Human Peripheral Blood.
http://www.stemcell.com/~media/Files/wallchart_CellTypes_WEB.pdf
75. World Health Organization. 2013. Fact sheet No. 312.
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/>.
76. World Health Organization. 2014. Data and Statistics.
<http://www.euro.who.int/en/health-topics/noncommunicable-diseases/diabetes/data-and-statistics>.

PIELIKUMI

1. pielikums

PBS šķīdinātu AMPD (A) un LPS (B) skenējošās elektronmikroskopijas attēli.

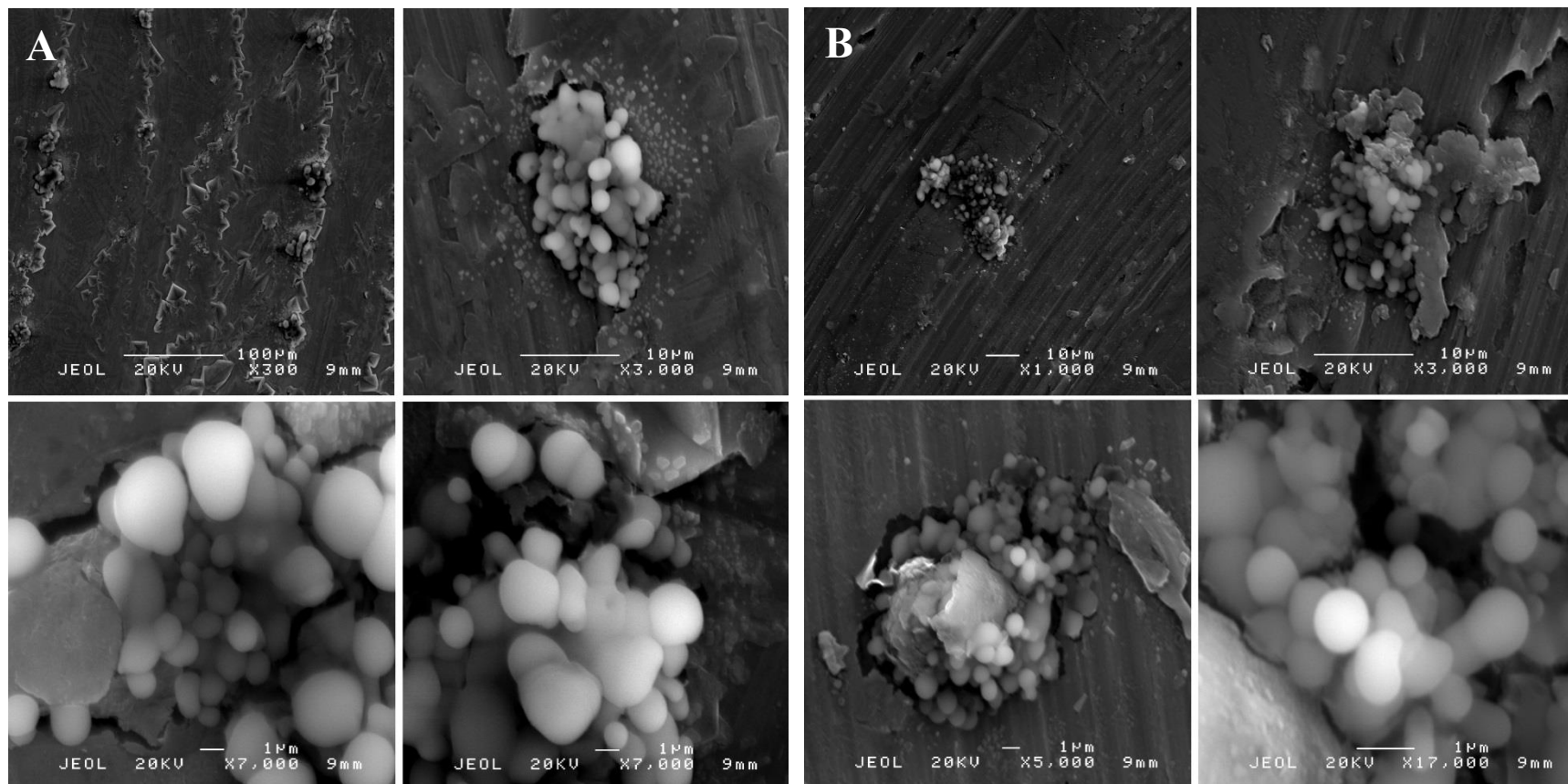
Scanning electronmicroscopy images of AMPD (A) and LPS (B) dissolved in PBS.



2. pielikums

BSA skenējošās elektronmikroskopijas attēli. A – BSA šķīdums PBS. B – BSA šķīdums destilētā ūdenī.

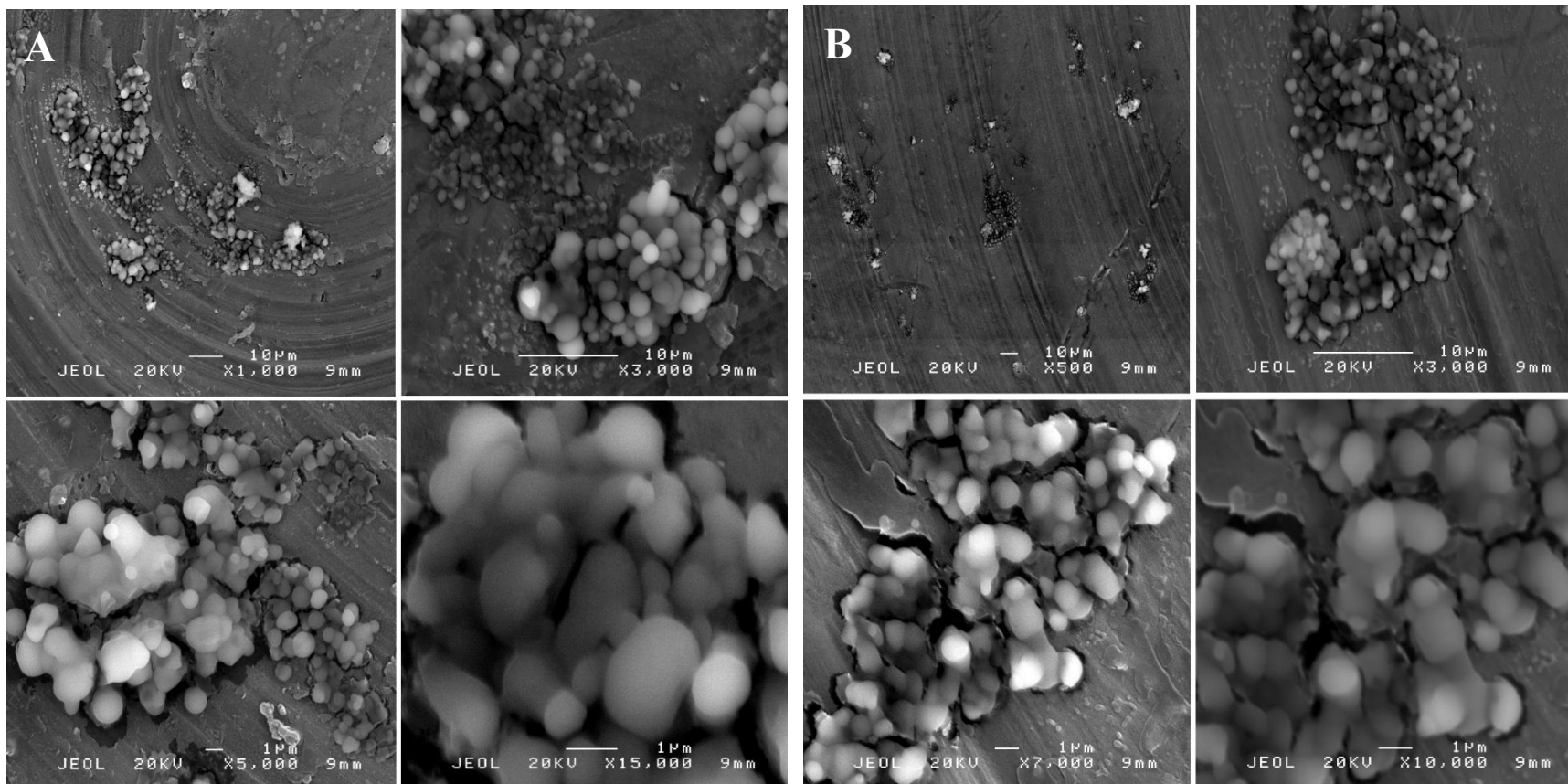
Scanning electronmicroscopy images of BSA. A – BSA solution in PBS. B – BSA solution in distilled water.



3. pielikums

LPS skenējošās elektronmikroskopijas attēli. A – LPS 10 $\mu\text{g/mL}$ B – LPS 1 $\mu\text{g/mL}$.

Scanning electronmicroscopy images of LPS. A – LPS 10 $\mu\text{g/mL}$ B – LPS 1 $\mu\text{g/mL}$.



Maģistra darbs “Dabīgu imūnmodulatoru kvalitātes kontroles metožu izvērtējums un stimulējošās iedarbības salīdzinājums ar baktēriju endotoksīnu” izstrādāts LU Bioanalītisko un biodozimetrijas metožu laboratorijā un LU Bioloģijas fakultātes Mikrobioloģijas un biotehnoloģijas katedrā.

Ar savu parakstu apliecinu, ka pētījums veikts patstāvīgi, izmantoti tikai tajā norādītie informācijas avoti un iesniegtā darba elektroniskā kopija atbilst izdrukai.

Autors: Agija Lāce _____ 07.06.2016.

Rekomendēju darbu aizstāvēšanai

Vadītājs: Dr. h. biol. Indriķis Muižnieks _____ 07.06.2016.

Recenzents: _____ Dr. biol. Nils Rostoks

Darbs iesniegts Mikrobioloģijas un biotehnoloģijas katedrā 09.06.2016.

Metodiķe: _____

Darbs aizstāvēts bakalaura gala pārbaudījuma komisijas sēdē

14.06.2016. prot. nr. _____, vērtējums _____

Komisijas sekretārs: _____