

LATVIJAS UNIVERSITĀTE
BIOLOĢIJAS FAKULTĀTE
MIKROBIOLOĢIJAS UN BIOTEHNOLOĢIJAS KATEDRA

EKSTRACELULĀRĀ MATRIKSA SINTĒZES UN
DEGRADĀCIJAS LOMA ĀDAS DZĪŠANĀ UN TĀS
ANALĪZE BIOTEHNOLOĢISKI VEIDOTOS ĀDAS
AUDOS

Maģistra darbs

Darba autors: Liene Pirtiece
Stud. apl. Nr.: lp10099
Darba vadītājs: Dr. biol. Inese Čakstiņa
Darba konsultants: Mag. biol. Anna Ramata-Stunda

RĪGA 2015

KOPSAVILKUMS

Darba mērķis ir izstrādāt ādas audu modeli *in vitro*, balstītu uz ādas šūnu kokultūru kultivēšanu trīsdimensionālā fibrīna matriksā, kā arī noteikt izveidotajos audos ekstracelulārā matriksa (ECM) komponentu sintēzi un degradāciju. Papildus tika ievākti arī hronisku brūču eksudātu paraugi, kuriem tika veikta dažādu – ar brūču dzīšanu saistītu marķieru analīze. Mērķa sasniegšanai tika izmantotas šūnu, molekulārās bioloģijas un imunoloģijas metodes.

Darbā iegūtie rezultāti parāda ECM komponentu, to degradējošo enzīmu un augšanas faktoru produkcijas izmaiņas audu kultivēšanas laikā un ļauj izvēlēties optimālu ādas audu modeļsistēmas veidošanas un kultivēšanas metodiku.

Darbs tika izstrādāts Paula Stradiņa Klīniskās universitātes slimnīcas Šūnu transplantācijas centra laboratorijā, Latvijas Universitātes Mikrobioloģijas un biotehnoloģijas katedrā un Latvijas Universitātes Bioanalītisko un biodozimetrijas metožu laboratorijā no 2013. gada septembra līdz 2015. gada maijam.

Atslēgas vārdi: 3D ādas audu modelis, ekstracelulārais matrikss, kokultūras, eksudāti, brūču dzīšana, augšanas faktori

SUMMARY

The aim of this study is the generation of a skin tissue model *in vitro*, based on co-cultivation of fibroblasts and keratinocytes in a three-dimensional (3D) fibrin scaffold. Additionally, the synthesis and degradation of extracellular matrix (ECM) components were determined in these models. Chronic wound (ulcer) exudates were also analysed. Methods of immunology, molecular and cell biology were used.

Results in this study show the changes in the production of ECM components, its degrading enzymes and growth factors during the tissue cultivation period and also allow selecting an optimal method for the development and cultivation of skin tissue model-systems.

This study was done in Cell Transplantation Centre of Pauls Stradin's Clinical University Hospital, Chair of Microbiology and Biotechnology and Laboratory of Bioanalytical and Biodosimetry methods of University of Latvia from September 2013 to May 2015.

Key words: 3D skin tissue model, extracellular matrix, co-cultures, exudates, wound healing, growth factors

SATURS

Ievads	5
Saīsinājumi	7
1. Literatūras apskats	8
1.1. Ādas uzbūve un fizioloģija.....	8
1.2. Ādas bojājumi, to dzīšana un ar tiem saistītie iekaisuma marķieri	10
1.2.1. Brūču iedalījums	10
1.2.2. Brūču dzīšanas process.....	11
1.2.3. Hroniskas brūces	17
1.3. Ādas audu inženierija.....	19
1.3.1. Ādas audu izmantošana <i>in vitro</i> testēšanā.....	22
2. Materiāli un metodes	24
2.1. Šūnu līnijas.....	24
2.2. Biomateriāli.....	24
2.3. Hronisku brūču eksudātu iegūšana.....	24
2.4. Šūnu izdalīšana un kultivēšana monoslānī.....	24
2.5. Šūnu pārsēšana.....	25
2.6. Kokultūru kultivēšana 3D fibrīna matriksā un tā sagatavošana	25
2.7. 3D fibrīna matriksa fiksēšana.....	26
2.8. 3D fibrīna matriksa paraugu griešana	27
2.9. Deparafinizēšana	27
2.10. Imunofluoroķīmija	27
2.11. Sekretēto proteīnu noteikšana ar ELISA/xMAP metodi.....	28
2.12. Western Blotting	28
2.13. Laikā novērojamais PCR (real-time PCR).....	30
2.14. Šūnu dzīvotspējas noteikšana ar MTT testu.....	31
2.15. Datu apstrāde un statistiskā analīze.....	31
3. Rezultāti	32
3.1. Sekretēto MMP un TIMP analīze.....	32
3.2. Strukturālo proteīnu un augšanas faktoru gēnu ekspresijas analīze.....	37
3.3. Strukturālo proteīnu sintēzes analīze.....	39
3.4. Hronisku brūču iekaisuma modelēšana.....	41
3.4.1. Testēšanā izmantotie eksudāti.....	41
3.4.2. Audu dzīvotspējas ietekme.....	42
4. Diskusija.....	45
4.1. Ādas struktūrproteīnu un ar brūču dzīšanu saistīto iekaisumu marķieru detekcijas izmaiņu novērtēšana biotehnoloģiski veidotos ādas audos.....	45
4.2. Hronisku venozo čūlu eksudātu sekretēto marķieru analīze	49
4.3. Eksudātu ietekme uz biotehnoloģiski veidotu ādas audu dzīvotspēju	50
5. Secinājumi	52
6. Pateicības	53
7. Literatūras saraksts	51
PIELIKUMI	61

IEVADS

Lielākais cilvēka orgāns ir āda, kuras svarīgākās funkcijas ir aizsardzība pret ārējās vides faktoriem un homeostāzes nodrošināšana. Tā bieži tiek traumēta un normālu funkciju nodrošināšanai ir svarīgi izprast tās atjaunošanās mehānismus. Izpratne par šiem mehānismiem sniedz iespējas pilnveidot brūču aprūpes un ārstēšanas metodes. Būtiska loma ir ādas dermālā slāņa ekstracelulārajam matriksam. Klīniskajos pielietojumos ir būtiski, lai biotehnoloģiski veidoti audi saturētu šūnu migrācijai un proliferācijai atbilstošas struktūras un kompozīcijas matriksu. Savukārt, *in vitro* testēšanas gadījumā nereti pastāv nepieciešamība novērtēt pārbaudāmo vielu ietekmi uz ekstracelulārā matriksa komponentiem.

Biotehnoloģiski veidoti ādas audi tiek izmantoti gan audu transplantācijās pēc apdegumiem vai nedzīstošu brūču un čūlu gadījumā, gan arī bioloģiski aktīvu vielu *in vitro* testēšanā. Abu šo izmantošanas veidu vajadzībām ir nepieciešams, lai kultivētie ādas audi būtu funkcionāli un morfoloģiski līdzīgi cilvēka ādai.

Līdz šim zinātniskajā literatūrā reti ir aprakstītas ekstracelulārā matriksa izmaiņas biotehnoloģiski veidotu audu kultivēšanas laikā, kā arī trūkst informācijas par matriksu degradējošo enzīmu un to inhibitoru ekspresijas un sekrēcijas izmaiņām dermālo fibroblastu kultivēšanas monokultūrā laikā. Ekstracelulārā matriksa sekretēto marķieru analīze dermas fibroblastu kultūrās, pirmkārt, ļaus noteikt optimālās primāro šūnu kultūru pasāžas, kas efektīvi izmantojamas ādas audu veidošanai un kultivēšanai. Otrkārt, ņemot vērā ekstracelulārā matriksa būtisko lomu ādas audos, tā komponentu (elastīna, kolagēna), metalloproteināžu un to inhibitoru izmaiņu novērtēšana ļaus izvērtēt uz fibrīna matriksu balstītu ādas audu kultūru izmantošanas potenciālu dažādiem pielietojumiem klīnikā vai testēšanā.

Darba mērķis – noteikt ekstracelulārā matriksa komponentu sintēzi un degradāciju ādas audos, kas veidoti, izmantojot fibrīna matriksu.

Lai sasniegtu darba mērķi tika izvirzīti šādi uzdevumi:

1. Izmantojot fibrīna matriksu, veidot gan dermālo, gan dermo-epidermālo ādas audu kultūras.
2. Novērtēt matriksa metalloproteināžu (MMP) un to audu inhibitoru (TIMP) sekrēcijas un ekspresijas izmaiņas audu veidošanai izmantojamo dermālo fibroblastu līnijās kultivēšanas monoslānī un fibrīna matriksā laikā.
3. Analizēt kolagēna, elastīna un citokeratīna saturu biotehnoloģiski veidotots ādas audos ar imunohistoķīmijas metodi.

4. Noteikt un analizēt kolagēna un laminīna saturu biotehnoloģiski veidotos ādas audos ar imunoblotēšanas metodi.
5. Noteikt gēnu ekspresijas līmeņus biotehnoloģiski veidotos audos un ādas biopsiju paraugos ar laikā novērojamo polimerāzes ķēdes reakcijas metodi.
6. Noteikt MMP, TIMP, citokīnu un ar angiogēnēzi saistīto augšanas faktoru koncentrācijas un ekspresijas līmeni ādas hronisku brūču eksudātu paraugos, kas saņemti no pacientiem.
7. Analizēt brūču eksudātu izraisītās izmaiņas *in vitro* kultivētos audos.

SAĪSINĀJUMI

- BSA** – liellopu seruma albumīns (*Bovine Serum Albumin*)
- cDNS** – komplementārā DNS
- Col1A1** – I tipa kolagēns
- CTGF** – saistaudu augšanas faktors (*Connective Tissue Growth Factor*)
- DMEM** – Dulbeko modificēta Īgla vide (*Dulbecco's Modified Eagles Medium*)
- DTT** – ditiotreitols
- ECM** – ekstracellulārais matrikss
- EDGS** – EpiLife kultivēšanas vides papildus piedevas
- EDTA** – etilēndiamintetra etiķskābe
- EGF** – epidermālais augšanas faktors (*Epidermal Growth Factor*)
- FBS** – fetālais teļa serums (*Fetal Bovine Serum*)
- FGF** – fibroblastu augšanas faktors (*Fibroblast Growth Factor*)
- FKV** – fibroblastu kultivēšanas vide
- GAPDH** – glicerāldehīd-3-fosfāt dehidrogenāze
- GF** – augšanas faktors (*Growth Factor*)
- HAS2** – hialuronskābes sintāze 2 (*Hyaluronan Synthase 2*)
- HGF** – hepatocītu augšanas faktors (*Hepatocyte Growth Factor*)
- IGF** – insulīnam līdzīgais augšanas faktors (*Insulin-like Growth Factor*)
- IL** – interleikīns
- IVL** – involukrīns
- KKV** – keratinocītu kultivēšanas vide
- MMP** – matriksa metalloproteināzes
- PA** – plazminogēna aktivators
- PBS** – fosfātu sāļu šķīdums (*Phosphate Buffered Saline*)
- PCR** – polimerāzes ķēdes reakcija (*Polymerase Chain Reaction*)
- PDGF** – no trombocītiem iegūtais augšanas faktors (*Platelet Derived Growth Factor*)
- PIC** – proteāžu inhibitoru maisījums (*Protease Inhibitor Cocktail*)
- PVDF** – polivinilidīna difluorīds
- SDS** – anjonu deģenerējošs deterģents – nātrija dodecilsulfāts
- TBST** – Tris bufera un Tween 20 šķīdums
- TGF** – transformējošais augšanas faktors (*Transforming Growth Factor*)
- TIMP** – matriksa metalloproteināžu audu inhibitori
- TNF** – tumora nekrozes faktors (*Tumor Necrosis Factor*)
- Tris** – trishidroksimetilaminometāns
- VEGF** – vaskulārā endotēlija augšanas faktors (*Vascular Endothelial Growth Factor*)

1. LITERATŪRAS APSKATS

1.1. Ādas uzbūve un fizioloģija

Āda ir kompleksa orgānu sistēma, kurai piemīt daudz svarīgu funkciju. Tā darbojas kā aizsargbarjera pret ārējiem faktoriem vai bojājumiem, veicot specifiskas un nespecifiskas organisma aizsargreakcijas, kā arī uztur vienmērīgu ķermeņa temperatūru jeb termoregulācijas funkciju. Āda veic receptoro un saziņas ar apkārtējo vidi funkciju, atbrīvojas no atkritumproduktiem, piemēram, svīšanas procesā un sintezē D vitamīnu, ļaujot ķermenim uzņemt fosforu un kalciju (Fuchs 2009, Stephen *et al.* 2010). Ārējais audu slānis ļauj ķermenim saglabāt savu formu, bet traumu gadījumā to ir grūtāk atgūt iepriekšējā stāvoklī. Ādā uzgalbājas gan tauki, gan ūdens. Ādai ir svarīga loma imunitātes nodrošināšanā pret slimībām (Walsh 2011). Darbojoties endokrīnai funkcijai, kopā ar sviedriem izdalās ne tikai ūdens, bet arī dažādi sāļi un atsevišķas organiskas vielas. Vēl viena svarīga ādas funkcija ir organisma aizsargāšana no ultravioletā starojuma (Markovs 2005).

Tiek uzskatīts, ka āda ir lielākais cilvēka ķermeņa orgāns, un sastāda ap 16 % no kopējā ķermeņa svara. Pieaugušam indivīdam kopējais ādas laukums aizņem aptuveni 1,5 – 2 m². Īpaši svarīgi zināt ādas anatomiju un izprast tās fizioloģiju ir medicīnas personālam, kas nodarbojas ar ādas transplantātiem, traumām vai apdegumiem, lai atbilstoši varētu to aprūpēt vai sadziedēt (Stephen *et al.* 2010, Venus *et al.* 2011). Piemēram, hronisku brūču aprūpē īpaši jāpievērš uzmanība ir brūces raksturošanai, kas tālāk arī nosaka pārējo ārstēšanas gaitu – sākot ar brūču attīrīšanu un beidzot ar materiālu izvēli brūces pilnīgai aizvēršanai un izārstēšanai (Kapickis *et al.* 2010).

Ādu veido divi galvenie audu slāņi – epiderma un derma. Epiderma ir termināli diferencējies plakanšūnu epitēlijs, kura pamata šūnu tips ir keratinocīti (Venus *et al.* 2011). Zem epidermas atrodas saistaudi jeb dermas slānis, kurš ir atdalīts ar 1 μm biezu bazālo membrānu, kuras sastāvu veido tīklains IV tipa kolagēns, glikoproteīni – laminīns, fibronektīns, entaktīns, kā arī heparāns un dažādi proteoglikāni. Bazālajai membrānai svarīga loma ir šūnu adhēzijā, to dalīšanās, migrācijā, kā arī diferenciacijas procesos (Hasegawa *et al.* 2007).

Epidermu veido pieci, morfoloģiski atšķirīgi epitēlija slāņi – bazālais (sastāv no melanocītiem un keratīna, dodot šūnām pigmentāciju un izturību), dzeloņainais, graudainais, spīdošais un raga slānis (ārējais slānis). Keratinocīti epidermā ir līdz 95%, savukārt pārējos šūnu tipus epidermā sastāda T-limfocīti, melanocīti, Langerhansa un Merkela šūnas (Jarvis 2007).

Epidermas šūnas regulāri atjaunojas, šī reģenerācija savukārt ir atkarīga no dermālā šūnu slāņa, kas apgadā keratinocītus ar asinīm un svarīgām uzturvielām. Brīdī, kad bazālajā slānī sāk veidoties jauna keratinocīta šūna, tā tiek virzīta augšup cauri visiem pārējiem epidermas slāņiem, tādējādi izejot pakāpenisku diferenciaciju jeb keratinizāciju. Svarīgi minēt, ka keratinocītu proliferāciju stimulē makrofāgi (Jarvis 2007, Rodero and Khosrotehrani 2010). Ādā epidermālais slānis tiek pilnībā nomainīts ik pa četrām nedēļām, keratinocītiem migrējot un transformējoties aptuveni 28 dienu laikā. Apkārtējās vides faktoru ietekmē keratinocīta citoplazmā aktivizējas fermenti, kuru darbības rezultātā graudainā slāņa keratinocīti transformējas par korneocītiem jeb ragšūnām. Keratinizācijas beigu posmā tie saplacinās un ragšūnas pakāpeniski nolobās no ādas virsmas (Beck and Blanpain 2012, Kanitakis 2002).

Dermas augšējais slānis ir savienots ar epidermu, bet iekšējais – zemādas saistaudu taukiem. Dermas biezums variē atkarībā no ķermeņa zonas, kuru tā pārklāj. Fibroblasti, leukocīti, melanocīti, tuklās šūnas, makrofāgi, Langerhansa šūnas un ekstracelulārais jeb ārpusšūnas matrikss (ECM) veido dermas slāni. ECM sastāv lielākoties no kolagēna šķiedrām, kā arī citām šūnu sekretētām molekulām, kas pasargā ķermeni no mehāniskiem bojājumiem (Venus *et al.* 2011). Papilārā derma ir šaurais virsējais dermas slānis, kurš integrējas ar epidermas slānī, veidojot kārpveida izliekumus. Šim slānim raksturīgas daudz fibroblastu šūnas un kapilāri, kā arī elastīna un kolagēna matrikss. Dziļāk ādā atrodas tīklainais dermas slānis, kas sastāda 80% dermas. Šajā slānī atrodas tauku, sviedru dziedzeri un matu folikuli (Kanitakis 2002). Jebkāds dziļāks bojājums, kas skar šo tīklainās dermas slāni, parasti nenovēršami radīs rētu veidošanos. Lielas traumas gadījumos, lai varētu atbilstoši nodrošināt pienācīgu dzīšanu, būtu nepieciešami pilna biezuma transplantāti vai loksnes (Gantwerker and Hom 2012).

Mezenhimālās izcelsmes fibroblasti sintezē kolagēna, elastīna šķiedras un ECM glikoproteīnus un proteoglikānus, kas piedalās ādas atjaunošanās un brūču dzīšanas procesos, kā arī vispārīgi nodrošina ādas audu struktūru, mehānisko izturību un elastību. Kolagēns ādā sastāda 75% sausās masas. Pirmā (I) un trešā (III) tipa kolagēns ir visbiežāk sastopamie kolagēna tipi, kas nodrošina ādas audu mehānisko izturību (Markovs 2005, Venus *et al.* 2011). Bazālajā membrānā vairāk ir ceturtais (IV) un septītais (VII) tipa kolagēni, nodrošinot epidermas piestiprināšanos pie dermas. Savukārt ādas elastību nodrošina elastīna šķiedras (Kanitakis 2002).

ECM ir kompleksa struktūra, kas satur kopā un balsta organisma šūnas. Tas sastāv no trīs noteicošām biomolekulu klasēm, kas ir strukturālie proteīni (kolagēns, elastīns), specializētie proteīni (fibronektīns, laminīns, hialuronskābe) un proteoglikāni. Šūnu savstarpējā un šūnu-ECM

mijiedarbība diktē to spēju veidot audus un saglabāt tiem raksturīgās funkcijas (Tuan *et al.* 1994, Voinchet *et al.* 2006). ECM galvenā sastāvdaļa ir proteīns kolagēns, kas ir atrodams visos saistaudu veidos. Kolagēnam ir laba bioietilpība, zema mehāniskā izturība un antigenitāte, kā arī liels potenciāls tikt apvienotam ar citām vielām, kas spēj to padarīt izturīgāku vai mainīt tā degradācijas laiku (Mohamed and Xing 2012). Hialuronskābe ir ECM komponents – mukopolisaharīds, kuru sintezē fibroblasti un keratinocīti, kas veicina jeb stimulē akūtu brūču dzīšanu, kā arī ir iesaistīts ādas homeostāzes regulēšanā (Voinchet *et al.* 2006). ECM ir novērojams arī fibrīns, kas ir ādas proteīna fibrinogēna polimērs (Weijers *et al.* 2010).

Kā trešo ādas slāni mēdz pieskaitīt zemādu jeb hipodermu. Zemādas saistaudi nodrošina ādas kustīgumu. Hipodermā ir ļoti daudz taukšūnu, kas veido taukaudus, kuri savukārt noslāpē pārmērīgus mehāniskus kairinājumus, tādējādi arī pasargājot iekšējos orgānus no nevēlamām traumām. Galvenās hipodermas šūnas ir adipocīti. Hipoderma pilda arī endokrīnas funkcijas, sekretējot dažādus citokīnus un proteīnus, papildus nodrošinot arī hormonu metabolismu (Kershaw *et al.* 2004).

Svarīgi pieminēt, ka ādā vēl ir novērojamas audu pārveides, kas ir nagi un mati. Nagi kalpo, lai pasargātu pirkstu galus un uzlabotu taktilo sajūtu, savukārt matu funkcijas tiek asociētas ar termoregulāciju. Abas pārveides sastāv no keratīna. (Stephen *et al.* 2010, Venus *et al.* 2011).

1.2. Ādas bojājumi, to dzīšana un ar tiem saistītie iekaisuma marķieri

1.2.1. Brūču iedalījums

Brūce ir ievainojums, kurš rodas relatīvi ātri brīdī, kad āda tiek plēsta, sagriezta vai citādi ievainota. Lai zinātu, kā pareizi ārstēt brūci ir nepieciešams mācēt noteikt, ar kāda tipa brūci ir saskarsme. To iedalījums ir salīdzinoši plašs. Brūces var iedalīt atvērtās, kuras savukārt attiecīgi iedala pēc veida, kādā brūce ir iegūta (durtas, kostas, šautas, grieztas, utt.) un slēgtās brūcēs – uzsitumu gadījumā, kad traumēts ir dermas slānis (piemēram, hematomas). Atkarībā no tā, kāds ir brūču inficēšanās līmenis, tās var klasificēt kā tīras, potenciāli kontaminētas, kontaminētas un kolonizētas brūces (Thomas and Wysocki 1990).

Kopumā brūcēm piemīt sarežģīta struktūra, un tās satur dažādus audu tipus – atmirušos brūču audus, kreveles, granulācijas un epitelizācijas audus, kā arī cīpslas un asinsvadus. Katrai struktūrai ir specifisks raksturojums un īpašības (Fauzi *et al.* 2015).

Pie ādas brūcēm pieskaita arī čūlas, kas ir ādas trauma jeb defekts bez manāmām dzīšanas pazīmēm. Šāda brūču tipa dzīšana norisinās ļoti ilgstoši. Čūlas var iedalīt pēc dažādām pazīmēm – atrašanās vietas vai citas specifikas, bet visplašāk izmantotais iedalījums ir akūtās un hroniskās čūlas. Akūtas brūces pārsvarā ir acīmredzamas pēc to izcelsmes – kā tās ir iegūtas, bet hronisku brūču izraisošie faktori var būt mazāk skaidri. Bieži vien čūlas lokācijas vieta ir indikators par tās cēloni. Hroniskās brūces mēdz dēvēt arī par trofiskām čūlām – tām raksturīgs palēnināts vai iztrūkstošs dzīšanas process. Pie akūtām brūcēm ir pieskaitāmas tīrās jeb operāciju brūces, kas ir primāri dzīstošas, kā arī potenciāli kontaminētās un kontaminētās brūces. Salīdzinājumā ar hroniskām brūcēm, akūtās brūcēs tiek ekspresēti vairāki augšanas faktori (GF), kas būtiski palīdz dzīšanas procesā (Greaves *et al.* 2013, Stephen *et al.* 2010).

1.2.2. Brūču dzīšanas process

Brūču dzīšana ir komplekss process, kas sastāv no vairākiem etapiem: iekaisums, dermālā rekonstrukcija un rētu remodelēšana, kas sākas tūlīt pēc traumas rašanās un var noritēt pat mēnešiem un gadiem ilgi (Romana-Souza *et al.* 2015).

Faktori, kas aktīvi ietekmē brūču dzīšanu ir mitrums, skābeklis un siltums. Ja brūces malās esošās šūnas, sviedru dziedzeri vai matu folikuli izžūst, tad jaunām šūnām ir grūtāk migrēt brūcē, tādēļ brūcei ir nepieciešams mitrums. Šūnu mitozes optimālā temperatūra ir 37°C, līdz ar to arī attiecīgs siltums ir svarīgs dzīšanas procesā (Kapickis *et al.* 2010). Skābeklim ir multifunkcionāla loma brūču dzīšanā, ieskaitot ietekmi uz šūnu proliferāciju, kolagēna sintēzi, angiogēnēzi un baktēriju iznīcināšanu. Skābekļa trūkums ir svarīgs faktors hronisku brūču patoģenēzē, jo kavē normālu šūnu proliferāciju. Ja brūces virsma ir sausa, tad asinsapgāde ir ierobežota, kas savukārt kavē skābekļa un barības vielu piekļuvi brūcēs (Kapickis *et al.* 2010, Xie *et al.* 2014).

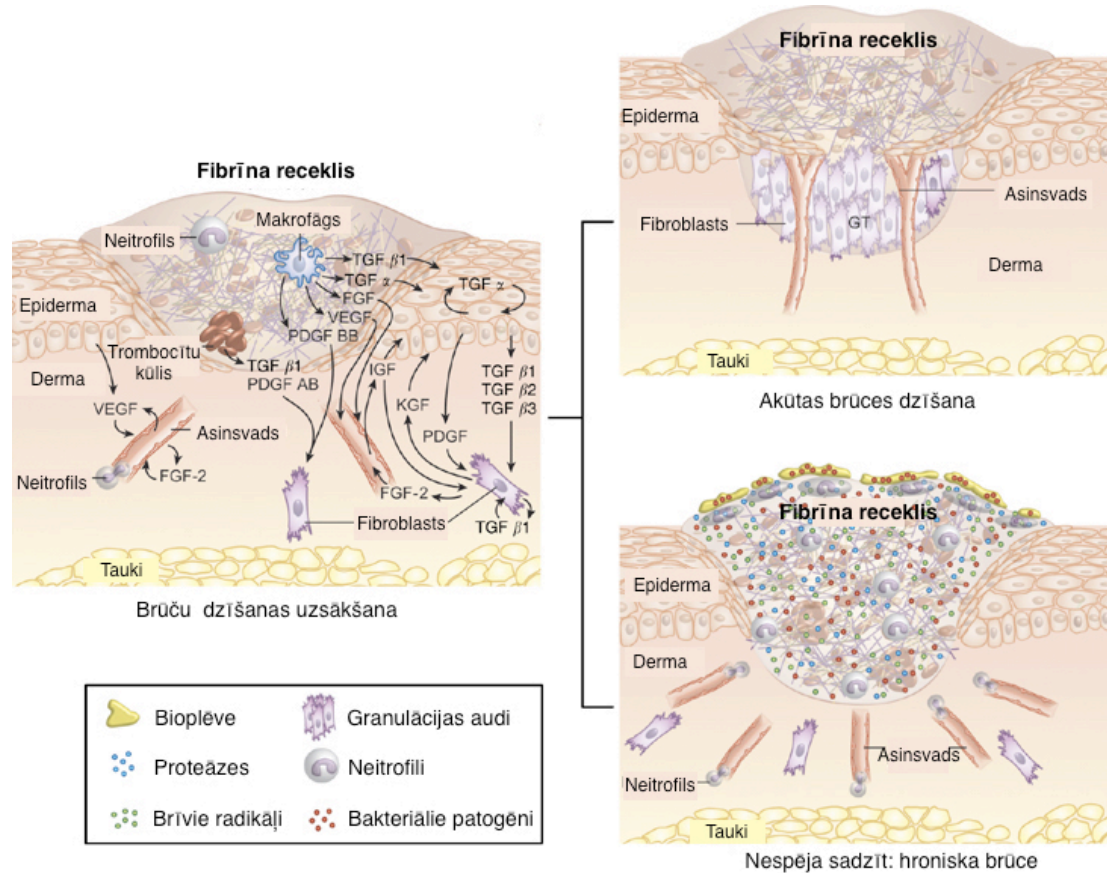
Audu dzīšanu iedala vairākās stadijās – primārā dzīšana (tīras, ķirurģiskas brūces) notiek, kad tīras brūces malas tiek primāri satuvinātas. Sekundārā (spontānā) dzīšana notiek, kad brūce dzīst spontāni, netiekot satuvināta. Šī dzīšana balstās uz brūces kontrakciju un epitelizāciju, tā ir atkarīga no iekaisuma fāzes. Jo ilgāka ir iekaisuma fāze, jo vairāk brūce kontrahējas, līdz ar to radusies rēta ir neglītāka un kropļojošāka. Terciārā dzīšana ir brūces novēlota dzīšana, kad brūce tiek slēgta tikai pēc vairākām dienām, un sekundārā dzīšana tiek pārtraukta. Dzīšanas process var notikt brīdī, kad brūcē ir izveidojušies veselīgi granulācijas audi un mikroorganismu skaits nav lielāks par 10^5 . Virspusēju ādas bojājumu gadījumā galvenais audu atjaunošanās mehānisms ir epitelijšūnu dalīšanās un migrācija (Kapickis *et al.* 2010).

Tradicionāli akūtas brūces dzīšana tiek iedalīta četrās savstarpēji saistītās fāzēs – hemostāzē, iekaisuma, proliferatīvā un remodelēšanās fāzēs (Greaves *et al.* 2013). Brūču dzīšanas fāzu klasifikācija palīdz identificēt dzīšanas stadiju:

- Hemostāze sākas tūlīt pēc ievainojuma, un tajā esošie procesi ilgst dažas minūtes līdz pat vairākām stundām. Hemostāzē tiek stimulēta asinsvadu noslēgšanās un fibrīna recēšana. Traumas neskartie asinsvadi ir noteicošie asins recēšanas kontrolēšanā. Primārajā hemostāzē traumētās asinsvadu endotēlija šūnas izdala adenozin difosfātu (ADP), kas piesaista trombocītus un liek tiem, veidojot kunkuļus, pielipt pie traumētās vietas, tādējādi noslēdzot asinsvadus. Sekundārajā hemostāzē audu faktoru kaskādes atbild par kalcija atkarīgo plazmas recēšanu un asinsvadu sašaurināšanos. Šūnas izdala heparīnam līdzīgu molekulu un trombomodulīnu, kas kopīgi piedalās recekļa izveidē, kura struktūra savukārt veido tīklu, kurš sastāv no ECM komponentiem – fibrīna un vitronektīna. Principā hemostāzē veidojas trombi un notiek asins recēšana. Hemostāzes beigās tiek izdalīti divi svarīgi augšanas faktori – PDGF un TGF- β , kuri tālāk ierosina nākamo dzīšanas (iekaisuma) fāzi (Marieb and Hoehn 2009, Stocum 2012).
- Iekaisums ir adaptīva imūnās sistēmas atbilde uz ievainojumu šūnu stresa rezultātā (Stocum 2012). Iekaisuma fāze ilgst 2 – 7 dienas. Tās laikā makrofāgi iznīcina baktērijas. Fāze turpinās līdz pati brūce ir epitelizēta (sekundāri vai terciāli dzīstošas brūces). Neitrofili un monocīti migrē uz recekli, kur tie iekļūst caur fibrīna matriksu un piesaista dažādus iekaisuma citokīnus, kas primāri tiek producēti trombocītos un endotēlija šūnās (Kapickis *et al.* 2010, Rodero and Khosrotehrani 2010). Receklī monocīti diferencējas par makrofāgiem. Pēc piektās dienas makrofāgi brūcē ir noteicošās šūnas, tie sekretē PDGF un TGF- β un citus hemoatraktantus. Neitrofilu un makrofāgiem ir arī liela nozīme kolagēna noārdīšanā, jo tie izdala matriksa metalloproteināzes – kolagenāzes (MMP-1 un MMP-8). Viens no neitrofilu un makrofāgu galvenajiem uzdevumiem ir atbrīvoties no brūcē iekļuvušajām baktērijām. Abiem šūnu tipiem ir limitēts dzīvošanas laiks brūces zonā, ko nodrošina apoptoze. Makrofāgu apoptozi inducē VEGF. Nepārtraukta šūnu vairošanās, kas ir iespējama konkrētos patoloģiju gadījumos, noved pie hronisku audu ievainojumiem, nekrozes un pārlietu izteiktas rētošanās (Stocum 2012). Iekaisuma fāze uzsāk strukturālo ādas atjaunošanos, ierosinot epidermālo reģenerāciju. Fāzes beigās uz brūces vietu

pārvietojas T-limfocīti un sākas pārklāšanās ar nākamo – proliferatīvo fāzi (Marieb and Hoehn 2009, Stocum 2012).

- Proliferatīvā fāze sākas no otrās dienas un ilgst līdz pat sešām nedēļām, šīs fāzes laikā norisinās granulācijas audu formēšanās, epitelizācija, fibroblasti sāk producēt kolagēnu un veidojas jauni kapilāri. Fibroblastu šūnas ir noteicošās šajā fāzē, atbildot par angiogēnēzes sākšanos. Augšanas faktori, it īpaši PDGF un TGF- β , kopā ar ECM molekulām stimulē fibroblastu proliferāciju brūces zonā, aktivējot attiecīgos integrīna receptorus. Samazinoties bojājuma izmēriem, brūces malas satuvinās, un tās pamatni nosedz epitēlijšūnas (Gantwerker and Hom 2012, Singer and Clark 1999). Šūnu virzībai fibrīna-asins receklī jeb cieši saaustā ECM nepieciešama aktīva proteolītiska sistēma, kas ir spējīga atbrīvot ceļu šūnu migrācijai. Šo darbību nodrošina vairāki fibroblastiem atvasināti enzīmi kopā ar serumā esošo plazmīnu, plazminogēna aktivatoru, kolagenāzēm, želatināzi A un stromelizīnu. Pēc migrācijas brūcē fibroblasti uzsāk ECM sintēzi. Pagaidu ECM tiek aizvietots ar kolagēna matriksu. Kad bagātīgais kolagēna matrikss deponējas brūces vietā, tad fibroblasti pārtrauc producēt kolagēnu, un ar fibroblastiem bagātie granulācijas audi tiek aizvietoti ar relatīvi acellulāru rētu (Singer and Clark 1999).
- Remodelēšanās fāze ilgst, sākot ar sešām nedēļām, līdz diviem gadiem. Tā sākas, kad kolagēna sintēze ir līdzsvarā ar noārdīto kolagēnu. Kolagēna šķiedru sasaistīšanās rezultātā rēta tiek izgludināta. Fibroblasti diferencējas par miofibroblastiem, un fāzes beigās normālos audus aizstāj rētaudi. Šūnas, kas vairāk nav nepieciešamas, tiek iznīcinātas apoptozes procesā (Gantwerker and Hom 2012, Kapickis *et al.* 2010).



1.2.2. attēls. Akūtas un hroniskas brūces dzīšana (Clark *et al.* 2007).

Figure 1.2.2. Acute and chronic wound healing (Clark *et al.* 2007).

Jebkuras audu traumas rezultātā notiek akūta brūču dzīšanas atbilde, savukārt infekciju vai citu patoloģiju gadījumā šī atbilde var nenotik un veidosies hroniska brūce. Brūču dzīšanas laikā epidermas šūnām raksturīga pastiprināta iekaisuma citokīnu produkcija – nelielos daudzumos tiek producēti interleikīni un koloniju stimulējošie faktori, kas nodrošina imūno šūnu piesaisti brūces vietai. Sintezēti tiek gan augšanas faktori (GF), gan matriksa metalloproteināzes un to inhibitori. Patoģiju gadījumā pastiprināti izdalās šķidrums un sarecē fibrīns. Augstais glikozes līmenis asinīs, kas ir raksturīgs diabēta pacientiem, veicina ECM disfunkciju, izraisot audu hipoksiju, izmainītu šūnu funkcionalitāti vai to nāvi. Baktēriju infekcijas gadījumā – veidojas bioplēve, kas traucē dzīšanas procesus, baktēriju izdalītie toksīni iznīcina šūnas, ECM un GF, kas atbild par šūnu proliferāciju (attēls 1.2.2.). Tādēļ šādu hronisku brūču gadījumā ir traucēta epidermālā migrācija un tiek kavēta iekšējo granulācijas audu veidošanās (Clark *et al.* 2007).

1.2.2. tabula Galvenās molekulas, kas piedalās brūču dzīšanā (Greaves *et al.* 2013, Valluru *et al.* 2011).

Table 1.2.2. The main molecules of wound repair (Greaves *et al.* 2013, Valluru *et al.* 2011).

Molekula	Šūnu avots	
IL	neitrofili, monocīti, makrofāgi, keratinocīti, endotēlija šūnas	IL-1 piedalās ECM noārdīšanā IL-6 raksturīgs iekaisuma fāzē IL-8 ekspresējas iekaisuma un proliferatīvajā fāzēs
TNF- α	neitrofili, monocīti, makrofāgi	GF ekspresijas stimulēšana keratinocītu migrēšanas veicināšana raksturīgs iekaisuma fāzē ECM noārdīšana
EGF	makrofāgi, keratinocīti, fibroblasti, trombocīti	epitelizācijas nodrošināšana raksturīgs proliferatīvajā un remodelēšanas fāzēs ECM noārdīšana
TGF- α TGF- β	monocīti, makrofāgi, keratinocīti, fibroblasti, trombocīti, endotēlija šūnas	leikocītu rekrutēšana TGF- α raksturīgs hemostāzē, iekaisuma un proliferatīvajā fāzēs TGF- β raksturīgs visās brūču dzīšanas fāzēs
HGF	fibroblasti	raksturīgs remodelēšanās fāzē
FGF	makrofāgi, keratinocīti, fibroblasti, trombocīti, fibrocīti, endotēlija šūnas	endotēlija šūnu proliferācija ECM regulēšana bFGF raksturīgs hemostāzē, proliferatīvajā un remodelēšanās fāzēs FGF-2 raksturīgs fibroplāzijas un angiogēneses fāzēs
PDGF	makrofāgi, trombocīti, fibrocīti	leikocītu rekrutēšana raksturīgs visās brūču dzīšanas fāzēs
CTGF	neitrofili, monocīti, fibroblasti, trombocīti, T-šūnas	rētošanās proliferatīvā fāze
IGF	keratinocīti, fibroblasti, dendrītiski epiermālās T-šūnas, kaula smadzeņu mezinhimālās cilmes šūnas	IGF-1 raksturīgs hemostāzē, iekaisuma un proliferatīvajā fāzēs keratinocītu izdzīvošana
VEGF	makrofāgi, keratinocīti, fibroblasti, trombocīti, fibrocīti, miofibroblasti, endotēlija šūnas	endotēlija šūnu migrēšana un proliferācija vaskulārā caurlaidība
Angiopoetīns (Ang)	fibroblasti, miofibroblasti	Ang-1 asinsvadu stabilizēšana un endotēlija šūnu proliferācija Ang-2 ir Ang-1 antagonists
MMP	neitrofili, monocīti, makrofāgi, keratinocīti, fibroblasti, endotēlija šūnas	ECM un kolagēna noārdīšana endotēlija šūnu migrācijas ievirzīšana raksturīgas sākot ar iekaisuma fāzi
TIMP	fibroblasti	TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3, TIMP-4 raksturīgi proliferatīvajā fāzē
PA	monocīti, makrofāgi, keratinocīti, fibroblasti, endotēlija šūnas	urokināzes PA - ECM noārdīšana, MMP un GF aktivēšana audu PA - fibrīna šķīdināšana PA inhibitors-1 - PA aktivitātes regulators, keratinocītu migrēšana
Integrīni	monocīti, keratinocīti, fibroblasti, endotēlija šūnas	raksturīgi sākot ar iekaisuma fāzi.

Šūnu migrācijai ir svarīga loma epidermas slāņa atjaunošanās procesā, kas kopumā atbild par ādas inegrītes rekonstruēšanu pēc traumām. Šūnu migrācijas stimulēšanai un audu atjaunošanai ārpusšūnas matiksā, šūnas sekretē matiksa metalloproteināzes (MMP) – proteolītisku enzīmu grupu, kas spēj šķelt ECM proteīnus. ECM tiek deponēti arī fibroblastu sintezēti GF (Kivisaari 2011, Lorenz and Longaken 2008). Nozīmīgākā fibroblastu funkcija ādas

reģenerācijā ir ECM sintēze un rekonstrukcija. Tradicionālos apstākļos ādā MMP veic matricas molekulu noārdīšanu, tādējādi veicinot ECM remodelēšanu. Paralēli MMP ekspresijai dermas fibroblasti sekretē matricas metalloproteināžu audu inhibitorus (TIMP) (Chen *et al.* 2007). Savukārt keratinocītu sekretēti GF stimulē fibroblastu un keratinocītu proliferāciju, ECM sintēzi, fibroblastu diferencēšanos un citokīnu ekspresiju. Raksturīgie keratinocītu sekretētie GF ir transformējošais augšanas faktors- α (TGF- α) un epidermālās augšanas faktors (EGF) (Pastore *et al.* 2008).

Citokīni ir svarīgas polipeptīdu signālmolekulas, kam ir būtiska nozīme dzīšanas procesā. Tos var iedalīt vairākās grupās. Pirmā grupa ir interleikīni (IL), kuri galvenokārt stimulē imūnsistēmas šūnas un piedalās to augšanas un diferenciacijas norisē. Ādas novecošanās ietekmē un maina monocītu izdalīto IL-1 un IL-6 sekrēcijas aktivitāti. Pārējās citokīnu grupas ir tumora nekrozes faktori (TNF), hemokīni, koloniju stimulējošie faktori (CSF), interferoni (IFN) un GF. Makrofāgu producētā vaskulārā endotēlija augšanas faktora (VEGF) sekrēciju arī būtiski ietekmē ādas novecošanās. Citokīnu producēšana aktīvi norisinās, lai ierobežotu vai nomāktu (principā kontrolētu) dažādu strukturālo proteīnu gēnu ekspresiju un regulētu šūnu proliferāciju. Konkrēti brūču dzīšanas laikā norisinās pastiprināta citokīnu produkcija epidermas šūnās (Grone 2002, Singer and Clark 1999, Stephens 2011). Vairāk kā 30 citokīni, kurus ekspresē makrofāgi, fibroblasti, keratinocīti un neitrofili, piedalās ādas atjaunošanās procesā brūču gadījumā. Pētījumos par ādas rētām liela nozīme tiek pievērsta transformējošam augšanas faktoram- β (TGF- β) un dažādām tā izoformām, kas var vai nu pasliktināt vai paātrināt dzīšanu (Gantwerker and Hom 2012).

Tādu GF kā fibroblastu augšanas faktora-2 (FGF-2) un TGF- β sasaistīšanos nodrošina fibrīns. Tam piemīt īpašība stimulēt reģeneratīvas atbildes reakcijas dažādos šūnu tipos. GF ekspresija tiek diez gan izteikti izmainīta brūču dzīšanas laikā. Ir pierādīts, ka kolagēna sintēze palielinās, kad šūnas tiek kultivētas uz fibrīna veidnēm. Fibroblasti, atbildot uz TGF- β signāliem, ražo kolagēnu (Weijers *et al.* 2010).

Kopumā brūču dzīšanas procesā aktīvi darbojas ļoti daudz un dažādas ādas šūnu sekretētas signālmolekulas (tabula 1.2.2.)

Brūcēm dzīstot, iekaisuma gaitā audos vai ķermeņa dobumos uzkrājas šķidrums, ko sauc par eksudātu. Tajā atrodas sekretētie proteīni, kuri ietekmē brūču dzīšanas procesu. Eksudātu

bioķīmiskās analīzes ir noderīgas, lai objektīvi izvērtētu hronisko brūču īpatnības (Minematsu *et al.* 2013).

1.2.3. Hroniskās brūces

Hronisku ādas brūču molekulārā patoģenēze ir kompleksa un līdz galam neizprasta sfēra. Pastāv vairākas teorijas, kas skaidro to, kādēļ šādas brūces veidojas un galu galā pastāv. Hroniska tipa čūlas bieži raksturo kā pastāvīgā iekaisumā esošas, tādēļ nepieciešams plašāk pētīt imūnās atbildes ietekmi uz šādu nepārtrauktu iekaisumu saglabāšanas stāvokli (Pukstad *et al.* 2010).

Hroniskas čūlas iedala arteriālās (išēmiskās), venozās, jauktās (arterio-venozās) un diabētiskās (neiropātiskās), kuru cēlonis ir konkrēta saslimšana. Pie hroniskām brūcēm pieskaitāmi ir arī izgulējumi un ilgstoši dzīstoši apdegumi (Kapickis *et al.* 2010).

Fizisko bojājumu labošana līdzās ar citām audu funkcijām ir būtiska ādas ikdienas funkcija, piemēram, imūnās reakcijas stiprināšana pret infekcioziem aģentiem sevī iekļauj gan šūnu proliferāciju, gan diferenciāciju. Hronisku brūču dzīšana parasti tiek asociēta ar ādas novecošanos, bet raksturota ar ļoti ilgstošu iekaisuma fāzi, ECM bojājumiem un nespēju epitelizēties (Stephens 2011). Visbiežāk hroniskas brūces lokalizējas ķermeņa apakšējā daļā. Kāju hroniskās čūlas definē kā zemāk par ceļa locītavu esošu defektu ādā, kas nezūd līdz pat sešām nedēļām un neuzrāda nekādu tendenci dzīt arī pēc trīs vai vairāk mēnešiem. Pieaugušo cilvēku vidū hroniska čūlošana ir plaši zināms un nepatīkami sāpīgs stāvoklis. Novecošanās un paaugstinātu aterosklerotisko oklūziju riska faktoru (smēķēšana, aptaukošanās, diabēts) rezultātā čūlu veidošanās biežums cilvēku populācijā pieaug. Hroniskas brūces raksturīgas tieši vecākiem cilvēkiem, jo ādas novecošanās ietekmē tās struktūru un funkcijas. Ar gadiem epiderma palēnām zaudē savu aizsargbarjeras funkciju, bet derma – mehānisko izturību un biezumu. Ādas čūlas var pilnībā izraisīt epidermas, kā arī neretos gadījumos dermas un hipodermas reģionālo zudumu (Agale 2013, Stephens 2011).

Liela nozīme ir atpazīt atšķirību starp venozām un arteriālām čūlām, lai sekmētu precīzu diagnozi un brūču apkopi:

- Arteriālas čūlas parasti lokalizējas tipiskās atspiediena vietās – pirkstgalos, papēdī, starp pirkstiem vai ārpusē uz potītes. Ārējā āda ap čūlu ir plāna un ar hroniskas išēmijas pazīmēm. Interesanti, ka arteriālās brūces novērojamas biežāk vīriešiem nekā sievietēm (Kapickis *et al.* 2010, Stephen *et al.* 2010).

- Venozas čūlas parasti ir visbiežāk sastopamākais čūlu veids. Tās ir novērojamas cilvēkiem ar venozo nepietiekamību, kas pārsvarā rodas novecošanās, dziļo vēnu trombozes, sirds mazspējas, aptaukošanās, neiroloģisku traucējumu u.c. dēļ (Bert van Gent *et al.* 2010). Augsts asinsspiediens apakšējo ekstremitāšu dziļajās un virspusējās vēnās izraisa palielinātu vaskulāro pretestību. Ilgstošs augsta asinsspiediena stress perifērajās vēnās liek tām saspīsties, kā rezultātā asins plūsma mazajiem kapilāriem nepienāk pietiekamā daudzumā un iestājas nekroze (Stephen *et al.* 2010). Galvenā etioloģiskā venozu čūlu izcelsme ir hroniska venozā nepietiekamība jeb mazspēja (HVM), kas ir sastopama 72% trofisku čūlu gadījumos. Venozas čūlas savukārt biežāk ir novērojamas tieši sievietēm (Kapickis *et al.* 2010).
- Jebkurā gadījumā ir jāapzinās, ka vairāki slimību faktori var vienlaicīgi pastāvēt ikviena individuāla pacienta ar hronisku brūci gadījumā, kas var sarežģīt ārstēšanu un kavēt dzīšanu. Jēdzienu “jauktas čūlas” izmanto gadījumos, kuros vienlaicīgi norit gan arteriālās, gan venozās pataloģijas. Vairums gadījumu tās ir venozas čūlas ar tūsku vai ādas izmaiņas ar reducētu arteriālo pieplūsmu (Marston 2011, Partsch 2010).
- Diabētiskas čūlas parasti tiek raksturotas ar diabētisko pēdu, kas ir attiecīga pēdas vai apakšstilba audu infekcija apvienojumā ar perifēro asinsvadu un neiroloģiskiem bojājumiem (Kapickis *et al.* 2010). Cukura diabēts ir visizplatītākā hroniskā slimība pasaulē. Traucēta brūču dzīšana ir viena no diabēta komplikācijām, kas noved pie nespējas sadzīt hroniskām diabētiskām kāju čūlām. Bieži vien šāda veida čūlu esamība noved pie apakšējo ekstremitāšu amputācijas (Moura *et al.* 2014). Pasaulē aptuveni 400 miljoni cilvēki cieš no diabēta, bet Eiropā tie ir ap 60 miljonu pacientu. Neiropātija ir plaši pazīstama neiroloģiska komplikācija, kas tiek asociēta ar I un II tipa diabētu. Šādas komplikācijas noved pie relatīvi liela diabētiskās pēdas čūlas riska. Diabētiskā neiropātija parasti ir sastopama 50% pacientu ar hroniskām brūcēm (Futrega *et al.* 2014).

Veicot hronisku brūču aprūpi svarīgi ir ņemt vērā to izcelsmes etioloģiju. Šāda tipa čūlas būtiski ietekmē pacienta dzīves kvalitāti, jo ārstēšana ir ilgstoša un ļoti apgrūtināta. Hroniskas čūlas var izraisīt invaliditāti, to aprūpe ir tieši atkarīga no brūces dzīšanas stadijas, kā arī pamatslimības. Korekta diagnoze ir ļoti būtiska, lai izvairītos no nepiemērotas ārstēšanas, kas var novest pie brūces pasliktināšanās, kavēt dzīšanu vai kā citādi kaitēt pacientam. Svarīgi ir jau laicīgi sākt izveidojušās brūces ārstēšanu, uzlabojot ārstējamā dzīves kvalitāti un, protams, samazinot ārstēšanas izmaksas (Agale 2013, Kapickis *et al.* 2010).

1.3. Ādas audu inženierija

Bojājumi uz ādas var veidoties neskaitāmos gadījumos. Ģenētiska iedzimtība, akūtas un hroniskas brūces, apdegumi, izgulējumi, kā arī ķirurģiska iejaukšanās ir tikai daži piemēri no šādiem gadījumiem. Brūču un traumu rašanās sekas parasti ir nepievilcīgas rētas vai plankumi, hroniskas sāpes un liela diskomforta sajūta. Ādas audu transplantātu izmantošana ir plašāk zināmais paņēmiens lielu ādas traumu aprūpēšanā. Transplantāti ir paredzēti pacientiem ar nedzīstošām un īpaši smagām brūcēm (Walsh 2011).

Ādas audu inženierija ir ļoti nozīmīga zinātnes nozare, kas nodarbojas ar metožu izstrādi, kuru mērķis ir izveidot materiālus ādas traumu ārstēšanai, ar kuru palīdzību varētu atjaunot bojātos audus, piemēram, apdegumus un citas paliekošas rētas (Groeber *et al.* 2011). Nozares izaugsme nodrošina alternatīvus risinājumus audu ārstēšanā, veidojot bioloģiskus aizvietotājus, kuri ir spējīgi atjaunot, saglabāt vai uzlabot audu funkcijas (Liu 2015). Biotehnoloģiski veidoti ādas audi parādījās galvenokārt reaģējot uz ārkārtas nepieciešamību pilnībā pārklāt plašus apdegumus. Vēlāk šāda tehnoloģija tika izmantota hronisku brūču ārstēšanā (Santamaria *et al.* 2012).

Sākuma posms audu inženierijai ir ādas šūnu izdalīšana no attiecīgo audu biopsijas un to kultivēšana monoslānī, lai šūnas pavairotu pietiekamā daudzumā. Paralēli tiek testēti dažādi biomateriāli un izveidots speciāls matrikss, kurā šīs ādas šūnas tiek tālāk kultivētas. Pēc konkrēta kultivēšanas laika šādu izveidotu ādas audu modeli var izmantot attiecīgi brūču dzīšanas mehānismu pētījumiem vai kādu vielu testēšanai (Walsh 2011). Šādos audu modeļos matrikss kalpo kā ECM, tādēļ svarīgākais tā izveidei ir atrast piemērotu pamatni, kura nodrošinātu šūnu adhēziju, kā arī šūnas būtu spējīgas noslāņoties, veidojot audu struktūru (Negri *et al.* 2009). Piemēram, jau vairākus gadus aktuāli ir transplantāti jeb brūču pārsēji, kuri satur ECM molekulas un šūnas, tādējādi veicinot dzīšanas procesus (Papini 2004).

Audu transplantātu prasības ir, lai tie būtu droši pacientiem, kā arī klīniski efektīvi. Modeļsistēmas pamatā veido tā, lai tās pēc iespējas vairāk imitētu īstu ādu (Shevchenko *et al.* 2010). Audus vai orgānus, kas tiek transplantēti iekš paša pacienta ķermeņa sauc par autologiem, bet tādus, kur ir iesaistīti divi indivīdi (cilvēki) – donors un recipents – par allogēniem transplantātiem. Savukārt, gadījumā, ja donors ir dzīvnieks un transplantātu saņem cilvēks, to sauc par ksenologu (Liu 2015, Zhang and Michniak-Kohn 2012). Mūsdienās autologas izcelsmes materiāli tiek izmantoti un ir pieprasīti ievērojami vairāk nekā allogēni, tomēr allogēno audu tūlītēja pieejamība ir būtisks aspekts, kas veicina allogēno audu transplantācijas nozares attīstību

(Martin *et al.* 2014). Vairums ādas aizvietotāju nepastāv mūžīgi. To galvenais mērķis ir veicināt pacienta brūces dzīšanu, stimulējot dažādu citokīnu izdalīšanos. Šie citokīni sekmē dzīšanas procesus, stimulējot bazālās membrānas komponentu producēšanu, kas novērš dehidrāciju un paaugstinātu iekaisumu, kā arī palielina granulācijas audu veidošanos (Singer and Clark 1999).

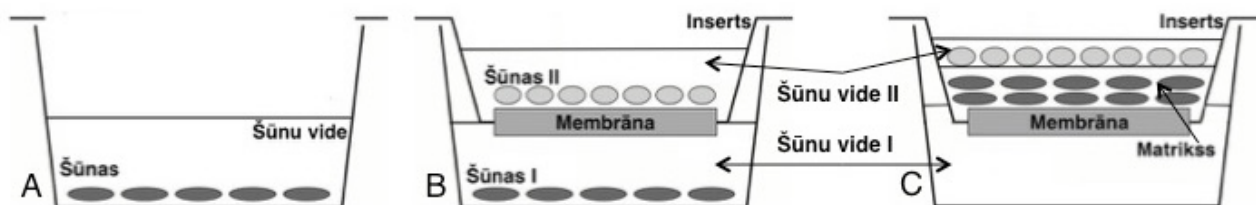
Materiāli, kas ir iegūti audu inženierijas rezultātā, ir noveduši pie *in vitro* modeļsistēmu attīstības, kā alternatīva dzīvnieku izmantošanai testēšanā klīniskiem mērķiem (Canton *et al.* 2010). Inženierēti ādas audi samazina arī donoru skaitu un palielina izredzes veiksmīgāk dziedēt akūtas vai hroniskas brūces (Zavan *et al.* 2010).

Biotehnoloģiski veidotu audu attīstība balstās uz trīsdimensionāli (3D) veidotiem audu transplantātiem, tādējādi precīzāk atdarinot procesus, kādi tie ir īstajā ādā, kas notiek šūnām noslāņojoties (Huh 2011). Ādas audu transplantātu bioloģiskais materiāls ir 3D matrikss, kurā ir izsētas šūnu kultūras. Matrikss ir viena no svarīgākajām audu inženierijas sastāvdaļām. Tas galu galā kalpo kā fizisks struktūras balsts, kas ietekmē šūnu migrēšanas, proliferācijas un diferenciācijas procesus. Būtiska ir labi noteikta un kontrolēta struktūra, kas var atvieglot šūnu infiltrāciju jeb iesūkšanos, barības vielu transportu un atkritumu produktu izvadīšanu (Liu 2015). Matriksu izveidei var izmantot gan sintētiskus materiālus, gan ECM komponentus, kas ir iegūti no dzīvnieku vai cilvēku audiem. Modeļsistēmas ir iespējams veidot arī no augu valsts polimēriem, kā arī rekombinanti sintezētiem ECM komponentiem (Jones *et al.* 2002). Lai nenotiktu transplantātu atgrūšana vai kāds cits ar imūno atbildi saistīts risks, matriksu veidošanai izmanto tieši rekombinanti producētus materiālus, kuru sastāvā ir arī normālā ādā sastopamās molekulas (Metcalf and Fergusson 2007). Matriksu izveidei visbiežāk (*in vivo* un *in vitro*) izmanto dzīvnieku izcelsmes kolagēnu, kas ir sasaistīts ar citām ECM molekulām (Shevchenko *et al.* 2010).

Galvenie noteicošie faktori, izvēloties biomateriālu audu modeļsistēmas veidošanai no inženierijas puses, ir materiāla mehāniskās pamatīpašības, degradācijas ātrums, porainība, virsmas īpašības un formas uzturēšana. Savukārt bioloģiskie un klīniski nozīmīgie faktori ir bioaktivitāte, GF nepieciešamība, imūnās un svešķermeņu reakcijas inhibēšana, barības vielu piegāde, šūnu tipu skaits, kuras materiāls atbalsta un visbeidzot, kā savienot jaunus audus ar esošajiem (Seal *et al.* 2001).

Saprotams, ka ādas audu inženierijā visvairāk izmantotie šūnu tipi ir fibroblasti un keratinocīti. Atsevišķos gadījumos arī endotēlija šūnas. Šobrīd inženierijas nozare ir vērsta uz autologu šūnu izmantošanu (Zavan *et al.* 2010). Transplantātu modeļiem, kuros nav dzīvu šūnu, tiek polimerizēts ECM komponents. Piemēram, biotehnoloģiski veidotos audos, kuru pamatā ir

kolagēna matrikss, ir iespējams sākotnēji kultivēt pacienta šūnas matriksā pirms transplantēšanas, vai arī transplantēt šo matriksu bez uzsētām šūnām, tādējādi ļaujot paša pacienta šūnām migrēt kolagēna matriksā, atjaunojot bojāto audu slāni. Papildinot modeļsistēmu, ir iespējams tajā iekļaut arī atsevišķas bioaktīvas molekulas, kā GF vai citus farmakoloģiskus preparātus (attēls 1.3.) (Macri and Clark 2009). Fibrīna matriksu veidošana ir vēl viens modeļsistēmas veids, kuras gadījumā tiek polimerizēta asins plazma, veidojoties hidrogēlam, kam savukārt piemīt strukturāla līdzība ar ECM (Negri *et al.* 2009, Zhang and Michniak-Kohn 2012). Pēdējo gadu laikā, lai izveidotu matriksu ādas audu inženierijā, izmanto arī tādus biomateriālus kā želatīnu (kolagēna atvasinājums), kombinējot to ar hitozīnu, kam ir antibakteriālas īpašības, kā arī tas ir biodegradējams un nav toksisks (Han *et al.* 2014, Tu *et al.* 2015). Zināma ir arī hialuronskābes izmantošana, kas sastopama ekstracelulārajos audos. Tās fiziskās un bioķīmiskās īpašības ir ļoti saistošas attiecībā uz ķermeņa atjaunošanas tehnoloģijām (Collins and Birkinshaw 2013).



1.3. attēls Šūnu kultivēšanas pamatskāma. **A** – šūnas kultivētas monoslānī. **B** – šūnu kokultūra ar insertu. **C** – šūnu kokultūra matriksā ar insertu.

Figure 1.3. Framework for cell cultivation. **A** – cells cultivated in a monolayer. **B** – cells co-culture with an insert. **C** – cell co-culture in a scaffold with an insert.

Ādas aizvietotāju modeļu veidošana ir arī atkarīga no bojāto audu dziļuma. Brūcēm, kurām ir traumēts virsējais ādas slānis, nepieciešams ātrs epidermālā slāņa aizstājējs, kas ir svarīgi, lai varētu kontrolēt šķidruma zudumu, ķermeņa temperatūru un aizsargāt brūci no nevēlamiem mikroorganismiem. Dermas bojājumu gadījumā ar epidermas aizvietotāju vien nepietiek. Tās ārstēšanai ir vajadzīgs veidot matriksu, kurš nodrošina šūnu migrāciju un palīdz sekretēt GF. Šobrīd tirgū ir dažādi komerciāli pieejami epidermas un dermas aizvietotāji no dažādiem biomateriāliem un šūnu avotiem (Zavan *et al.* 2010). Visā pasaulē šobrīd apgrozībā ir salīdzinoši daudz inženierijas produktu un nākotnē noteikti ir gaidāmi krietni vairāk izstrādājumu, kuri varētu attiecīgi aizstāt jau novecojušos modeļus (Husing 2003). Ādas audu inženierijas nozarē tiek vērtēta kā daudzsolīga, pateicoties reģeneratīvo īpašību potenciālu izmantošanai, kas piemīt gan

embrionālajām, gan pieaugušo cilmes šūnām, minot arī inducētās pluripotētās cilmes šūnas (Santamaria *et al.* 2012).

1.3.1 Ādas audu izmantošana *in vitro* testēšanā

Rekonstruēti ādas audu ekvivalenti, kā alternatīva dzīvnieku eksperimentiem, piedāvā ne tikai veidu, kā nodrošināt jaunu aktīvo vielu novērtēšanu atbilstoši likumdošanai, dzīvnieku labturības oranizāciju un patērētāju prasībām un vadlīnijām, bet arī nodrošina līdzekļus, lai uzlabotu un paplašinātu zināšanas par ādas bioloģiskajiem procesiem. Biotehnoloģiski veidotu ādas audu modeļsistēmas pastāvīgi tiek uzlabotas ar mērķi tās izmantot ādas toksicitātes testos. Līdzās šādiem testiem un drošības standartu jomām, ādas ekvivalenti piedāvā labi raksturojamu modeļi, lai varētu veikt pētījumus arī tādās pētniecības nozarēs kā pamata ādas bioloģijā, brūču atjaunošanās mehānismu raksturošanā, melanoģenēzes regulācijā, ādas slimību patoģenēzē un ādas vēža pētniecībā (Ponec 2002).

Ādas audu modeļi var tikt izmantoti ne tikai klīniskiem, bet arī atsevišķiem šūnu funkcionalitātes pētījumiem. Farmakoloģisku pētījumu gadījumā modeļsistēmas ir iespējams izmantot, piemēram, bioloģiski aktīvo vielu iedarbības novērtēšanai uz ādas šūnām un ECM komponentiem, kā arī veicot toksicitātes testus (Groeber *et al.* 2011). Farmakoloģijas līdzekļu izstrādes lauciņā šādi audu modeļi varētu būt īpaši noderīgi zāļu ražošanā, kas ir ar sistemātisku iedarbību, ādu pārklājot ar produktu, un zāļu izstrādē, kas iedarbojas konkrēti aplikācijas vietā, ādas slimību vai citu traucējumu gadījumā (Mathes *et al.* 2014).

In vitro testēšanu var piemērot dažādu kosmētikas un higiēnas produktu aktīvo vielu un gatavo kompozīciju drošības novērtēšanai un efektivitātes prasību pamatošanai. Šobrīd efektivitātes novērtēšanai tiek izmantota *in vivo* testēšana ar brīvprātīgajiem dalībniekiem, savukārt *in vitro* testēšanu lielākoties piemēro drošības novērtēšanai. Kosmētisko vielu efektivitātes *in vitro* testēšana dod lielākas priekšrocības, jo tā ir droša agrīnās stadijas laikā jaunu produktu attīstībā, rezultāti tiek iegūti krietni ātrāk un eksperimentālie uzstādījumi ir rentablāki, kā arī testēšana ļauj veikt sastāvdaļu raksturošanas un formulēšanas pārbaudi diapazonā, kas nebūtu iespējams, izmantojot brīvprātīgos eksperimenta dalībniekus. Dabiskās sastāvdaļas, kuras tiek izmantotas kosmētiskajos līdzekļos var saturēt vairumu preparātu vai izolētu aktīvo vielu, un šo vielu fizikāli ķīmiskās īpašības var ierobežot testēšanas metodes izvēli (Ramata-Stunda *et al.* 2013).

Pašsaprotami, ka *in vivo-in vitro* korelācijas pētījumi jāveic tā, lai iegūtie rezultāti norādītu uz to, kādi ir ierobežojumi, novērtējot cilvēka apdraudējumu attiecībā uz šādu ādas ekvivalentu

pielietojumu. Tā kā rezultāti, kuri ir iegūti no cilvēku pētījumiem, ir nepieciešami kā atsauces vērtības *in vitro* pārbaudēm, uzmanību ir nepieciešams arī pievērst *in vivo* datu ģeneralizācijai un *in vivo* testu protokolu standartizēšanai (Ponec 2002).

Lai gan daudzas *in vitro* ādas modeļsistēmas ir izveidotas un attīstītas tieši zinātniskiem pielietojumiem, tās visā pasaulē (komerciāli pieejamas) ir salīdzinoši mazā skaitā. Šim trūkumam nepieciešams izstrādāt jaunus tirgojamus modeļus. Ādas ekvivalentam ir jāizpilda vairākas prasības, kad tiek testēta tā korozivitāte – tam ir jābūt uzticamam gan attiecībā uz testējamo materiālu klasifikāciju, gan rezultātu atkārtojamību. Lai izvairītos no loģistikas problēmām, ir jānodrošina produkta tūlītēja pieejamība liela mēroga ražošanas gadījumā, un tam ir jābūt diez gan ekonomiskam, ja tas tiek izmantots regulārai testēšanai (Hoffmann *et al.* 2005).

2. MATERIĀLI UN METODEDES

2.1. Šūnu līnijas

Cilvēka ādas audu biopsijas (pēcoperācijas materiāls) epidermālo un dermālo šūnu līniju izdalīšanai tika iegūtas saskaņā ar Latvijas Republikas normatīvajiem aktiem. Darbā tika izmantotas vairākas fibroblastu līnijas – 16D, 18D, 19D, 20D, 60D, D1 un D2 ar pasāžu numuriem p₁ – p₉ un divas primāro keratinocītu līnijas E un 20E ar pasāžas numuru p₃.

2.2. Biomateriāli

Plazma (0 tips, Rh pozitīva) eksperimentālā darba vajadzībām tika saņemta no P. Stradiņa Klīniskās universitātes slimnīcas (PSKUS) Asins sagatavošanas nodaļas, saskaņā ar Latvijas Republikas normatīvajiem aktiem.

2.3. Hronisku brūču eksudātu iegūšana

Eksudātu paraugi tika ievākti no pacientiem sadarbībā ar PSKUS Asinsvadu ķirurģijas nodaļu, saskaņā ar Latvijas Republikas normatīvajiem aktiem.

Nosver eksudātus, kas ir piesūcināti filtrpapīrā un noslēgti 15 ml stobriņos, pievieno tiem attiecīgu tilpumu CAB ekstragēšanas bufera (25 mM Tris-HCl pH 7.5, 200 mM NaCl, 3 mM CaCl₂, 0,03% Brij-35) un liek inkubēties uz diennakti +4°C. Centrifugē pie 3000 apgr./min 15 minūtes. Savāc buferi un sagatavo eksudātu alikvotas, kuras pēc ekstragēšanas uzglabā -150°C (Moor *et al.* 2009).

Ievākto paraugu proteīnu koncentrācija tika noteikta ar Bredforda proteīnu pārbaudes metodi, izmantojot Bradforda šķīdumu (AppliChem, Vācija) un BSA standartu veidošanai.

2.4. Šūnu izdalīšana un kultivēšana monoslānī

Ādas audu paraugu no transportēšanas šķīduma – 0,25% amfotericīns-B/0,5% penicilīna/streptomicīna maisījums/1xPBS (Life Technologies, ASV) laminārā pārnēs uz 92 x 16 mm audu kultivēšanas plates (Starstedt, Vācija) un sadala apmēram 0.5 cm² gabaliņos, izmantojot sterilu vienreizlietojamu skalpeli. Lai atdalītu epidermu no dermas, audu gabaliņus ievieto dispāzes šķīdumā (Sigma-Aldrich, Vācija) 1 u/ml PBS un inkubēti pa nakti +4 °C. Epidermu pārnēs stobriņā ar tripsīna šķīdumu – 0,25% tripsīns/EDTA (Life Technologies, ASV) un inkubē piecas minūtes pie 37°C 5% CO₂. Reakciju apstādina pievienojot 1V 20% FBS (Life Technologies, ASV) saturošu PBS šķīdumu un centrifugē (LMC-3000 Biosan, Latvija) pie 1200

apgr./min 5 minūtes. Šūnu nogulsnes suspendē keratinocītu kultivēšanas vidē 1 ml EDGS uz 100 ml EpiLife (Life Technologies, ASV) un inokulē jau ar 0,5V iepriekš sasildītu vidi piepildītā audu kultivēšanas flakonā T-75 (Starstedt, Vācija). Šūnas inkubē 37°C 5% CO₂ atmosfērā, regulāri mainot vidi.

Derma paraugu sasmalcina sīkāk un mazgā ar 1xPBS, centrifugē pie 1000 apgr./min 5 minūtes. Atmazgātos paraugus inkubē kolagenāzes šķīdumā kolagenāze IV – 50 u/ml (Sigma-Aldrich, Vācija) fibroblastu kultivēšanas vide – 10% FBS saturošs DMEM šķīdums (Life technologies, ASV) vismaz 2 h 37°C 5% CO₂ atmosfērā. Kolagenāzes reakciju inhibē ar FKV un centrifugē pie 2000 apgr./min 5min. Paraugus atmazgā ar vidi bez seruma un suspensiju filtrē caur šūnu filtru (Falcon, ASV), pēc tam centrifugē pie 1000 apgr./min 10 min. Šūnu nogulsnes suspendē vidē un inokulē audu kultivēšanas flakonā, kurā iepriekš ienests 0,5V jau sasildītas FKV. Šūnas inkubē 37°C 5% CO₂ atmosfērā, mainot vidi ik pa trīs dienām.

Pārsējot šūnas, aprēķina un ar mikropipeti pārnes nepieciešamo tilpumu ar izvēlēto šūnu skaitu, ko nepieciešams uzsēt uz flakona vai plates. Šūnu skaitu nosaka, izmantojot Neubauera hemocitometru (Marienfeldt, Vācija). Šūnām pievieno kultivēšanas vidi un turpina inkubēt 37°C 5% CO₂ atmosfērā, mainot regulāri vidi.

2.5. Šūnu pārsēšana

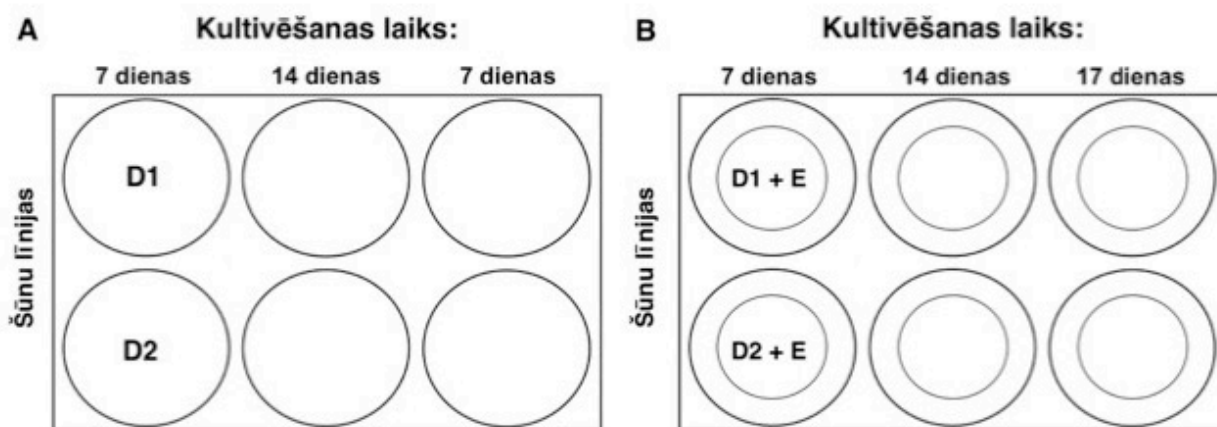
Kad šūnu monoslānis sasniedzis 90% konfluenci, šūnas pārsēj jaunā flakonā. Izmantojot sterilu pipeti (Starstedt, Vācija), no flakona atsūc šūnu kultivēšanas vidi. Flakona virsmu skalo ar 1 x PBS. Pievieno 0,25% tripsīna/EDTA šķīduma. Inkubē 10 minūtes 37°C 5% CO₂ atmosfērā. Pievieno 20% FBS saturošu PBS šķīdumu, lai apstādinātu reakciju. Suspensiju pārnes 15 ml stobriņā (Starstedt, Vācija) un centrifugē pie 1000 apgr./min 5 minūtes. Šūnas suspendē 1 ml šūnu kultivēšanas vidē. Skaita šūnas un nepieciešamo daudzumu šūnu izsēj audu kultivēšanas flakonā vai platēs. Šūnu monitorēšanai tika izmantots invertmikroskops Observer A1 (Zeiss, Vācija) ar Axio Vision 4.8 programmatūru.

2.6. Kokultūru kultivēšana 3D fibrīna matricā un tā sagatavošana

Matriksu veido polimerizējot plazmā esošo fibrīnu, iegūstot gēlveida struktūru, kurā iespējama fibroblastu augšana vairākos slāņos. Traneksāmskābe, kas pievienota plazmai, darbojas kā katalizators un plazminogēna inhibitors, kavējot fibrīna noārdīšanu. Kalcija joni (Ca²⁺) tāpat

kā fizioloģiskā šķīduma maisījums (0,9% NaCl) un traneksāmskābe darbojas kā katalizators (Negri *et al.* 2009).

Stobriņā (50 ml) (Starstedt, Vācija) iepilda plazmu, sajauc ar 0,9% NaCl (B.Braun, Vācija) un nepieciešamo fibroblastu daudzumu, kārtīgi samaisa. Maisījumam pievieno attiecīgo tilpumu kalcija glukonāta – 8,94 mg/ml (Sopharma, Bulgārija). Pēc tam pievieno traneksāmskābi (WZF Polfa, Polija) – 0,8 mg/ml matriksā. Matriksu sapilda 6–lauciņu šūnu kultivēšanas platē. Plati ievieto inkubatorā 37°C 5% CO₂ atmosfērā un inkubē 10 – 30 minūtes pēc tam pievieno FKV. Kokultūru paraugi tika kultivēti 6-lauciņu plates insertos, ar poru izmēru 0,4 μm (PAA Laboratories, Austrija). Kad dermālais matriksa slānis sapolimerizējies, tad vienmērīgi uzpilda attiecīgo skaitu iepriekš sagatavotu keratinocītu šūnu. Matriksa katrā lauciņā pievieno attiecīgo kultivēšanas vidi – KKV (kokultūrām) un FKV (tikai dermālajam slānim). Šūnas kultivē 37°C 5% CO₂ atmosfērā, mainot kultivēšanas vidi ik pēc 2 – 3 dienām. Sagatavoto fibrīnu matriksu shēma attēlota 2.6. attēlā.



2.6. attēls. Biotehnoloģiski veidotu ādas audu, izmantojot fibrīna matriksu, plānojuma shēma 6-lauciņu platēs. **A** – primārie fibroblasti kultivēti fibrīna matriksā ar divām dažādām šūnu līnijām, trīs dažādos kultivēšanas laikos. **B** – primāro fibroblastu un keratinocītu kokultūra fibrīna matriksā uz insertiem kultivēta 7, 14 un 17 dienas.

Figure 2.6. Experiment design for bioengineered skin tissue using fibrin scaffold in 6-well plates. **A** – two different primary fibroblast cell lines cultivated in a fibrin scaffold for 7, 14 and 17 days. **B** – primary fibroblast and keratinocyte co-culture in a fibrin scaffold on inserts cultivated for 7, 14 and 17 days.

2.7. 3D fibrīna matriksa fiksēšana

Matriksa paraugiem, kad nepieciešamais kultivēšanas laiks ir beidzies, atsūc vidi, un matriksu uzmanīgi ar vienreizlietojama skalpeļa palīdzību atgriež no plates sānu malām. Ar sterilu pinceti matriksa paraugus pārnes uz fiksēšanas trauciņiem (Starstedt, Vācija). Paraugu fiksē 10% formaldehīda šķīdumā (Enola, Latvija), kurā tas tiek turēts un uzglabāts istabas

temperatūrā. 3D fibrīna matriksa ieguldīšana un ieslēgšana parafīnā tika veikta P. Stradiņa KUS Patoģijas Institutā.

2.8. 3D fibrīna parafinēto matriksa paraugu griešana

Iestata mikrotomam (Leica, Vācija) matriksu paraugu griešanai nepieciešamos parametrus. Iestiprina un nofiksē kaseti mikrotomā un griež paraugus (parauga biezums – 5 μm). Sagrieztās paraugu strēmeles iemērc ūdens vanniņā (40 °C). Gabaliņus uznes uz priekšmetstikliņa (Marienfeldt, Vācija), iemērcot tos ūdens vanniņā (uz viena priekšmetstikliņa uzliek vidēji 4 griezumus). Priekšmetstikliņus tur uz mikrotoma sildvirsmas ~15 min griezumu izlīdzināšanai. Pēc tam gatavos priekšmetstikliņus ar griezumu paraugiem inkubē termostatā ~ 40 °C, līdz tie ir nožuvuši.

2.9. Deparafinizēšana

Deparafinizēšana tika veikta pēc ražotāja (AbCam) rekomendācijām:

Pirms deparafinizēšanas priekšmetstikliņus ar sagrieztajiem matriksa paraugiem inkubē 37°C 5% CO₂ atmosfērā 30 minūtes.

Secīgi veic paraugu skalošanu sekojošos ksilola un etanola (Enola, Latvija) šķīdumos, istabas temperatūrā:

	Laiks (min)
1. Ksilols (100%)	10
2. Ksilols (100%):Etanols (100%) [1:1]	10
3. Etanols (96%)	8
4. Etanols (75%)	7
5. Etanols (50%)	5

Paraugus līdz krāsošanai uzglabā parastā ūdenī.

2.10. Imunofluorokīmija

Ieliek priekšmetstikliņus ar paraudziņiem Tris-EDTA buferī un silda 30 minūtes ūdens vanniņā (~ 90 °C). Paraugus vispirms skalo bloķēšanas buferī (1% BSA/PBS) 5 minūtes, pēc tam – bloķēšanas šķīdumā (PBS/5%BSA/0,1%TritonX-100) ~ 45 minūtes istabas temperatūrā. Noskalo paraugus ar ūdeni un apvelk griezuma vietas ar PAP pildspalvu. Uz katra griezuma uznes 3% ūdeņraža peroksīdu (H₂O₂) un inkubē 5 minūtes tumsā, istabas temperatūrā. Noskalo 3% H₂O₂ un uz griezuma vietām uznes iepriekš pagatavotu antivielu maisījumu, kā arī

negatīvajai kontrolei uznes bloķēšanas buferi. Paraugus inkubē divas stundas tumsā, istabas temperatūrā. Pēc primārās antivielas noskalošanas liek inkubēt sekundāro antivielu uz stundu. Noskalo paraugus ar ūdeni un nosusina. Vispirms liek DAPI uz 10 min, paraugus tur tumsā. Noskalo DAPI un uznes *mounting* vidi (AbCam, Lielbritānija) uz paraugiem, nosedz ar priekšmetstikliņu. Paraugi tika skatīti zem mikroskopa (Leica, Vācija) un bildēti ar ImagePro 5.0. programmatūru.

2.11. Sekretēto proteīnu noteikšana ar ELISA/xMAP metodi

Lai noteiktu sekretētos proteīnus vidē un eksudātos, mikromēģenēs tika ievāktas un analizētas šūnu kultivēšanas vides. Stobriņi ar paraugiem tika uzglabāti -150°C.

ELISA/xMAP tika veikta pēc ražotāja rekomendācijām ar komerciāli pieejamu reaģentu komplektu *Milliplex MAP Kit* (Millipore, Vācija).

Vipirms sagatavo metodei nepieciešamos standartus un kvalitātes kontroles, kā arī centrifugē mērāmos paraugus pie 12000 apgr./min 15 minūtes. Sagatavo 96 – lauciņu plati, kuru mazgā 10 minūtes istabas temperatūrā uz kratītāja ar mazgāšanas buferi. Izlej buferi un nosusina plati, attiecīgi sapilina standartus, kvalitātes kontroles un paraugus. Fonam pilina reakcijas buferi. Pievieno sonificētu un vorteksētu magnētisko lodīšu – analītu maisījumu, nosedz plati ar aizsargplēvi un inkubē to uz kratītāja 2 h istabas temperatūrā vai uz nakti +4°C. Uzliek un tur plati uz speciāla magnēta, to mazgājot divas reizes. Noņem plati no magnēta. Pievieno detekcijas antivielas katram lauciņam un inkubē plati uz kratītāja 1 h istabas temperatūrā. Nenolejot detekcijas antivielas, pievieno streptavidīna-fikoeritrīna maisījumu. Inkubē plati uz kratītāja 30 minūtes istabas temperatūrā. Uzliek plati uz magnēta, kamēr to mazgā divas reizes. Pievieno lodīšu nesējbuferi visiem lauciņiem un tur 5 minūtes uz kratītāja. Pēc tam plati nolasa ar Luminex 200TM programmu.

Datus analizē izveidojot standartlīkni no standartšķīdumu mērījumiem un attiecīgi aprēķinot katra parauga marķieru koncentrāciju (pg/ml) pēc iegūtajiem magnētisko lodīšu datiem.

2.12. Western Blotting

Western Blotting metode tika veikta pēc ražotāja (AbCam, Lielbritānija) rekomendācijām.

Izmanto lizējošo buferi – NP40 (150 nM NaCal, 1%NP40, 50mM TRIS pH 8), kuram ir pievienots proteāžu inhibitoru kokteilis (Sigma-Aldrich, Vācija). Dalāmos audu paraugus ievieto

mikromēģenē ar attiecīgu tilpumu NP40 bufera un PIC. Audus buferī homogenizē ar mini miksera palīdzību.

Proteīnu koncentrācijas noteikšanai tika izmantots komerciāli pieejams reaģentu komplekts – *BCA Protein Assay KIT* (Thermo Scientific, ASV)

Paraugus sagatavo uzpildei gēlos tos vispirms denaturējot – sajauc lizētos paraugus ar SDSxSTOP (10%SDS, 100 mM EGTA pH 8, 100 mM Tris pH 8, 25 mM DTT, glicerols, 0,5 M Tris-HCl pH 6.8) buferi tos visu laiku turot uz ledus. Liek denaturēties uz 5 minūtēm 95 – 100°C termostatā. Pēc denaturēšanas paraugus liek uz ledus. Sagatavo elektrodus (Clever Scientific, Lielbritānija), kuros ievieto 10% SDS-poliakrilamīda gēlus (AbCam, Lielbritānija) elektroforēzei. Gēla bedrītēs sapilda 10 µl paraugus un gēlu nosedz ar elektrodu buferi (Tris, glicīns, ūdens, pH 8.3). Ieslēdz un iestata elektrības padevi. Elektroforēze ilgst 1,5 – 2 stundas.

Transfēram nepieciešams sagriezt gēla izmēram attiecīgus Vatmaņa papīrus (filtrpapīrus), kā arī PVDF membrānu (Millipore, Vācija). Sagatavo Bjerrum pārneses buferi (48 mM Tris pH 9.2, 39 mM glicīns, 20% metanols), kurā Vatmaņa papīrus iemērc uz 10 minūtēm pirms pārneses, bet membrānu 15 sekundes tur metanolā un tad divas minūtes skalo destilētā ūdenī, tikai pēc tam liekot membrānu 5 minūtes pārneses buferī. Pēc elektroforēzes turpina gēla proteīnu transfēru uz PVDF membrānas. Saliek samitrinātos Vatmaņa papīrus uz transfēra aparāta (Clever Scientific, Lielbritānija) vienu zem otra (6 apakšā), tad membrānu. Izņem gēlu no stikliņiem, ko uzmanīgi novieto uz membrānas, uzliek atlikušos 6 Vatmaņa papīrus tieši uz gēla. Pieslēdz pie strāvas, kas ir attiecīgi tik liela, cik ir membrānas laukums – iestata transfēru uz stundu.

Pēc pārneses PVDF membrānu liek inkubēties 1x bloķēšanas buferī iekš TBS-T (AbCam, Lielbritānija) uz kratītāja 30 minūtes istabas temperatūrā. Sagatavo un pievieno primārās antivielas maisījumu, kurā membrāna inkubējas pa nakti +4°C uz kratītāja. Pēc inkubēšanas membrānu skalo trīs reizes 15 minūtes ar TBS-T (Tris, NaCl, Tween 20, ūdens, pH 7.6). Membrānu inkubē sekundārajā antivielā vienu stundu istabas temperatūrā. Skalo trīs reizes 15 minūtes ar TBS-T.

Uzjauc detektēšanas reaģentu – darba šķīdumu, izmantojot Pierce Western blot substrātu (Thermo Scientific, ASV). Sagatavo UVP BioSpectrum aparātu (UVP, Vācija) un programmu. Inkubē membrānu darba šķīdumā vienu minūti istabas temperatūrā. Liek membrānu UVP aparātā un veic membrānas attēlu uzņemšanu. Attēlus saglabā un analizē ar ImageJ programmu.

2.13. Laikā novērojams PCR (real-time PCR)

RNS tika izdalīta no 3D kokultūru fibrīna matricas paraugiem un īstas ādas parauga ar QIAzol reaģenta palīdzību pēc ražotāja (Life Technologies, ASV) ieteiktās metodes. Paraugi tika apstrādāti ar 1U DNāzi I (Thermo Scientific, ASV), bet pēc tam tika sintezēts cDNS, izmantojot komerciāli pieejamu reaģentu komplektu #K1632 (Thermo Scientific, ASV). Iegūtās cDNS kvalitāte tika novērtēta, pārbaudot polimerāzes ķēdes reakcijā (PCR) šūnu ekspresēto GAPDH gēnu mRNS klātbūtni. Darbā izmantotās sintētiskās oligonukleotīdu sekvences ir attēlotas 2.15. tabulā.

2.15. tabula. Darbā izmantotās sintētisko oligonukleotīdu sekvences.

Table 2.15. Synthetic oligonucleotide sequences used in this study.

Nosaukums	Sekvence 5'-3'
GAPDH_fwd	TCCCTGAGCTGAACGGGAAG
GAPDH_rev	GGAGGAGTGGGTGTCGCTGT
Col1A1_fwd	ACAGCCGCTTCACCTACAGC
Col1A1_rev	TCAATCACTGTCTTGCCCA
FGF-2_fwd	GTGTGTGCTAACCGTTACCT
FGF-2_rev	GCTCTTAGCAGACATTGGAAG
EGF_fwd	GCCAACTGGGGGAGCACAGC
EGF_rev	AGCACCACCACGCAGACAGC
VEGF_fwd	AGGCCAGCACATAGGAGAGA
VEGF_rev	TTTCTTGCGCTTTCGTTTTT
HAS2_fwd	TTGGAAACTGCCCGCCACCG
HAS2_rev	AGGCAGCGATGCAAAGGGCA
IVL_fwd	GGAGCAGCAGAAGGGGCAGC
IVL_rev	GAGACGGGACACCTAGCGGA
K6a_fwd	GGCTGAGGAGCGGCGTGAACAG
K6a_rev	AAGGAGGCAAACCTTGTGTGTTGAG
K10_fwd	AGTAACCATGCAGAATCTG
K10_rev	CACGAGGCTCCCCCTGAT
K17_fwd	AGGAGATGACCTTGCCATCCT
K17_rev	GGCTGATTGGCAGCGTGGAGGA
CK19_fwd	CCGCGACTACAGCCACTACT
CK19_rev	GAGCCTGTTCCGTCTCAAAC

Elastīns_fwd	GTATATACCCAGGTGGAGTG
Elastīns_rev	CGAACTTTGCTGCTGCTTAG
MMP-1_fwd	GGTCTCTGAGGGTCAAGCAG
MMP-1_rev	AGTTCATGAGCTGCAACACG

Laikā novērojamās PCR eksperimentos tika izmantota ABI Pirm 7300 (Applied Biosystems, ASV) iekārta. Reakcijas produktu uzkrāšanās tika konstatēta, izmantojot *Syber Green* krāsvielas maisījumus (Fermentas, Lietuva). Paraugi tika analizēti divos atkārtojumos. Gēnu ekspresijas relatīvās izmaiņas tika noteiktas, izmantojot $\Delta\Delta C_t$ metodi. GAPDH tika izmantots, kā analīzes iekšējā kontrole.

2.14. Šūnu dzīvotspējas novērtēšana ar MTT testu

MTT tests tika veikts ar komerciāli pieejamu reaģentu komplektu MTT-100 (MatTek, USA). Uzjauc MTT koncentrātu ar MTT šķīdinātāju attiecībā 1:4. Pievieno iepriekš sasildītu MTT astšķaidījumu paraugiem nepieciešamajā tilpumā un inkubē trīs stundas 37°C. Pēc inkubācijas paraugus liek ekstrahēt MTT ekstrakcijas šķīdumā uz nakti istabas temperatūrā. Nākamajā dienā savāc ekstrakcijas šķīdumu un sapilda 96-lauciņu platē. Optisko blīvumu (OD) paraugiem platē nolasa ar mikroplašu lasītāju (Asys, Austrija) pie $\lambda = 620$ nm.

2.15. Datu apstrāde un statistiskā analīze

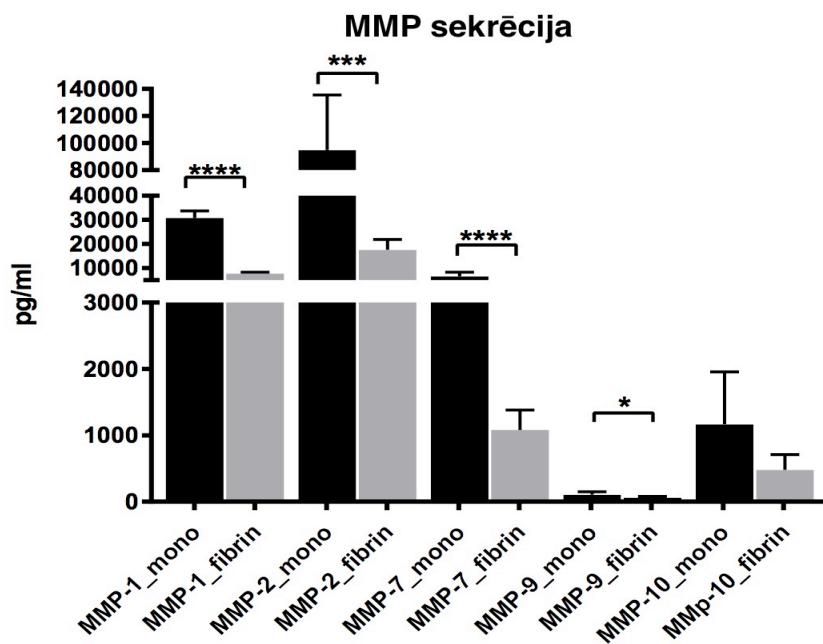
Iegūtie dati tika apstrādāti un statistiski analizēti ar GraphPadPrism V6.0 programmu. Statistiskai analīzei tika izmantots variācijas analīžu tests (ANOVA), kā arī t-tests, salīdzinot divas paraugu kopas, lai noteiktu statistiski būtiskas atšķirības, kur $p < 0,05$.

3. REZULTĀTI

3.1. Sekretēto MMP un TIMP analīze

ELISA/xMAP metode tika izmantota matricisa metalloproteināžu – MMP-1, MMP-2, MMP-7, MMP-9, MMP-10 un to audu inhibitoru – TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 un TIMP-4 noteikšanai kultivēšanas vidēs izvēlētajos ādas audu kultivēšanas laika posmos.

Tika salīdzināta MMP sekrēcijas atšķirība vidē starp šūnu kultivēšanu monoslānī un fibrīna matricisā trīs dažādām fibroblastu līnijām (16Dp₃, 18Dp₁, 60Dp₉). Visu MMP sekrēcijas līmenis ir ievērojami mazāks fibrīna matricisa paraugos, salīdzinājumā ar monoslāni (attēls 3.1.). Kopumā MMP-2 koncentrācija ir visaugstākā (12295 – 147037 pg/ml), bet MMP-9 viszemākā (28 – 191 pg/ml). Arī MMP-1 sintēze ir salīdzinoši augsta (6946 – 33495 pg/ml), aiz kā seko MMP-7 (727 – 10128 pg/ml) un MMP-10 (211 – 2352 pg/ml). Visām fibroblastu līnijām tika novērota vienāda tendence MMP sekrēcijā. Detalizētāki grafiki ar šūnu līnijām ir apkopoti 1. pielikumā.

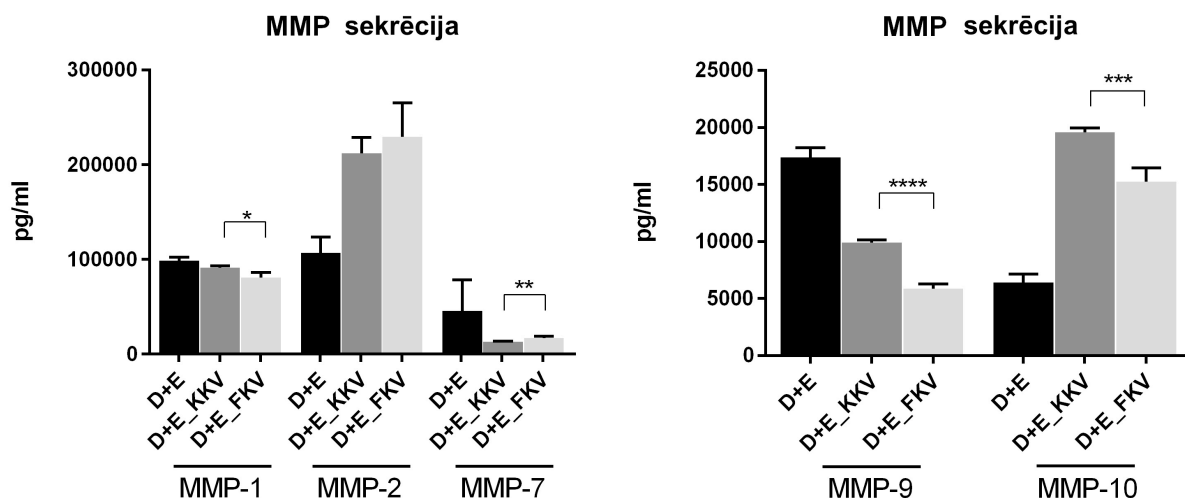


3.1. attēls. Matricisa metalloproteināžu sekrēcijas salīdzinājums trīs dažādās fibroblastu līnijas kultivējot monoslānī un fibrīna matricisā vienu nedēļu. P vērtība: *p < 0,05, ***p < 0,001 un ****p < 0,0001.

Figure 3.1. Comparison of the secretion of matrix metalloproteinases. Three different fibroblast cell lines were cultivated in a monolayer and in a fibrin scaffold for one week. P value: *p < 0,05, ***p < 0,001 un ****p < 0,0001.

Matriksa metalloproteināžu sekrēcija šūnu vidē tika pārbaudīta arī starp divām dažādi veidotām kokultūrām. Fibroblastu šūnu līnijas 19Dp₁ un 20Dp₁ tika kultivētas fibrīna matricisā

kopā ar keratinocītu līniju 20Ep₃ 6-lauciņu platēs uz virsmas, kā arī 6-lauciņu platēs ar insertu. Kokultūras tika kultivētas divas nedēļas. Lai izvērtētu sekrēcijas atšķirības, kokultūru paraugiem, kas kultivēti uz insertiem, tika ievāktas šūnu vides gan no inserta virspuses (KKV), gan no apakšpuses (FKV). Starp abām fibroblastu šūnu līnijām tika novērota līdzīga MMP produkcija. Salīdzinājums starp šūnu līnijām ir apkopots 2. Pielikumā. MMP-2 un MMP-10 sekrēcija kokultūru paraugos, kas kultivēti uz 6-lauciņu plates virsmas (D+E) ir krietni zemāka nekā kokultūru insertu paraugiem (D+E_KKV un D+E_FKV) (attēls 3.2.). Savukārt tieši pretēji ir ar MMP-7 un MMP-9. MMP-1 tiek sekretēts abās kokultūru modeļsistēmās līdzīgā daudzumā. Interesanti, ka salīdzinot koncentrācijas vidē insertu kokultūrās starp inserta virspuses KKV un inserta apakšpuses FKV, ir novērojamas būtiskas atšķirības MMP-1, MMP-9 un MMP-10 sekrēcijā. Arī kokultūru paraugiem MMP-2 ir visaugstākajā koncentrācijā, bet MMP-9 – viszemākajā.



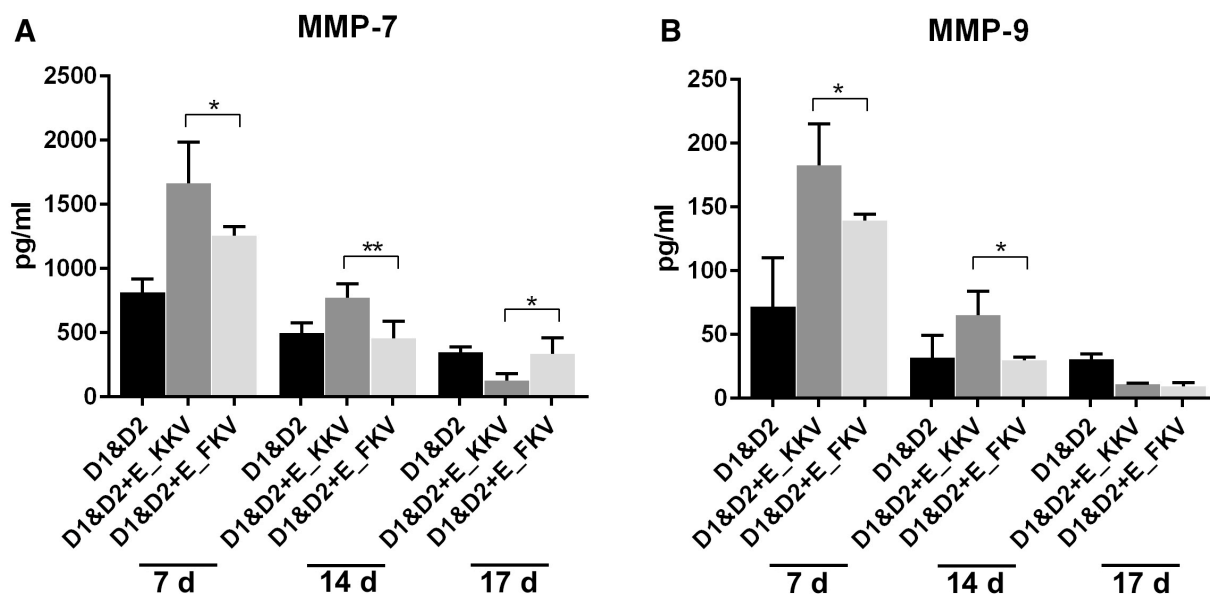
3.2. attēls. Matriksa metalloproteināžu sekrēcijas salīdzinājums fibroblastus un keratinocītus kultivējot kokultūrā uz 6-lauciņu plates virsmas (D+E) un kokultūrā uz inserta (D+E_KKV un D+E_FKV) divas nedēļas. P vērtība: *p < 0,05, ***p < 0,001 un ****p < 0,0001.

Figure 3.2. Comparison of the secretion of matrix metalloproteinases. Fibroblasts and keratinocytes were cultivated in a co-culture on a 6-well plate surface (D+E) and on a 6-well plate inserts (D+E_KKV and D+E_FKV) for two weeks. P value: *p < 0,05, ***p < 0,001 un ****p < 0,0001.

Turpmākajiem eksperimentiem kokultūras tika kultivētas uz insertiem, savukārt pārējās MMP, kā arī TIMP analīzes tika veiktas gan fibrīna matriksa paraugiem, kuros kultivēti tikai dermālie fibroblasti (uz 6-lauciņu plates virsmas), gan kokultūrām (insertos).

MMP-1, MMP-2 un TIMP-1 sekrēcija šūnu kultivēšanas vidē fibrīna matricas paraugiem uzrādīja vērtības, kas augstākas par detekcijas sliekšni, proti – 20000 pg/ml (MMP-1, TIMP-1) un 50000 pg/ml (MMP-2), tādēļ šiem analītiem nebija iespējams analizēt sekrēcijas līmeņu atšķirības starp dažādiem paraugiem.

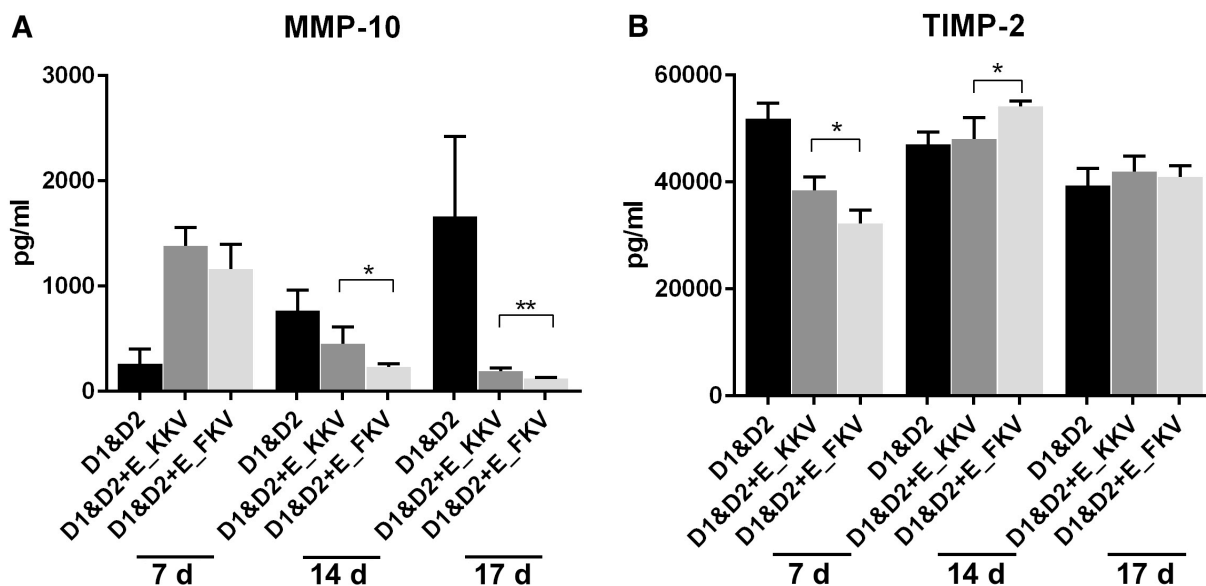
Lai novērtētu *in vitro* veidoto dermālo audu un kokultūru funkcionalitātes izmaiņas kultivēšanas laikā, tika analizēta MMP un TIMP sekrēcija dažādos kultivēšanas laika punktos. Dermālajiem matricas paraugiem (D1&D2) MMP-7 sekrēcija līdz ar kultivēšanas laiku samazinājās, tāpat kā kokultūru paraugiem (attēls 3.3. A). Svarīgi minēt, ka kopumā dermālie paraugi uzrāda zemākas koncentrācijas (< 1000 pg/ml) nekā kokultūras. Statistiski būtiskas atšķirības ir novērojamas arī salīdzinot MMP-7 produkciju starp vienas kokultūras divām vidēm (KKV un FKV), piemēram, kultivējot kokultūru uz inserta 7 un 14 dienas KKV vide uzrāda augstāku MMP-7 sekrēciju nekā FKV. Sekretētās MMP-7 koncentrāciju salīdzinājums starp abām pētījumā izmantotajām fibroblastu šūnu līnijām D1 un D2 pievienots 3. pielikumā. Visizteiktākās atšķirības starp šūnu līnijām ir novērojamas kultivēšanas 14. dienā, bet kopumā MMP-7 sintēze abām fibroblastu līnijām ir līdzīgā līmenī.



3.3. attēls. MMP-7 un MMP-9 sekrēcija biotehnoloģiski veidotos ādas audos. **A** – MMP-7 sekrēcija dermas audu modelim (D1&D2) un kokultūru paraugiem, kas kultivēti 7, 14 un 17 dienas. **B** – MMP-9 sekrēcija dermas audu modelim (D1&D2) un kokultūru paraugiem, kas kultivēti 7, 14 un 17 dienas. P vērtība: *p < 0,05 un **p < 0,01.

Figure 3.3. Secretion of MMP-7 and MMP-9 in bioengineered skin tissue. **A** – secretion of MMP-7 in dermal (D1&D2) and co-culture tissue models cultivated in a fibrin scaffold for 7, 14 and 17 days. **B** – secretion of MMP-9 in dermal (D1&D2) and co-culture tissue models cultivated in a fibrin scaffold for 7, 14 and 17 days. P value: *p < 0,05 and **p < 0,01.

Par MMP-9 sintēzi dermālajiem un kokultūru paraugiem var spriest līdzīgi kā par MMP-7 – kultivēšanas laikam pieaugot, samazinās MMP-9 produkcija, kā arī atšķirās metalloproteināzes koncentrācijas starp kokultūru vidēm kultivēšanas 7. un 14. dienā (attēls 3.3. B). MMP-9 šūnu vidē ir viszemākajā (< 250 pg/ml) koncentrācijā, salīdzinājumā ar pārējām MMP. Statistiski būtiskas atšķirības MMP-9 sekrēcijā starp šūnu līnijām ir novērojamas kultivēšanas 7. un 14. dienā dermālajiem paraugiem, kā arī kokultūru gadījumā KKV (4. pielikums).



3.4. attēls. MMP-10 un TIMP-2 sekrēcija biotehnoloģiski veidotās ādas audos. **A** – MMP-10 sekrēcija dermas audu modelim (D1&D2) un kokultūru paraugiem, kas kultivēti 7, 14 un 17 dienas. **B** – TIMP-2 sekrēcija dermas audu modelim (D1&D2) un kokultūru paraugiem, kas kultivēti 7, 14 un 17 dienas. P vērtība: *p < 0,05 un **p < 0,01.

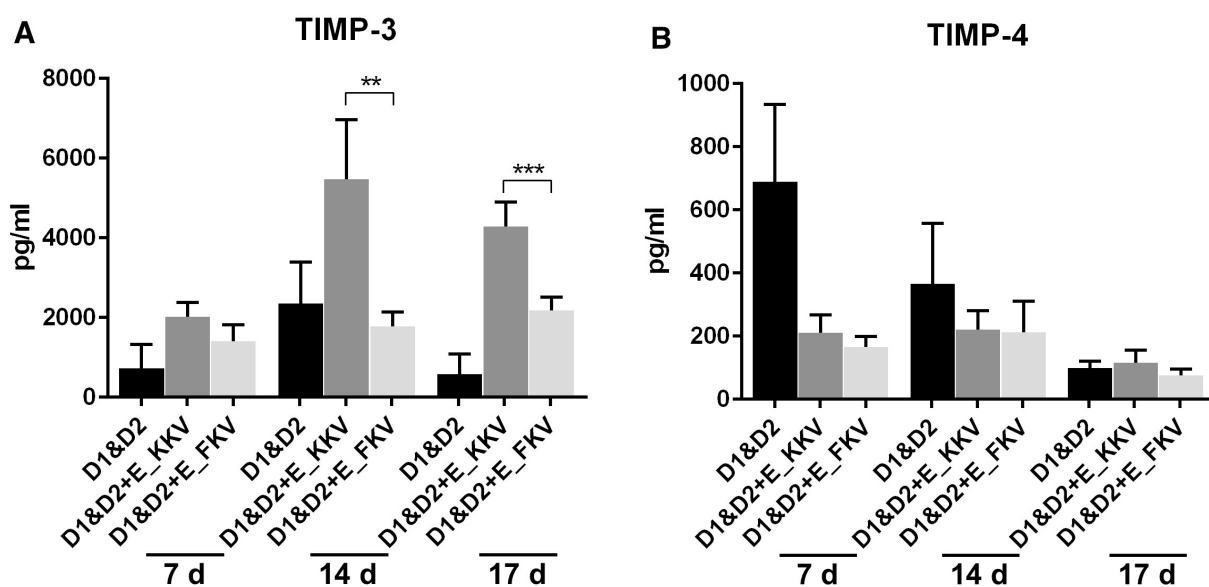
Figure 3.4. Secretion of MMP-10 and TIMP-2 in bioengineered skin tissue. **A** – secretion of MMP-10 in dermal (D1&D2) and co-culture tissue models cultivated in a fibrin scaffold for 7, 14 and 17 days. **B** – secretion of TIMP-2 in dermal (D1&D2) and co-culture tissue models cultivated in a fibrin scaffold for 7, 14 and 17 days. P value: *p < 0,05 and **p < 0,01.

MMP-10 sekrēcijā novērojamas atšķirīgākas tendences nekā MMP-7 un MMP-9. Dermālo paraugu vidē līdz ar kultivēšanas laiku pieaug MMP-10 koncentrācija, savukārt abās kokultūru vidēs tā mazinās (attēls 3.4. A). Septītajā kultivēšanas dienā MMP-10 dermālajos paraugos ir ievērojami mazāk nekā kokultūrās, bet jau pēc 17 dienām metalloproteināzes produkcija D1&D2 modeļsistēmās ir lielāka nekā kokultūrām. Samērā būtiskas atšķirības starp D1 un D2 šūnu līnijām ir saskatāmas dermālajos matricas paraugos un kokultūrās ar KKV (5. pielikums).

TIMP-2 koncentrācija samazinās D1&D2 fibrīna matricas paraugos kultivēšanas laikam pieaugot. Kokultūru vidēs 14. kultivēšanas dienā TIMP-2 sekrēcija ir visaugstākā, bet jau pēc

nepilnām trīs nedēļām tā ir atkal samazinājusies, turklāt, salīdzinot ar 7. dienu, TIMP-2 sintēze ir nedaudz augstāka (attēls 3.4. B). Sevišķi būtiskas atšķirības starp šūnu līnijām modeļsistēmās netika novērotas (6. pielikums).

Metalloproteināzes audu inhibitora-3 (TIMP-3) produkcija gan dermālajos paraugos, gan kokultūrās 14. kultivēšanas dienā pieauga vismaz divas reizes, salīdzinājumā ar 7. dienu, savukārt pēc 14. dienas skerēcija sāk samazināties (attēls 3.5. A). Statistiski būtiskas atšķirības starp TIMP-3 sintēzi kokultūru vidēs ir novērojamas kultivēšanas 14. un 17. dienā. Izteiktas atšķirības starp D1 un D2 šūnu līniju ir iespējams novērot kokultūras FKV paraugiem – D1 līnijai TIMP-3 sekrēcijā ir līdzīga tendence kā dermālajiem paraugiem un kokultūrām KKV, bet D2 līnijai tā ir tieši pretēja – 14. kultivēšanas dienā TIMP-3 koncentrācija ir viszemākā, tad tā atkal pieaug 17. dienā, kas ir apkopots 7. pielikumā.



3.5. attēls. TIMP-3 un TIMP-4 sekrēcija biotehnoloģiski veidotās ādas audos. **A** – TIMP-3 sekrēcija dermas audu modelim (D1&D2) un kokultūru paraugiem, kas kultivēti 7, 14 un 17 dienas. **B** – TIMP-4 sekrēcija dermas audu modelim (D1&D2) un kokultūru paraugiem, kas kultivēti 7, 14 un 17 dienas. P vērtība: **p < 0,01 un ***p < 0,001.

Figure 3.5. Secretion of TIMP-3 and TIMP-4 in bioengineered skin tissue. **A** – secretion of TIMP-3 in dermal (D1&D2) and co-culture tissue models cultivated in a fibrin scaffold for 7, 14 and 17 days. **B** – secretion of TIMP-4 in dermal (D1&D2) and co-culture tissue models cultivated in a fibrin scaffold for 7, 14 and 17 days. P value: **p < 0,01 and ***p < 0,001.

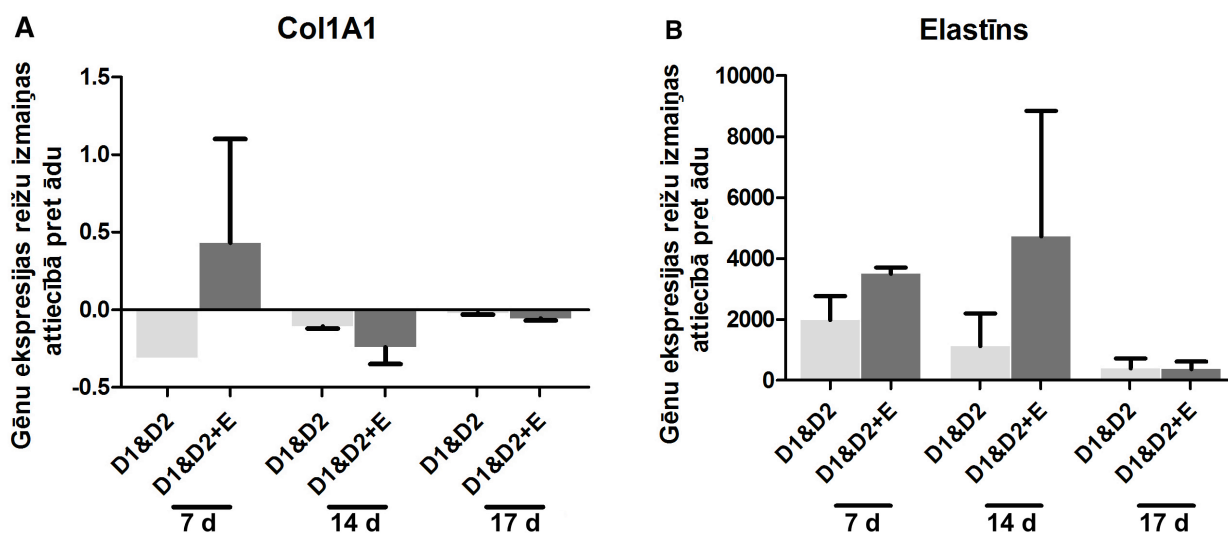
TIMP-4 sintēze D1&D2 modeļsistēmās izteikti samazinās, pieaugot kultivēšanas laikam (attēls 3.5. B). Kokultūrās inhibitora sekrēcija minimāli palielinās 14. kultivēšanas dienā, bet 17. atkal samazinās. Statistiski būtiskas atšķirības starp kokultūru vidēm netika novērotas, bet tās tika

konstatētas starp D1 un D2 fibroblastu līnijām – dermālajos paraugos 7. un 14., bet kokultūrās 14. un 17. kultivēšanas dienā (8. pielikums).

3.2. Strukturālo proteīnu un augšanas faktoru gēnu ekspresijas analīze

Strukturālo ādas proteīnu – elastīna, kolgēna, involukrīna, keratīnu (K6a, K10, K17, K19), kā arī atsevišķu augšanas faktoru (FGF-2, EGF, VEGF), MMP-1 un HAS2 gēnu ekspresijas noteikšanai biotehnoloģiski veidotos audos dažādos kultivēšanas laikos tika izmantota reāla laika polimerāzes ķēdes reakcijas metode. Iegūtie rezultāti tika izteikti kā gēnu ekspresijas reižu izmaiņas, kas attiecinātas pret īstas ādas audu paraugu.

Ņemot vērā dermas paraugus kopumā, ir novērojama mazāka pirmā tipa kolagēna (Col1A1) ekspresija nekā īstā ādā, tomēr ar kultivēšanas laiku tā minimāli palielinās. Kolagēns septiņās kultivēšanas dienas dermālajam fibrīna matricas paraugam ar D2 fibroblastu līniju netika vispār detektēts (attēls 3.6. A). Kokultūru paraugos kolagēns tika ekspresēts 7. kultivēšanas dienā vairāk nekā ādā, tomēr jāņem vērā salīdzinoši lielās atšķirības starp abiem analizētajiem paraugiem. Četrpadsmitajā kultivēšanas dienā ekspresija ir krietni samazinājusies tai pavisam nedaudz palielinoties atkal 17. dienā.



3.6. attēls. Col1A1 un elastīna gēnu ekspresijas reižu izmaiņas biotehnoloģiski veidotos ādas audos attiecībā pret īstas ādas paraugu. **A** – Col1A1 ekspresijas reižu izmaiņas paraugiem, kas kultivēti 7, 14 un 17 dienas. **B** – elastīna ekspresijas reižu izmaiņas paraugiem, kas kultivēti 7, 14 un 17 dienas.

Figure 3.6. Fold change of Col1A1 and elastin gene expression for bioengineered skin tissue samples in comparison with real skin. **A** – fold change of Col1A1 expression for samples that were cultivated for 7, 14 and 17 days. **B** – fold change of elastin expression for samples that were cultivated for 7, 14 and 17 days.

Līdzīgi kā kolagēna gadījumā, elastīna ekspresija starp dermālajiem un kokultūru paraugiem atšķiras. Kokultūrās elastīns tiek ekspresēts vairāk pirmajās divās kultivēšanas nedēļās, turklāt pēc 7. dienas elastīna ekspresija strauji pieaug, bet pēc 15. dienas sarūk. Dermālajos fibrīna matricos elastīns līdz ar kultivēšanas laiku tiek ekspresēts arvien mazāk (attēls 3.6. B).

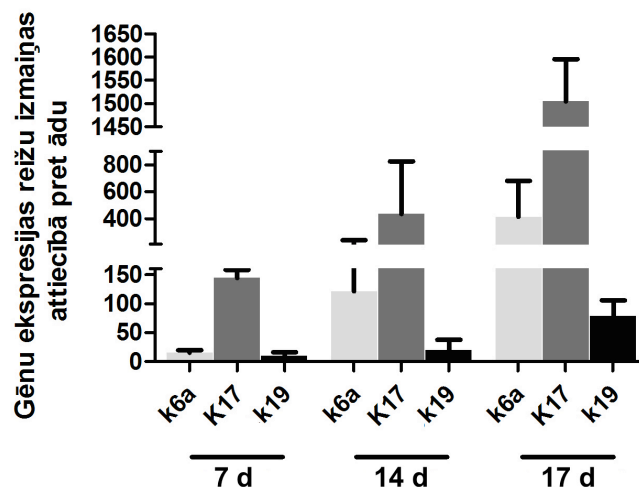
Involukrīns (IVL) netika detektēs vairumā paraugu, tādēļ arī par ekspresijas tendenci nebija iespējams objektīvi spriest un dati netika apkopoti grafikā. Augšanas faktoru (FGF-2, EGF un VEGF), kā arī HAS2 un MMP-1 ekspresijas kultivēšanas laika periodā ir apkopotas 9. pielikumā.

Epidermālais augšanas faktors dermālajos fibroblastos (D1&D2) tiek ekspresēts vairāk nekā kokultūrās, ekspresijai pieaugot ar kultivēšanas laiku. Kokultūrās EGF ekspresija ir līdzīgā līmenī ar ādas audiem. Pretēji EGF, fibroblastu augšanas faktors-2 (FGF-2) dermālajos matricu paraugos ir krietni zemākā ekspresijas līmenī attiecībā pret īstu ādu. Otrajā matricu kultivēšanas nedēļā ļoti izteikta ir pazemināta FGF-2 ekspresija. Toties kokultūrās FGF-2 detekcija atkal ir pietuvināta ādas paraugam. VEGF kokultūrās tiek ekspresēts 7. kultivēšanas dienā visvairāk, bet 17. dienā tā ekspresija ir kļuvusi jau zemāka par ādā ekspresēto VEGF. Augšanas faktors dermālajos paraugos 7. un 17. kultivēšanas dienā ir līdzīgā ekspresijas līmenī, savukārt 14. dienā tas ir viszemākais.

Hialuronskābes sintāze 2 (HAS2) abās modeļsistēmās tiek ekspresēta viszemāk 7. kultivēšanas dienā, savukārt 14. tās ekspresija pieaug, tad atkal samazinās 17. dienā.

MMP-1 modeļsistēmās, attiecībā pret ādas audiem, tiek ekspresēta ievērojami mazāk. Dermālajos paraugos MMP-1 ekspresija palielinās, pieaugot kultivēšanas laikam (7. un 14. dienā), savukārt kokultūrās tas ievērojami pazeminās.

Keratīnu ekspresijas izmaiņas tika noteiktas tikai kokultūru paraugiem (attēls 3.7.). Visu keratīnu (K6a, K17 un K19) ekspresija palielinās, kultivēšanas laikam pieaugot.



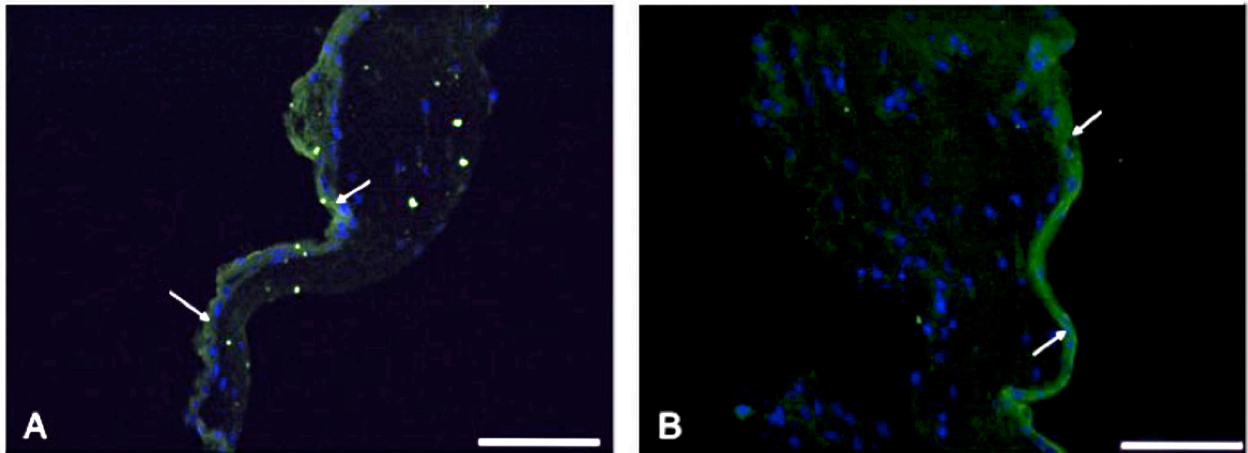
3.7. attēls. K6a, K17 un K19 gēnu ekspresijas reižu izmaiņas biotehnoloģiski veidotās ādas audu kokultūrās (D1&D2+E) attiecībā pret īstas ādas paraugu. Paraugi tika kultivēti 7, 14 un 17 dienas.

Figure 3.7. Fold change of K6a, K17 and K19 gene expression for bioengineered skin tissue co-cultures (D1&D2+E) in comparison with real skin. Samples were cultivated 7, 14 and 17 days.

No detektētajiem keratīniem K17 tiek ekspresēts visvairāk, pēc tam K6a, tad attiecīgi – K19. Attiecinot keratīnu gēnu ekspresijas izmaiņas pret īstas ādas audiem var izteikti novērot, ka K17, K6a un K19 (salīdzinoši gan mazāk) tiek ekspresēti ievērojami vairāk modeļsistēmās nekā ādā – jau 7. kultivēšanas dienā to ekspresijas līmenis vairākkārt pārsniedz ekspresiju ādā. Darba gaitā K10 ekspresija netika detektēta lielākajā vairumā paraugu.

3.3. Strukturālo proteīnu sintēzes analīze

Lai raksturotu biotehnoloģiski veidotu ādas audu modeļsistēmu strukturālo proteīnu sintēzi, papildus gēnu ekspresijas analīzēm, tika veiktas imunohistoķīmijas un imunoblotēšanas analīzes. Ar šīm metodēm tika pārbaudīti gan dermālo fibroblastu paraugi (D1 un D2 fibrīna matiksā), gan fibroblastu-keratinocītu kokultūras (D1+E un D2+E fibrīna matiksā uz inserta). Kontrolei tika izmantoti īstas ādas audi.



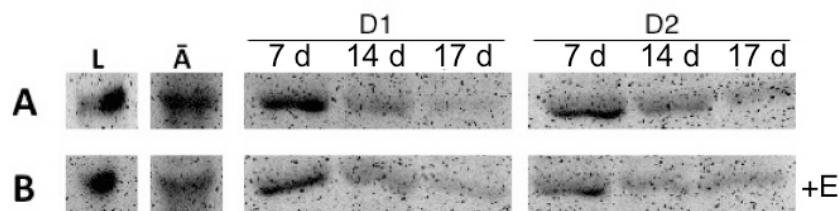
3.8. attēls. K13 detekcija kokultūru paraugos. **A** – D1+E kokultūra kultivēta divas nedēļas fibrīna matriciņā. **B** – D2+E kokultūra kultivēt fibrīna matriciņā 17 dienas. Mērogs atbilst 50 μm.

Figure 3.8. Detection of K13 in co-culture samples. **A** – co-culture D1+E cultivated for two weeks in a fibrin scaffold. **B** – co-culture D2+E cultivated in a fibrin scaffold for 17 days. Scale corresponds to 50 μm.

Ar imunofluoroķīmijas krāsošanas metodi tika noteikta pirmā tipa kolagēna (Col1) un elastīna klātbūtne abās modeļsistēmās, bet kokultūrās papildus arī tika detektēts citokeratīns 13 (K13). Dermālajos paraugos (D1&D2) neizdevās veikt neviena marķiera detekciju. Kokultūrās savukārt detektējams bija tikai K13 kultivēšanas 14. un 17. dienā (attēls 3.8.). Fibrīna matriciņu modeļsistēmās, kā arī īstas ādas audos bija izteikti novērojama autofluorescence FITC kanālā (10.pielikums).

Ar imunoblotēšanu jeb western blot metodi tika veikta Col1 un laminīna-5 (Lam-5) analīze abās modeļsistēmās. Papildus īstas ādas (Ā) audu lizātam, kas iegūts no pēcoperācijas materiāla, kā pozitīvā kontrole tika izmantots jau gatavs, komerciāli pieejams cilvēka ādas audu lizāts (L) #ab30166 (AbCam, Lielbritānija).

Col1 tika detektēts visos modeļsistēmas paraugos (attēls 3.9.). Visizteiktāk kolagēns tika ekspresēts paraugos, kas kultivēti tieši septiņās dienas. Līdz ar kultivēšanas laiku kolagēna ekspresija mazinās.



3.9. attēls. Col1 detekcija biotehnoloģiski veidotās ādas audos (L – komerciāli pieejams ādas audu lizāts, Ā – īstas ādas audu lizāts). **A** – Col1 detekcija D1&D2 dermalajos matriciņa paraugos. **B** – Col1 detekcija D1&D2+E kokultūrās.

Figure 3.9. Detection of Col1 in bioengineered skin tissue (L – commercially available real skin tissue lysate, Ā – real skin tissue lysate). **A** – detection of Col1 in D1&D2 dermal fibroblast samples. **B** – detection of Col1 in D1&D2+E co-cultures.

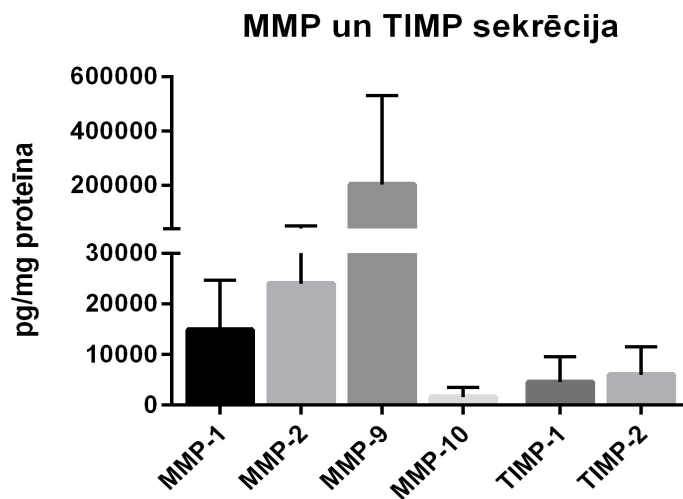
Lam-5 ar imunoblotēšanas metodi modeļsistēmās detektēts netika. Arī darbā gatavotajos ādas audu lizātos tika konstatēta zema laminīna klātbūtne.

3.4. Hronisku brūču iekaisuma modelēšana

3.4.1. Testēšanā izmantotie eksudāti

Sadarbībā ar PSKUS Asinsvadu ķirurģijas nodaļu pavisam kopā tika ievākti 70 hronisku brūču eksudāti, no kuriem 33 paraugi pieder pie venozo čūlu tipa, bet pārējie – arteriālām, diabētiskām un jauktām čūlām. Katrs ievāktais brūces šķidrums tika sīkāk raksturots (pēc čūlas attīstības fāzes, vecuma, izmēra, pacienta dzimuma un vecuma, brūces lokalizācijas), kā arī šajos eksudātos tika noteiktas MMP, TIMP un ar angiogēnēzi saistīto augšanas faktoru (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8) koncentrācijas. Tā kā venozais čūlu tips ir viens no izplatītākajiem hronisku brūču veidiem, tad darbā tika apskatīta tieši šī paraugu grupa.

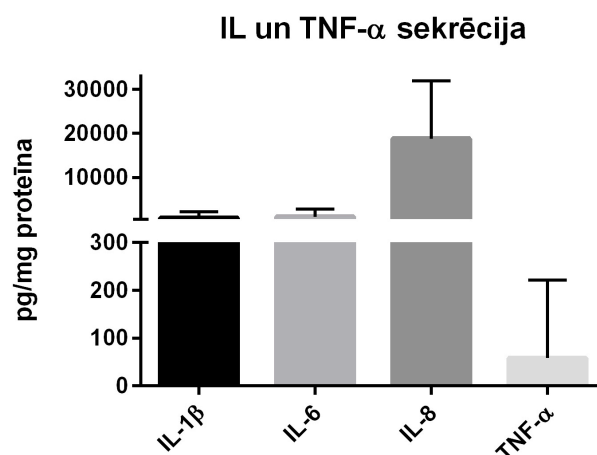
Lielākajā daļā eksudātu paraugu MMP-7, TIMP-3 un TIMP-4 sekrēcija bija zem detekcijas sliekšņa, savukārt MMP-10 produkcija četros paraugos netika detektēta.



3.10. attēls. MMP un TIMP sekrēcija hronisku venozo čūlu eksudātu paraugos.

Figure 3.10. Secretion of MMP and TIMP in exudates from chronic venous ulcers.

Visaugstākais sekrēcijas līmenis venozo brūču eksudātos bija MMP-9 (attēls 3.10.), savukārt MMP-10 vismazākais. Mazliet vairāk par MMP-1 tika sintezēta MMP-2. TIMP produkcija eksudātos ir novērojama mazākā daudzumā nekā MMP, izņemot MMP-10. TIMP-2 tika sekretēts vairāk nekā TIMP-1.



3.11. attēls. IL-1 β , IL-6, IL-8 un TNF- α sekrēcija hronisku venozo čūlu eksudātu paraugos.

Figure 3.11. Secretion of IL-1 β , IL-6, IL-8 and TNF- α in exudates from chronic venous ulcers.

No interleikīniem, kas tika sekretēti eksudātos, IL-8 uzrādīja visaugstāko produkciju, bet IL-1 β un IL-6 nedaudz zemāku, bet savstarpēji līdzīgu sekrēciju (attēls 3.11.). Desmit eksudātu paraugos no 33 IL-8 sintēze bija virs detekcijas sliekšņa, tālākā datu analīzē tika iekļauti 23 paraugi. TNF- α tika sekretēts vismazāk salīdzinājumā ar interleikīnu, MMP un TIMP produkciju eksudātos.

3.4.2. Audu dzīvotspējas ietekme

Lai novērtētu šūnu dzīvotspēju brūces vidē un izvērtētu iespējas izmantot *in vitro* fibrīna matricā veidotus dermālos audus kā testsistēmu, tika veikts izmēģinājuma eksperiments. Vispirms fibrīna matricā tika kultivēti fibroblasti (D2 šūnu līnija), kuriem pēc nedēļas tika pievienoti divi izvēlēti venozo čūlu eksudātu paraugi Ex1 un Ex2 (tabula 3.4.2.). Kā kontrole tika izmantots CAB eksudātu ekstragēšanas buferis. Dermas audi tika inkubēti ar abiem eksudātu paraugiem un kontroli – 4 un 24 stundas. Pēc inkubēšanas laika beigām tika novērtētas audu dzīvotspējas izmaiņas izmantojot MTT testu. Ar angiogēnēzi saistīto augšanas faktoru, MMP un TIMP koncentrācijas izvēlētajos eksudātos ir pievienotas 3.4.3. tabulā.

3.4.2. tabula. Venozo čūlu eksudāti, kas izmantoti šūnu dzīvotspējas novērtēšanai.

Table 3.4.2. Chronic wound exudates from venous ulcers used in MTT cell viability assay.

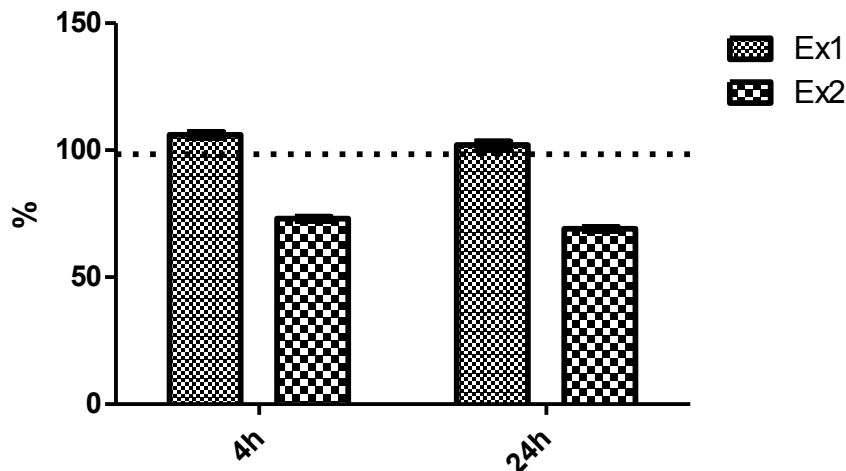
	Ex 1	Ex 2
Pacienta dzimums	Sieviete	Sieviete
Pacienta vecums	1973.g (42 gadi)	1937.g (78 gadi)
Čūlas attīstības fāze	Eksudatīvā	Eksudatīvā
Čūlas vecums	2 – 4 nedēļas	4 – 8 nedēļas
Čūlas izmērs	2 – 5 cm ²	2 – 5 cm ²
Čūlas lokalizācija	Kreisās kājas apakšstilbs (ārpuse)	Labās kājas apakšstilbs (iekšpuse)
Proteīnu koncentrācija	0,394 mg/ml	0,039 mg/ml

3.4.3. tabula MMP, TIMP, IL un TNF- α koncentrācijas venozo čūlu eksudātos Ex1 un Ex2.

Table 3.4.3. Concentrations of MMP, TIMP, IL and TNF- α in venous chronic wound exudates Ex1 and Ex2 .

	Ex 1 (pg/mg)	Ex 2 (pg/mg)
MMP-1	15261,66	28229,67
MMP-2	21580,21	107369,87
MMP-7	ND	ND
MMP-9	19013,73	1522321,72
MMP-10	445,16	2822,49
TIMP-1	4628,64	11205,08
TIMP-2	2640,77	6548,21
TIMP-3	ND	ND
TIMP-4	ND	ND
IL-1β	428,20	356,03
IL-6	771,03	10071,12
IL-8	ND	ND
TNF-α	24,37	941,97

*ND – netika detektēts



3.12. attēls. Šūnu dzīvotspējas novērtēšana biotehnoloģiski veidotos dermālajos ādas audos pēc divu venozo čūlu eksudātu inkubēšanas 4 un 24 stundas.

Figure 3.12. Evaluation of cell viability in bioengineered dermal skin tissue after 4 and 24-hour incubation of two venous chronic wound exudates.

MTT tests uzrādīja, ka šūnu dzīvotspēja, attiecībā pret kontroles paraugu (pieņemts par 100%), dermālo fibroblastu modeļsistēmās atšķiras, inkubējot uz tām eksudātus divos dažādos laikos (attēls 3.12.). Pēc 4 h inkubācijas audu paraugs, kam pievienots Ex1 uzrādīja dzīvotspēju, kas ir līdzvērtīga kontrolei – aprēķinātā vērtība parāda, ka tā ir pat 6% augstāka (106%), savukārt Ex2 gadījumā audu dzīvotspēja ir par 27% zemāka (73%) nekā kontrolei. Pēc 24 h inkubācijas abu eksudātu klātbūtne dermālajos paraugos šūnu dzīvotspēju samazināja par 4%. Ex1 gadījumā pēc 24 h inkubācijas audu paraugs uzrādīja 102% dzīvotspēju, bet Ex2 – 69%, kas ir par 31% mazāk nekā kontrolei.

4. DISKUSIJA

4.1. Ādas struktūrproteīnu un ar brūču dzišanu saistīto iekaisuma marķieru detekcijas izmaiņu novērtēšana biotehnoloģiski veidotos ādas audos

Sākotnēji tika uzskatīts, ka MMP ir endopeptidāzes, kuru galvenā funkcija aprobežojas tikai ar ECM katabolismu. Tomēr šobrīd ir zināms, ka MMP dominējošā nozīme *in vivo* ir plaša spektra ekstracelulāru un bioloģiski aktīvu substrātu šķelšana, kā arī šādu proteīnu aktivitātes regulācija (Gill and Parks 2008).

Augsta MMP produkcija liecina par aktīvu ECM komponentu noārdīšanu, matricas remodelēšanās gaitā. No visām MMP, MMP-1 visvairāk ir nepieciešama epitēlija šūnu, fibroblastu un vaskulārā endotēlija šūnu migrācijas nodrošināšanai caur ECM. MMP-1 jeb intersticiālā kolagenāze šķel I tipa kolagēnu un novājina šūnu membrānas pieķeršanos matricam, ļaujot šūnām kustēties cauri kolagēna matricam (Gibson *et al.* 2009). Darbā novērojams, ka tieši MMP-1 sekrēcija līdz ar MMP-2 jeb IV tipa kolagenāzes (želatināzes-A) ir viena no izteiktākajām starp visām noteiktajām metalloproteināzēm, kas norāda uz aktīvu ECM komponentu noārdīšanu un remodelēšanu *in vitro* veidotu audu kultivēšanas laikā.

MMP produkcija monoslāņa kultūrās ir būtiski augstāka nekā fibrīna modeļsistēmās. Iegūtie dati ir pretēji gaidītajam, jo fibrīna matricā ir salīdzinoši vairāk substrāta, kas varētu stimulēt MMP aktivitāti. Sekretētā MMP daudzuma atšķirības starp monoslāni un matricas kultūrām varētu būt skaidrojamas ar to, ka fibrīna matricā veido salīdzinoši blīvu struktūru un noteikta daļa no šūnu producētām MMP nenokļūst šūnu kultivēšanas vidē, bet gan paliek pašā matricā.

Lai novērtētu, vai pastāv būtiskas atšķirības MMP sekrēcijā starp dažādām kokultūru modeļsistēmām, tika izveidotas divas atšķirīgas kokultūras ar vienādām šūnu līnijām. Abas fibroblastu un kertinocītu kokultūras tika kultivētas fibrīna matricā, bet uz atšķirīgām virsmām – 6-lauciņu plates un inserta divas nedēļas. Kokultūrām uz inserta tika ievāktas divas atšķirīgas šūnu vides – apakšējam slānim FKV, bet augšējam KKV (3.2. attēls). Augstākās MMP koncentrācijas modeļsistēmās bija MMP-1 un MMP-2, bet zemākās – MMP-9 un MMP-10. Šāda sekrēcijas tendence arī tika novērota, salīdzinot MMP produkciju, starp šūnu kultivēšanu monoslānī un fibrīna matricā. Iegūtie rezultāti norādīja, ka MMP sintēzi ietekmē tas, kā tiek veidota modeļsistēma. Biotehnoloģiski veidotu kokultūru paraugu salīdzināšana tika veikta, lai izvēlētos modeli, kurš ir pilnīgāks un dotu korektākos rezultātus turpmākiem pētījumiem. MMP-1, MMP-2 un MMP-10 sekrēcija ir augstāka kokultūras kultivējot uz insertiem nekā uz plates

virsmas, savukārt MMP-7 un MMP-9 tas ir tieši pretēji. Šādu gadījumu būtu iespējams skaidrot ar to, ka uz plates virsmas kultivētajām kokultūrām bija par vienu mililitru vairāk fibrīna substrāta nekā insertu modeļsistēmām, un šūnu skaits tika attiecināts uz atšķirīgo virsmas laukuma izmēru nevis matriksa tilpumu. Paaugstinātā MMP-7 un MMP-9 sekrēcija kokultūru D+E gadījumā varētu liecināt par to, ka tās aktīvāk piedalās fibrīna noārdīšanā nekā pārējās metalloproteināzes. D+E kokultūrās dziļāk esošās šūnas saņem arī mazāk barības vielas, tādēļ pastāv šīs atšķirības starp abām modeļsistēmām. Ņemot vērā, ka inserta gadījumā (šūnām saņemot barības vielas arī no apakšpusēs) šīs biotehnoloģiski veidotu ādas audu kokultūras precīzāk imitē īstu ādu, kā arī bioloģiskos procesus tajā, turpmākiem pētījumiem tika izmantota tieši insertu kokultūru veidošanas metode. Interesanti, ka statistiski būtiskas atšķirības MMP sintēzē tika detektētas starp abām insertu kokultūru kultivēšanas vidēm – KKV un FKV. To var skaidrot ar to, ka insertā matriksa virspusi pārklāj keratinocīti, bet apakšu – fibroblasti. Katram šūnu tipam arī ir atšķirīgas īpašības un funkcijas, kas varētu ietekmēt MMP sekrēciju, līdz ar to tika izmantotas divas kultivēšanas vides, kas pielāgotas konkrētajam šūnu tipam.

Ņemot vērā, ka starp D1 un D2 šūnu līnijām MMP un TIMP sekrēcijā bija relatīvi maz būtisku atšķirību (3.-8. pielikumi), grafikos (3.3.-3.5. attēls) tika apkopotas abu līniju vidējās vērtības. Salīdzinot MMP sintēzes izmaiņas dermālajās modeļsistēmās un insertu kokultūrās trīs dažādos kultivēšanas laikos (3.3. attēls), var secināt, ka biotehnoloģiski veidotos ādas audos, pateicoties augstajai MMP-1 un MMP-2 produkcijai, notiek aktīva kolagēna remodelēšana. Lai gan MMP-1 sekrēcija netika detektēta ar ELISA/xMAP metodi, tomēr gēnu ekspresija uzrāda, ka dermālajos paraugos kultivēšanas laikā MMP-1 ekspresija palielinās (9. pielikums), savukārt kokultūrās – samazinās, ja modeļsistēmas tiek salīdzinātas ar īstas ādas audiem. MMP-7 un MMP-9 uzrādīja līdzīgu tendenci – pieaugot modeļsistēmu kultivēšanas laikam, abu metalloproteināžu koncentrācijas samazinājās. Dermālajās modeļsistēmās MMP koncentrācija 7. un 14. dienā bija ievērojami zemāka nekā kokultūrās, toties 17. kultivēšanas dienā abās modeļsistēmās sekrēcijas līmenis bija līdzvērtīgs. Var teikt, ka šo abu metalloproteināžu zemais sekrēcijas līmenis ir pozitīvs rādītājs, jo paaugstināta MMP-7 produkcija tiek saistīta ar šūnu hiperproliferāciju, neoplastiskiem un iekaisuma procesiem (Edman *et al.* 2011). Arī palielināta MMP-9 sintēze liecina par keratinocītu hiperproliferāciju, kas var novest pie tādu audu struktūru veidošanās, kas neatbilst *in vivo* ādas optimālai imitēšanai (Coussens *et al.* 2000). MMP-10 jeb stromelizīns-2 atbild par fibronektīna un proteoglikānu degradāciju (Dong *et al.* 2002). Līdzīgi kā MMP-7 un MMP-9 arī MMP-10 sekrēcija kokultūras modeļsistēmām samazinājās (3.4. attēls),

kultivēšanas laikam pieaugot. Interesanti, ka dermālajiem fibrīna matricisa paraugiem šī sekrēcija bija gluži pretēja – 17. kultivēšanas dienā MMP-10 koncentrācija dermās bija pat lielāka nekā kokultūrās pirmajā kultivēšanas nedēļā. Kā iemeslu šādam kontrastam varētu minēt keratinocītu klātbūtni – to esamība modeļsistēmā kopā ar fibroblastiem mazina MMP-10 sekrēciju. Iespējams, lai sekrēciju analīze būtu optimālāka, tad arī dermas paraugus būtu vēlams kultivēt uz insertiem. Svarīgi arī minēt, ka pirmajā kultivēšanas nedēļā fibrīns ir visvairāk pieejamais substrāts, tātad ar fibrīna noārdīšanu saistītajām MMP (MMP-2, MMP-7, MMP-10) pirmajā kultivēšanas nedēļā vajadzētu tikt producētām visaugstākajā koncentrācijā.

Visu MMP daudzumu regulē četri matricisa metalloproteināžu audu inhibitori TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 un TIMP-4. Tie inhibē attiecīgās MMP attiecībā 1:1. MMP inhibitoriem ir svarīga loma ādas audu atjaunošanās procesos (Gill and Parks 2008). TIMP-1 augstā sekrēcija biotehnoloģiski veidotajos ādas audos, kas bija virs detekcijas sliekšņa (20000 pg/ml) liecina, ka tas aktīvi iesaistās MMP inhibēšanā. Pārmērīga TIMP-1 sintēze izraisa būtisku inhibīciju UVB-inducētā ECM noārdīšanā, kā arī samazinātas ādas elastības un raupjuma supresijā (Yokose *et al.* 2012). TIMP-2 koncentrācija dermālajos paraugos līdz ar kultivēšanas laiku minimāli samazinās, toties kokultūrās 14. dienā TIMP-2 līmenis abās vidēs ir palielinājies. Ar kultivēšanas 17. dienu inhibitora sintēze izlīdzinās abās modeļsistēmās. TIMP-2 sevī iekļauj visplašāko MMP inhibēšanas spektru, tādēļ arī audos tas ir pietiekamā daudzumā (Dong *et al.* 2002). Ir veikti pētījumi, kas pierāda, ka ādas brūču apstrādāšana ar TIMP-2 pasliktina brūces epitelizāciju un saraušanos, kā arī tas samazina šūnu diferenciāciju granulācijas audos (Tabandeh *et al.* 2014). TIMP-3 arī sevī iekļauj plašu MMP inhibēšanas spektru, tādēļ tā izteiktā sekrēcija kokultūrās ir saprotama. Ir novērojama arī koelācija starp TIMP-3 un MMP-10, it īpaši kultivēšanas 17. dienā. Keratinocīti sekretē ievērojami vairāk TIMP-3 nekā fibroblasti, līdz ar to būtu skaidrojams MMP-10 koncentrācijas pieaugums dermālajos paraugos, jo netiek sintezēts šis proteīnāzes inhibitors (TIMP-3) (Sawicki *et al.* 2005). TIMP-4 savukārt no darbā apskatītajām MMP inhibē tikai MMP-1, MMP-2, MMP-7 un MMP-9 (Dong *et al.* 2002). TIMP-4 sintēze 17. kultivēšanas dienā abās modeļsistēmās arī uzrādīja viszemākās koncentrācijas starp visiem TIMP. Ja runā par MMP un TIMP savstarpēju korelāciju, tad svarīgi minēt, ka TIMP-1 un TIMP-2 inhibē visas darbā detektējamās MMP (Dong *et al.* 2002). Novērojama tendence, kur, samazinoties MMP-7 un MMP-9 sekrēcijai ar kultivēšanas laiku, samazinās arī TIMP-4 koncentrācija, kas ir diez gan negaidīti, jo inhibitors piedalās abu šo MMP regulācijā. Citas savstarpēji ievērojamas sakritības starp MMP un TIMP sekrēciju modeļsistēmās kultivēšanas laikā netika novērotas.

Papildus jau noteiktajām MMP būtu nepieciešamas arī MMP-3 analīzes, kas šajā darbā vēl netika veiktas. Tas būtu nepieciešams, jo šī proteīnāze veicina fibrīna noārdīšanos, šķeļot specifiskas tā sekvences, kā arī MMP-3 piedalās brūču dzīšanas un ādas atjaunošanās procesos (Farage *et al.* 2010).

Lielākais komponents normālā ādā ir ECM – gēlveida matrikss, kuru producē tajā esošās šūnas. Ādai piemīt ievērojama elastība un kompresijas spēja, ko nodrošina divas galvenās ECM molekulu klases, kuras sekretē fibroblasti un epidermālās šūnas – šķiedrveida strukturālie proteīni (kolagēns, elastīns, laminīns) un proteoglikāni (hialuronāns) (Schultz *et al.* 2005).

Gēnu ekspresijas rezultāti uzrādīja salīdzinoši līdzīgu I tipa kolagēna (Col1A1) ekspresiju īstā ādā, salīdzinājumā ar audu modeļsistēmām. Vairāk atšķīrās ekspresija pirmajās divās fibrīna matriksu kultivēšanas nedēļās (7. un 14. dienā), bet 17. dienā Col1A1 daudzums jau izlīdzinājās, līdzīga tendence bija novērojama arī attiecībā uz elastīna gēna ekspresiju, lai gan tas tika detektēts ievērojami lielākā daudzumā biotehnoloģiski veidotajos audos nekā ādā. Tas nozīmē, ka jau pēc 17. dienām audu modeļsistēmas ir spējīgas ekspresēt ādai raksturīgos strukturālos proteīnus līdzvērtīgā līmenī, kā tas ir īstā ādā. Optimālākiem rezultātiem, protams, būtu ieteicams veikt vairākus atkārtojumus no plašākas paraugu kopas. Interesanti gan minēt, ka pretēji gēnu ekspresijai, ar imunohistoķīmijas metodi neizdevās detektēt ne kolagēnu ne elastīnu ādas audos. To iespējams varētu skaidrot ar izteikto autofluorescenci, kas bija novērojama gan modeļsistēmām, gan ādas audiem FITC un TRITC kanālos, ar kuriem tika detektēti abi proteīni, tādēļ ir nepieciešams optimizēt fluorescējošās imunohistoķīmijas metodi ādas audiem. Principā jāņem arī vērā, ka, ja notiek attiecīgo gēnu ekspresija, tas nenozīmē, ka proteīns tiek producēts. Pretēji gēnu ekspresijas rezultātiem, imunoblotēšana uzrādīja, ka kolagēns biotehnoloģiski veidotajos audos ir vienmērīgākā daudzumā kā ādā tieši kultivēšanas 7. nevis 17. dienā.

Ņemot vērā to, ka Lam-5 un involukrīna (IVL), kas ir ādas strukturālie proteīni, gēnu ekspresija netika detektēta, iespējams ir nepieciešams ilgāks audu kultivēšanas laiks to ekspresijas stimulēšanai.

Kokultūrās keratīnu ekspresija pieauga līdz ar kultivēšanas laiku, kā arī tā ir ievērojami augstāka nekā īstas ādas audos. Tiek uzskatīts, ka abi keratīni – K6a un K17 piedalās iekaisuma procesos un tiek asociēti ar šūnu proliferāciju, ar ko arī varētu skaidrot paaugstināto ekspresiju, pieaugot kultivēšanas laikam (Hattori *et al.* 2002). Fibrīna matrikss ar laiku sāk degradēties, šūnām radot nelabvēlīgākus augšanas apstākļus 6-laiciņu platē, līdz ar to paaugstināta K6a un K17 ekspresija norāda uz to, ka keratinocītiem rodas nepieciešamība pret jaunu substrātu, uz kura

balstīties, ko nevar nodrošināt apakšējais fibroblastu slānis. Galvenā keratīnu funkcija ir mehāniskās stabilitātes piešķiršana epitēlijam un to aizsargāšana pret cita veida stresu (Reichelt *et al.* 2004). K10 ir proteīns, kas veido keratinocītu strukturālo pamatu epidermas, matu un nagu stiprināšanai (Reichelt and Magin 2002). Iespējams tādēļ, ka keratīns raksturīgs vairāk keratinocītiem, kuri attīsta ādas audu pārveidnes, tad arī modeļsistēmās K10 ekspresija netika detektēta. Papildus gēnu ekspresijā noteiktajiem keratīniem ar imunofluoroķīmijas metodi tika detektēts arī citokeratīns 13 biotehnoloģiski veidotos ādas audos, kurš raksturīgs bazālajam keratinocītu slānim un (3.8 attēls). Lai gan K13 raksturīgs vairāk tieši gļotādai, tā detekcija ādas un modeļsistēmu audos liecina par keratinocītu funkcionalitāti. Vizuāli bija skatāms, ka epidermas slānis ilgākā kultivēšanas laikā izteiktāk formējas virs dermālā fibroblastu slāņa.

Par epidermālo keratinocītu proliferāciju un diferenciaciju atbild vairāki augšanas faktori, kā EGF un FGF (Reichelt and Magin 2002). EGF ekspresija dermālajās modeļsistēmās bija ievērojami augstāka nekā FGF-2, toties kokultūras uzrādīja abu GF ekspresijas līdzīgā līmenī, kā tas ir īstā ādā. Līdzīgi var spriest arī par HAS2 un VEGF ekspresiju, kas savukārt liecina, ka kokultūru veidotās modeļsistēmas ir precīzāks *in vivo* apstākļus imitējošs modelis nekā dermālie paraugi. Kokultūras pietiekami kvalitatīvi atdarina un sintezē ādas audiem raksturīgos marķierus, kas dod iespēju attīstīt dažādu vielu vai komponentu testēšanu *in vitro* kultivētos ādas audos.

4.2. Hronisku venozo čūlu eksudātu sekretēto marķieru analīze

Brūču dzīšana ir diannisks process, kas sevī iekļauj koordinētu dažādu šūnu tipu atbildes reakcijas. Starp daudziem gēnu produktiem, kas ir būtiski normālu audu restaurācijai, atsevišķas MMP darbojas, kā labvēlīgi un reizēm arī nelabvēlīgi atjaunošanās procesu regulātori (Gill and Parks 2008). Lai gan MMP ir nozīmīga loma proteīnu noārdīšanā, ar mērķi atbrīvot vietu jaunu audu veidošanai, tomēr, kad MMP brūcē ir pārāk augstā līmenī vai pārāk ilgu laiku, tās sāk degradēt tādus proteīnus, kas nav to ierastie substrāti. Tādējādi tiek sašķelti citi, brūču dzīšanas procesam svarīgi, proteīni (GF, receptori un citi ECM proteīni), kavējot audu atjaunošanās procesu (Gibson *et al.* 2009).

Hronisku brūču eksudātos tika novērota paaugstināta MMP-9 sekrēcija, savukārt MMP-7 šajos klīniskajos paraugos bija zemāka, salīdzinot ar normālos jeb veselos audos esošo sekrēciju. Iegūtajos paraugos MMP-9 līmenis ir augsts, savukārt TIMP koncentrācijas bija ļoti zemas, kas varētu liecināt par traucētu MMP regulāciju – to dabīgie inhibitori ir nepietiekamā daudzumā.. Ir veikti pētījumi, kas uzrāda, ka augsta MMP-9 sekrēcija korelē ar zemāku brūču dzīšanas ātrumu.

Paaugstināta MMP produkcija netieši var novest pie enzīmu elastāzes un plazmīna dadzuma palielināšanās, deaktivējot par tām atbildīgos inhibitorus. Abi enzīmu aktīvi noārda ādas struktūrproteīnus – elastīnu un fibrīnu (Gibson *et al.* 2009). Grūtāk spriest par MMP-1 un MMP-2 izmaiņām, bet, salīdzinot rezultātus starp dermālajiem paraugiem, šūnām monoslānī un eksudātos var secināt, ka abas metalloproteināzes ir sekretētas līdzīgā daudzumā. Kopumā šādi sekrēcijas līmeņi eksudātos norāda uz traucējumiem brūču dzīšanā. Piemēram, MMP-7 atbild par reepitelizācijas procesu brūču dzīšanā un tā neesamība brūcē liecina par procesa pilnīgu atcelšanu (Gill and Parks 2008). MMP ekspresiju un aktivitāti regulē augšanas faktori, kā arī specifiski citokīni. Vieni no biežāk minētajiem iekaisuma mediatoriem ir TNF- α , IL-1 β , IL-6 un IL-8 (McLennan *et al.* 2008). Pārbaudot eksudātos citokīnu un MMP sekrēciju (3.10. un 3.11. attēls) var patiešām novērot, ka atbildīgie citokīni ir krietni zemākā koncentrācijā nekā MMP, kas liecina par hronisku brūču apgrūtinātu spēju pienācīgi sadzīt.

4.3. Eksudātu ietekme uz biotehnoloģiski veidotu ādas audu dzīvotspēju

Kopumā pēc hronisku brūču iekaisuma modelēšanas testa var secināt, ka palielinoties kultivēšanas laikam, kurā esošie audi atrodas brūces vidē, ādas šūnu dzīvotspēja mazinās, kas nozīmē, ka eksudātos esošie iekaisuma faktori un proteīnāzes negatīvi ietekmē šūnu dzīvotspēju un proliferāciju. Protams, optimālāk tomēr būtu vērtēt vairāku eksudātu ietekmi uz biotehnoloģiski veidotiem ādas audiem. Interesanti, ka dermas paraugs ar Ex1 uzrādīja augstāku šūnu dzīvotspēju par kontroles paraugu, pēc tā var spriest, ka audu dzīvotspēja korelē ar to, cik augstas ir dažādu citokīnu vai MMP koncentrācijas eksudātos. Kopējā proteīnu koncentrācija arī Ex1 bija izteikti lielāka nekā Ex2, attiecīgi arī visas MMP ievērojami vairāk tika sekretētas tieši Ex1 paraugā (3.4.3.tabula). Darbā iegūtie rezultāti varētu norādīt uz to, ka nelielas iekaisuma citokīnu un proteīnāžu koncentrācijas spēj pat nelielā mērā stimulēt dermas šūnas, taču sasniedzot noteiktu līmeni eksudātiem raksturīgajiem citokīniem un proteīnāzēm ir izteikti negatīva ietekme uz audu dzīvotspēju. Var secināt, ka normālam brūces dzīšanas procesam ir nepieciešama sabalansēta MMP-TIMP, kā arī citokīnu mijiedarbība. Dažādu brūču vides paraugu novērtējums audu kultūrās palīdz arī potenciāli prognozēt konkrētās brūces dzīšanu.

Šādi *in vitro* testi palīdz spriest par brūču dzīšanas mehānismiem un tā raksturīgajiem iekaisuma marķieriem. Attīstoties ādas audu inženierijai, nepieciešams izstrādāt kompaktākus, pacientiem pieejamākus, kā arī brūču videi labvēlīgus transplantātus vai materiālus (modeļsistēmas), kas palīdzētu šādu nedziedējamu hronisku brūču ārstēšanā un/vai ārstēšanas

metožu izstrādē, testēšanā un dažādu brūču apstākļu modelēšanā, kas mūsdienās ir ļoti plaša parādība. Darbā iegūtie rezultāti ļauj uzskatīt, ka fibrīna matricā veidotie ādas audi sniedz labu pamatu gan testēšanai izmantojamu modeļsistēmu, gan šādu ārstniecisku ierīču izstrādē.

5. SECINĀJUMI

1. Ādas audu modeļsistēmas veidošanas metodika ietekmē audu funkcionalitāti – kultivēšanas veids ietekmē gan MMP, to audu inhibitoru sekrēciju, gan strukturālo proteīnu ekspresiju.
2. Izvēloties ādas audu modeļsistēmu, jāņem vērā būtiskas atšķirības dermas audu un dermas-keratinocītu kokultūru starpā, kā arī keratinocītu lomu *in vitro* veidotu audu funkcionalitātes nodrošināšanā.
3. MMP, to inhibitoru un strukturālo proteīnu produkcija *in vitro* kultivētos audos variē kultivēšanas laikā.
4. *In vitro* veidotie audi ir izmantojami kā testsistēma, tajā skaitā, arī lai novērtētu hronisko brūču eksudātu ietekmi.

6. PATEICĪBAS

Darba autore izsaka pateicību darba vadītājam dr. biol. Inesei Čakstiņai un konsultantei mag. biol. Annai Ramatai-Stundai, kā arī bak. biol. Ilzei Blāķei un mag. biol. Ulrikai Beitnerei.

Pateicība P. Stradiņa Klīniskās universitātes slimnīcas Šūnu transplantācijas centra (PSKUS ŠTC) vadītājam Ērikam Jakobsonam par iespēju izstrādāt maģistra darbu viņa vadītajā centrā, kā arī Latvijas Universitātes bioloģijas fakultātes Mikrobioloģijas un biotehnoloģijas katedras un Latvijas Universitātes Bioanalītisko un biodozimetrijas metožu laboratorijas kolektīvam.

7. LITERATŪRAS SARAKSTS

1. Agale SV (2013) Chronic Leg Ulcers: Epidemiology, Aetiopathogenesis and Management. *Hindawi Publishing Corporation*. doi.org/10.1155/2013/413604
2. Beck B, Blanpain C (2012) Mechanisms regulating epidermal stem cells. *The European Molecular Biology Organization Journal*, 31: 2067-2075.
3. Bert van Gent W, Wilschut ED, Wittens C (2010) Management of venous ulcer disease. *BMJ*, 341: 1092-1096.
4. Canton I, Cole DM, Kemp EH, Watson PF, Chunthapong J, Ryan AJ, MacNeil S, Haycock JW (2010) Development of a 3D Human In Vitro Skin Co-Culture Model for Detecting Irritants in Real-Time. *Biotechnology and Bioengineering*. doi:10.1002/bit.22742.
5. Chen W, Fu X, Ge S, Sun T, Sung Z (2007) Differential expression of matrix metalloproteinases and tissue-derived inhibitors of metalloproteinase in fetal and adult skin. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39: 997-1005.
6. Clark RAF, Ghosh K, Tonnesen G (2007) Tissue Engineering for Cutaneous Wounds. *Journal of Investigative Dermatology*, 127: 1018-1029.
7. Collins MN, Birkinshaw C (2013) Hyaluronic acid based scaffolds for tissue engineering—A review. *Carbohydrate Polymers*, 92: 1262-1279.
8. Coussens LM, Tinkle CL, Hanahan D, Werb Z (2000) MMP-9 Supplied by Bone Marrow-Derived Cells Contributes to Skin Carcinogenesis. *Cell*, 103(3): 481-490.
9. Dong JC, Dong H, Campana A, Bischof P (2002) Matrix metalloproteinases and their specific tissue inhibitors in menstruation. *Reproduction*, 123: 621-631.
10. Edman K, Furber M, Hemsley P, Johansson C, Pairaudeau G, Petersen J, Stocks M, Tervo A, Ward A, Wells E, Wissler L (2011) The Discovery of MMP-7 Inhibitors Exploiting a Novel Selectivity Trigger. *ChemMedChem*, 6(5): 769-733
11. Fauzi MFA, Khansa I, Catignani K, Gordillo G, Sen CK, Gurcan MN (2015) Computerizes segmentation and measurement of chronic wound images. *Computers in Biology and Medicine*, 60: 74-85.
12. Farage MA, Miller KW, Maibach HI (2010) Textbook of Aging skin. *Springer-Verlag Berlin Heidelberg*, 816lpp.
13. Fuchs E (2009) Finding One's Niche in the Skin. *Cell Stem Cell*. doi:10.1016/j.stem.2009.05.001.

14. Futrega K, King M, Lott WB, Doran MR (2014) Treating the whole not the hole: necessary coupling of technologies for diabetic foot ulcer treatment. *Cell Press, Trends in Molecular Medicine*. doi.org/10.1016/j.molmed.2013.12.004
15. Gantwerker EA, Hom DB (2012) Skin: Histology and Physiology of Wound Healing. *Clinics in Plastic Surgery*, 39: 85-97.
16. Gibson D, Cullen B, Legerstee R, Harding KG, Schultz G (2009) MMPs made easy. *Wound International*, 1(1): 1-6.
17. Gill SE and Parks WC (2008) Metalloproteinases and Their Inhibitors: Regulators of Wound Healing. The *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 40: 1334-1347.
18. Greaves NS, Ashcroft KJ, Baguneid M, Bayat A (2013) Current understanding and cellular mechanisms in fibroplasia and angiogenesis during acute wound healing. *Journal of Dermatological Science*, 72: 206-217.
19. Groeber F, Holeiter M, Hample M, Hinderer S, Schenke-Layland K (2011) Skin tissue engineering – *in vivo* and *in vitro* applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*. doi:10.1016/j.addr.2011.01.005.
20. Grone A (2002) Keratinocytes and cytokines. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 88: 1-12.
21. Han F, Dong Y, Su Z, Yin R, Song A, Li S (2014) Preparation, characteristics and assessment of a novel gelatin-chitosan sponge scaffold as skin tissue engineering material. *International Journal of Pharmaceutics*, 476: 124-133.
22. Hasegawa H, Naito I, Nakano K, Momota R, Nishida K, Taguchi T, Sado Y, Ninomija Y, Ohtsuka A (2007) The distributions of type IV collagen chains in basement membranes of human epidermis and skin appendages. *Archives of Histology and Cytology*, 70: 255-265.
23. Hattori N, Komine M, Yano S, Kaneko T, Hanakawa Y, Hashimoto K, Tamaki K (2002) Interferon-gamma, a strong suppressor of cell proliferation, induces upregulation of keratin K6, one of the inflammatory- and proliferation-associated keratins. *Journal of Investigative Dermatology*, 199(2): 403-410.
24. Hoffmann J, Heisler E, Karpinski S, Losse J, Thomas D, Siefken W, Ahr HJ, Vohr HW, Fuchs HW (2005) Epidermal-skin-test 1000 (EST-1000) – A new reconstructed epidermis for *in vitro* skin corrosivity testing. *Toxicology in Vitro*, 19(7): 925-926.

25. Huh D, Hamilton GA, Ingber DE (2011) From 3D cell culture to organs-on-chips. *Cell Press*. doi:10.1016/j.tcb.2011.09.005.
26. Husing B, Buhrlen B, Gaisser S (2003) Human Tissue Engineered Products – Today’s Markets and Future Prospects. Fraunhofer Institute for Systems and Innovation Research, p17.
27. Jarvis C (2007) Skin, hair and nails. In (Ed.), *Physical examination and health assessment*, 6th edition. Philadelphia, *W.B.Saunders*.
28. Jones I, Currie L, Martin R (2002) A guide to biological skin substitutes. *British Journal of Plastic Surgery*, 55: 185-193.
29. Kanitakis J (2002) Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. *European Journal of Dermatology*, 12(4): 390-401.
30. Kapickis M, Gaile A, Antoņēviča L, Jakovicka D (2010) Mācību materials. Mūsdienīgas brūču aprūpes nodrošināšana. *Izdevniecība Medicīnas Apgāds*, 5-33.
31. Kershaw EE, Flier JS (2004) Adipose Tissue as an Endocrine Organ. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 89(6): 2548-2556.
32. Kivisaari A (2011) Molecular markers for progression of squamous cell carcinoma of the skin. *Medica – Odontologica*, Finland, ISBN 978-951-29-4860-4.
33. Liu C (2015) Collagen-hydroxyapatite composite scaffolds for tissue engineering. *Hydroxyapatite (HAp) for Biomedical Applications*. doi.org/10.1016/B978-1-78242-033-0.00010-9.
34. Lorenz HP, Longaker Mt (2008) Wounds: Biology, pathology and management. *Surgery: Basic Science and Clinical Evidence*. USA, New York, *Springer New York*, pp 2419.
35. Macri L, Clark RAF (2009) Tissue Engineering for Cutaneous Wounds: Selecting the Proper Time and Space for Growth Factors, Cells and the Extracellular Matrix. *Skin Pharmacol Physiol*, 22: 83 – 93.
36. Marieb EN, Hoehn K (2009) *Human Anatomy and Physiology*, 8th edition. San Francisco, *Benjamin Cummings*, 649-450.
37. Markovs J (2005) Medicīniskā histoloģija 2. daļa. *Izdevniecība EVE* 7 – 17lpp.
38. Marston W (2011) Mixed Arterial and Venous Ulcers. *Wounds*, 23(12): 351-356.
39. Martin I, Baldomero H, Bocelli-Tyndall C, Emmert MY, Hoerstrup SP, Ireland H, Passweg J, Tyndall A (2014) The Survey on Cellular and Engineered Tissue Therapies in

- Europe in 2011. *Tissue Engineering: Part A, Volume 20. Mary Ann Liebert*. DOI: 10.1089/ten.tea.2013.0372.
40. Mathes SH, Ruffner H, Graf-Hausner U (2014) The use of skin models in drug development. *Advanced drug delivery*. doi.org/10.1016/j.addr.2013.12.006.
 41. McLennan SV, Min D, Yue DK (2008) Matrix metalloproteinases and their roles in wound healing in diabetes. *Wound Practice and Research*, 16(3): 116-121.
 42. Metcalfe AD, Ferguson MWJ (2007) Bioengineering skin using mechanisms of regeneration and repair. *Biomaterials*, 28: 5100-5113.
 43. Minematsu T, Nakagami G, Yamato Y, Kanazawa T, Huang L, Koyangi H, Sasaki S, Uchida G, Fujita H, Haga N, Yoshimura K, Nagase T, Sanada H (2013) Wound blotting: A convenient biochemical assessment tool for protein components in exudate of chronic wounds. *Wound Repair and Regeneration*, 21: 329-334.
 44. Mohamed A, Xing M (2012) Nanomaterials and nanotechnology for skin tissue engineering. *Int. J. Burn Trauma*, 2(1): 29-41.
 45. Moor AN, Vachon DJ, Gould LJ (2009) Proteolytic activity in wound fluids and tissues derived from chronic venous leg ulcers. *Wound Repair and Regeneration*, 17: 832-839.
 46. Moura LIF, Dias AMA, Leal EC, Carvalho L, Sousa HC, Carvalho E (2014) Chitosan-based dressings loaded with neurotensin – an efficient strategy to improve early diabetic wound healing. *Acta Biomaterialia*, 10: 843-857.
 47. Negri S, Federici G, Farinato S, Fila C (2009) Human plasma as dermal scaffold for the generation of a completely autologous bioengineered skin. *Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research*, 13(47): 11-19.
 48. Papini R (2004) Management of burn injuries of various depths. *British Medical Journal*, 329: 158 – 160.
 49. Partsch H (2010) Rationale for compression in leg ulcers with mixed, arterial and venous aetiology. *EWMA Journal*, 10(3): 5-8.
 50. Pastore S, Mascia F, Mariani V, Girolomoni G (2008) The Epidermal Growth Factor System in Skin Repair and Inflammation. *Journal of Investigative Dermatology*, 128: 1365-1374.
 51. Ponc M (2002) Skin constructs for replacement of skin tissues for *in vitro* testing. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54(1): 19-30.

52. Pukstad BS, Ryan L, Flo TH, Stenvik J, Moseley R, Harding K, Thomas DW, Espevik T (2010) Non-healing is associated with persistent stimulation of the innate immune response in chronic venous leg ulcers. *Journal of Dermatological Science*, 59: 115-122.
53. Ratmata-Stunda A, Boroduskis M, Vorobjeva V, Ancans J (2013) Cell and tissue-based *in vitro* test systems for evaluation of natural skin care product ingredients. *Environmental and Experimental Biology*, 11: 159-177.
54. Reichelt J, Breiden B, Sandhoff K, Magin TM (2004) Loss of keratin 10 is accompanied by increased sebocyte proliferation and differentiation. *European Journal of Cell Biology*, 83: 747-759.
55. Reichelt J, Magin TM (2002) Hyperproliferation, induction of c-Myc and 14-3-3 σ , but no cell fragility in keratin-10-null mice. *Journal of Cell Science*, 115: 2639-2650.
56. Rodero MP, Khosrotehrani K (2010) Skin wound healing modulation by macrophages. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 3(7): 643-653.
57. Romana-Souza B, Pires TC, Monte-Alto-Costa A (2015) Mate tea-mediates reduction in catecholamine synthesis improves cutaneous wound healing of chronically stressed mice. *Food Research International*, 71: 32-40.
58. Santamaria LM, Aspizua SG, Del Rio M (2012) Skin Bioengineering: Preclinical and Clinical Applications. *Actas Dermosifiliograficas*, 103(1): 5-11.
59. Sawicki G, Marcoux Y, Sarkhosh K, Tredget EE, Ghahary A (2005) Interaction of keratinocytes and fibroblasts modulates the expression of matrix metalloproteinases-2 and -9 and their inhibitors. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 269(1-2): 209-216.
60. Schultz GS, Ladwig G, Wysocki A (2005) Extracellular matrix: review of its roles in acute and chronic wounds. *World Wide Wounds*.
61. Seal BL, Otero TC, Panitch A (2001) Polymeric biomaterials for tissue and organ regeneration. *Materials Science and Engineering R*, 34: 147-230.
62. Shevchenko RV, James SL, James SE (2010) A review of tissue-engineered skin bioconstructs available for skin reconstruction. *Journal of The Royal Society Interface*, 7: 229-258.
63. Singer AJ, Clark RAF (1999) Cutaneous wound healing. *New England Journal of Medicine*, 314(10): 738-746.
64. Stephen T, Skillen DM, Day R, Bickley I (2010) Bates guide to health assessment for nurses. Philadelphia, *Wolters Kluwer*, 245-278.

65. Stephens P (2011) Dysfunctional wound healing in chronic wounds. *Woodhead Publishing Limited*, 3-38.
66. Stocum DL (2012) Regenerative Biology and Medicine. Second Edition. *Academic Press*, Chapter 2: 21-28 .
67. Tabandeh MR, Oryan A, Mohammadalipour A (2014) Polysaccharides of *Aloe vera* induce MMP-3 and TIMP-2 gene expression during the skin wound repair of rat. *International Journal of Biological Macromolecules*, 424-430
68. Thomas AC, Wysocki AB (1990) The healing wound: a comparison of three clinically useful methods of measurement. *Decubitus*, 3(1): 18-24.
69. Tu Y, Zhou M, Guo Z, Li Y, Hou Y, Wang D, Zhang L (2015) Preparation and characterization of thermosensitive artificial skin with a Sandwich structure. *Materials Letters*, 147: 4-7.
70. Tuan Tai-Lan, Keller C Lia, Sun David, Nimni E Marcel, Cheung David (1994) Dermal fibroblasts activate keratinocyte outgrowth on collagen gels. *Journal of Cell Science*, 107: 2285-2289.
71. Valluru M, Staton CA, Reed MWR, Brown NJ (2011) Transforming growth factor- β and endoglin signaling orchestrate wound healing. *Frontiers in Physiology*, 2(89): 1-12.
72. Venus M, Waterman J, McNab I (2011) Basic physiology of the skin. *Surgery (Oxford)* 29(10): 471-474.
73. Voinchet V, Vasseur P, Kern J (2006) Efficacy and Safety of Hyaluronic Acid in the Management of Acute Wounds. *American Journal of Clinical Dermatology*, 7(6): 353-357.
74. Walsh CP (2011) Skin Tissue Engineering. *Biomedical Engineering, University of Rhode Island BME 281 First Presentation*, October 1.
75. Weijers EM, De Maat MPM, Van Hinsbergh VWM, Koolwijk P (2010) Review: Fibrin matrices for tissue engineering. Chapter 2: 28-31.
76. Xie P, Shengxian J, Tye R, Chavez-Munoz C, Vracar-Grabar M, Hong SJ, Galiano R, Mustoe TA (2014) Systemic administration of hemoglobin improves ischemic wound healing. *Journal of Surgical Research*, 194: 696-705.
77. Yokose U, Hachiya A, Sriwiriyanont P, Fujimura T, Visscher MO, Kitzmiller WJ, Bello A, Tsuboi R, Kitahara T, Kobinger GP, Takema Y (2012) The endogenous protease

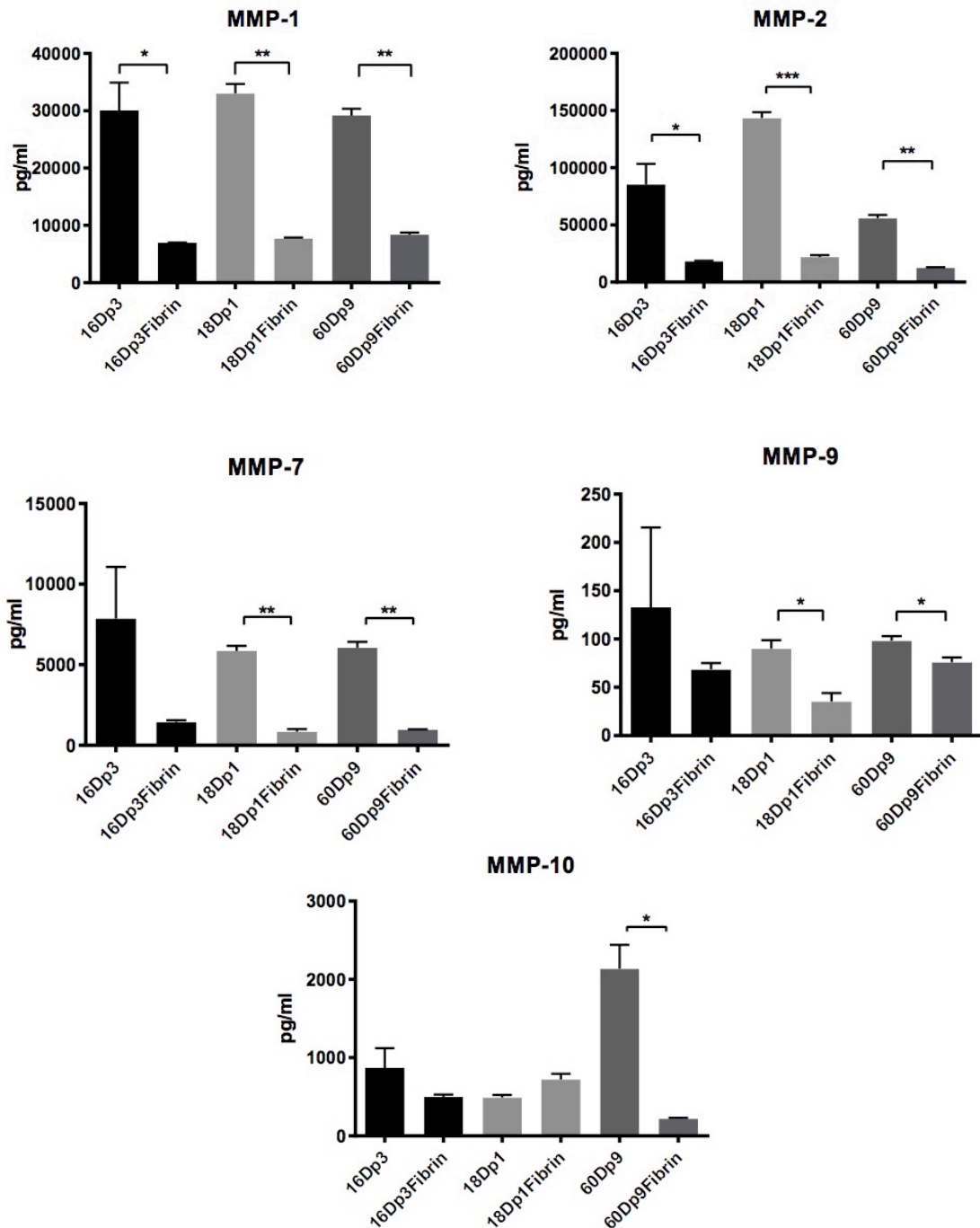
inhibitor TIMP-1 mediates protection and recovery from cutaneous photodamage. *Journal of Investigative Dermatology*, 132(12): 2800-2809.

78. Zavan B, Vindigni V, Cortivo R, Abatangelo G (2010) Skin Substitutes. *Tissue engineering*, Daniel Eberli (Ed.) 509-524.

79. Zhang Z, Michniak-Kohn BB (2012) Tissue Engineered Human Skin Equivalents. *Pharmaceutics*, 4: 26-41.

PIELIKUMI

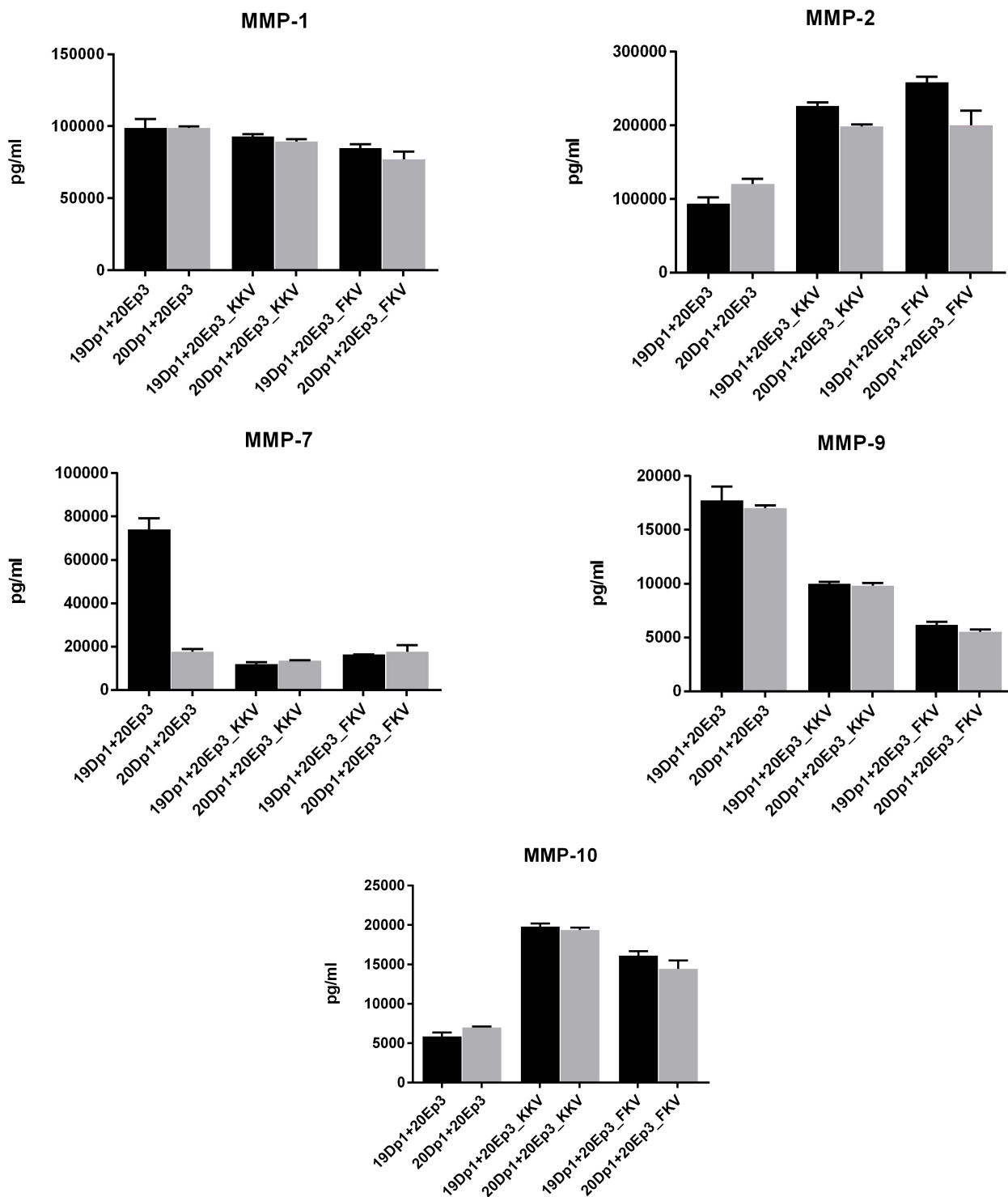
MMP sekrēciju salīdzinājums, kultivējot fibroblastus monoslānī un fibrīna matricās vienu nedēļu.



1. attēls. Matricsa metalloproteināžu sekrēcijas salīdzinājums trīs dažādas fibroblastu līnijas (16D, 18D un 60D) kultivējot monoslānī un fibrīna matricās vienu nedēļu. P vērtība: *p < 0,05, **p < 0,01 un ***p < 0,001

Figure 1. Comparison of the secretion of matrix metalloproteinases. Three different fibroblast cell lines (16D, 18D un 60D) were cultivated in a monolayer and in a fibrin scaffold for one week. P value: *p < 0,05, **p < 0,01 and ***p < 0,001.

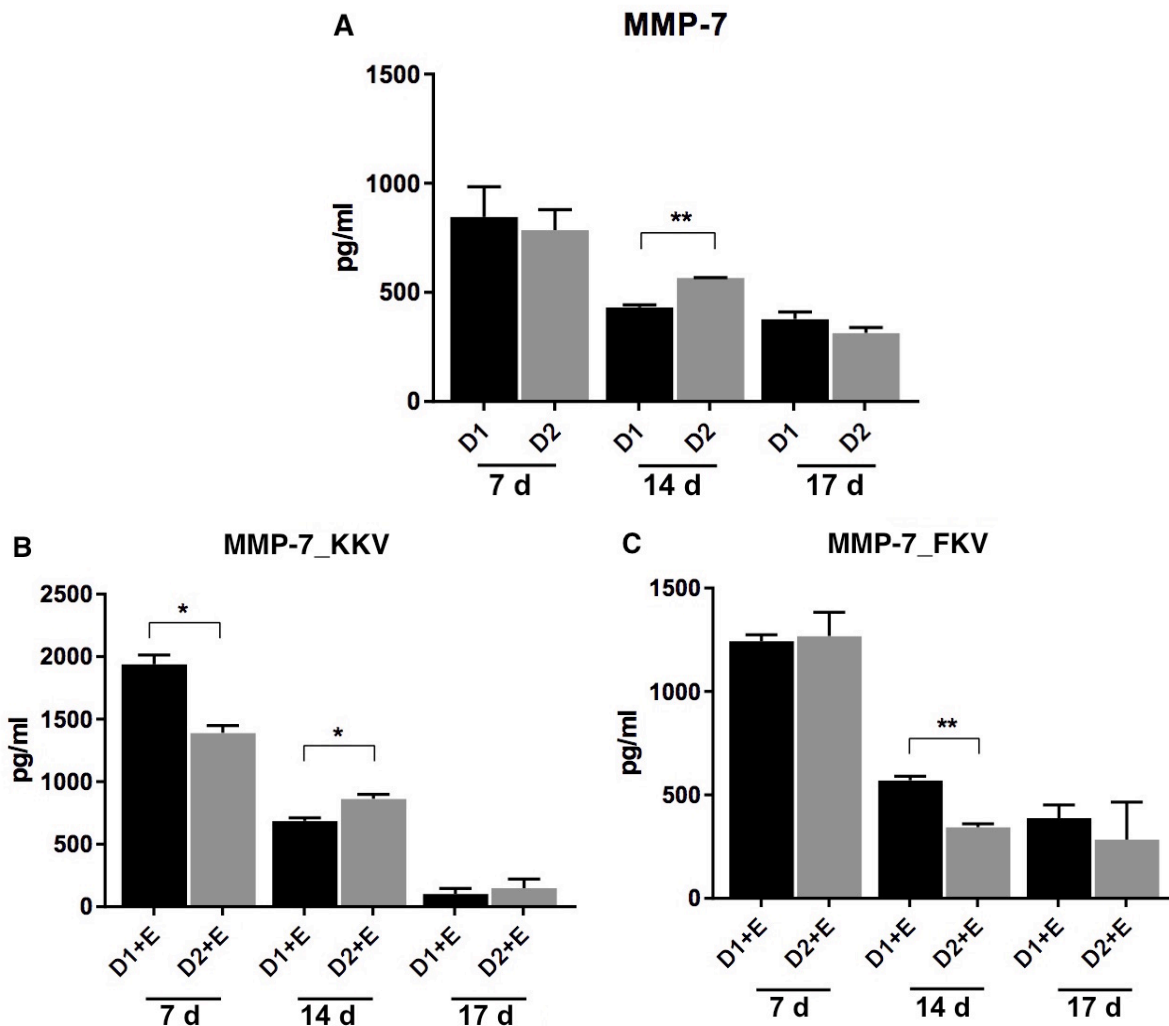
MMP sekrēciju salīdzinājums, kultivējot kokultūras uz virsmas un uz inserta.



2. attēls. Matriksa metalloproteināžu sekrēcijas salīdzinājums fibroblastus un keratinocītus kultivējot kokultūrā uz 6-laiņu plātes virsmas (19Dp₁ / 20Dp₁ + 20Ep₃) un kokultūrā uz inserta (KKV un FKV) divas nedēļas.

Figure 2. Comparison of the secretion of matrix metalloproteinases. Fibroblasts and keratinocytes were cultivated in a co-culture on a 6-well plate surface (19Dp₁ / 20Dp₁ + 20Ep₃) and on 6-well plate inserts (KKV and FKV) for two weeks.

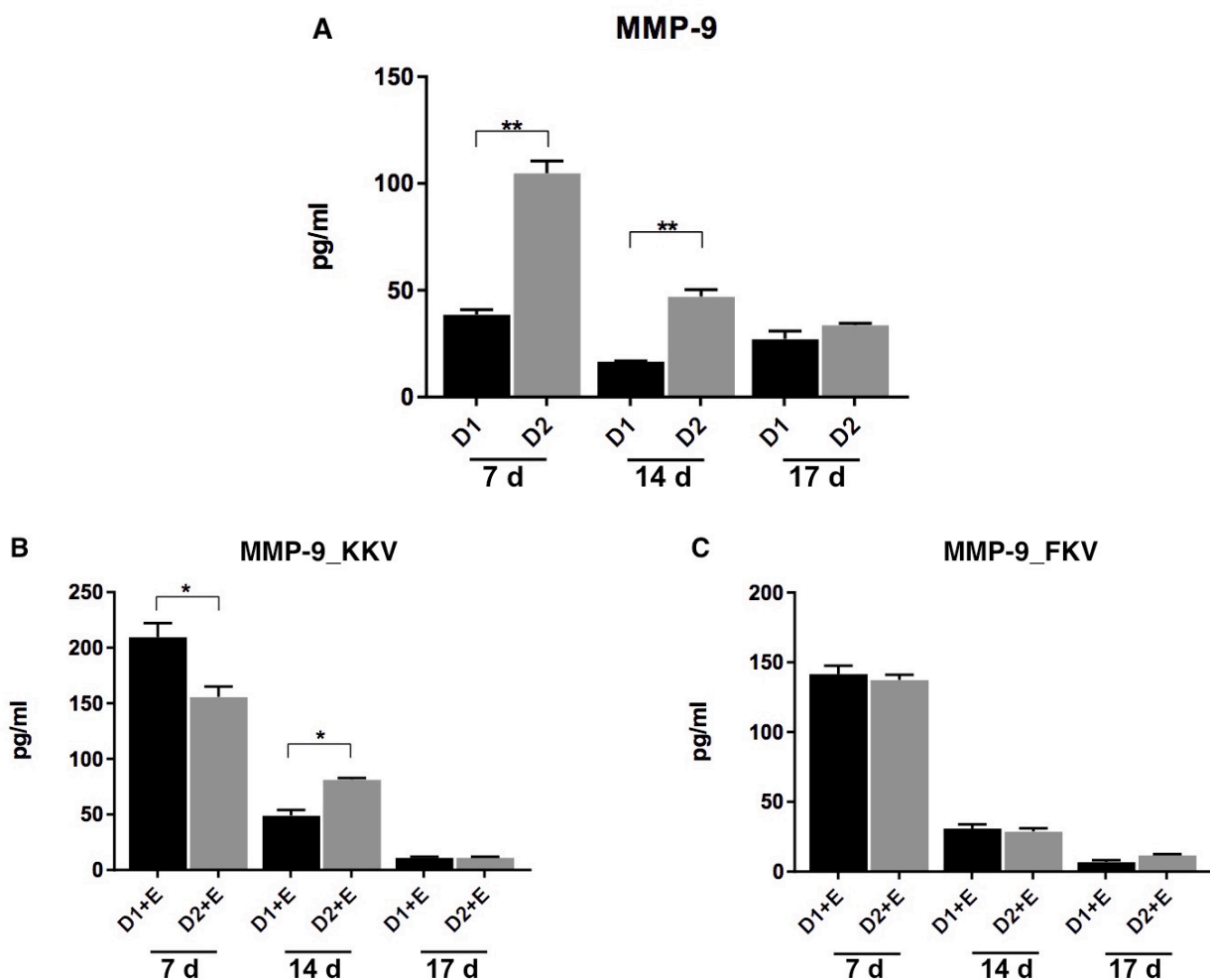
MMP-7 sekrēcija biotehnoloģiski veidotos ādas audos.



3. attēls. MMP-7 sekrēcija biotehnoloģiski veidotos ādas audos. **A** – divas fibroblastu līnijas (D1 un D2) kultivētas fibrīna matricā 7, 14 un 17 nedēļas. **B** – fibroblastu un keratinocītu kokultūra kultivēta fibrīna matricā uz inserta 7, 14 un 17 nedēļas (vide ņemta no inserta virspuses – KKV). **C** – fibroblastu un keratinocītu kokultūra kultivēta fibrīna matricā uz inserta vienu, divas un divarpus nedēļas (vide ņemta no inserta apakšpuses – FKV). P vērtība: * $p < 0,05$ un ** $p < 0,01$.

Figure 3. Secretion of MMP-7 in bioengineered skin tissue. **A** – two dermal cell lines (D1 un D2) cultivated in a fibrin scaffold for 7, 14 and 17 days. **B** – co-culture of fibroblasts and keratinocytes cultivated in a fibrin scaffold on an insert for 7, 14 and 17 days (cell medium – from the top of the insert (KKV)). **C** – co-culture of fibroblasts and keratinocytes cultivated in a fibrin scaffold on an insert for 7, 14 and a 17 days (cell medium – from the bottom of the insert (FKV)). P value: * $p < 0,05$ and ** $p < 0,01$.

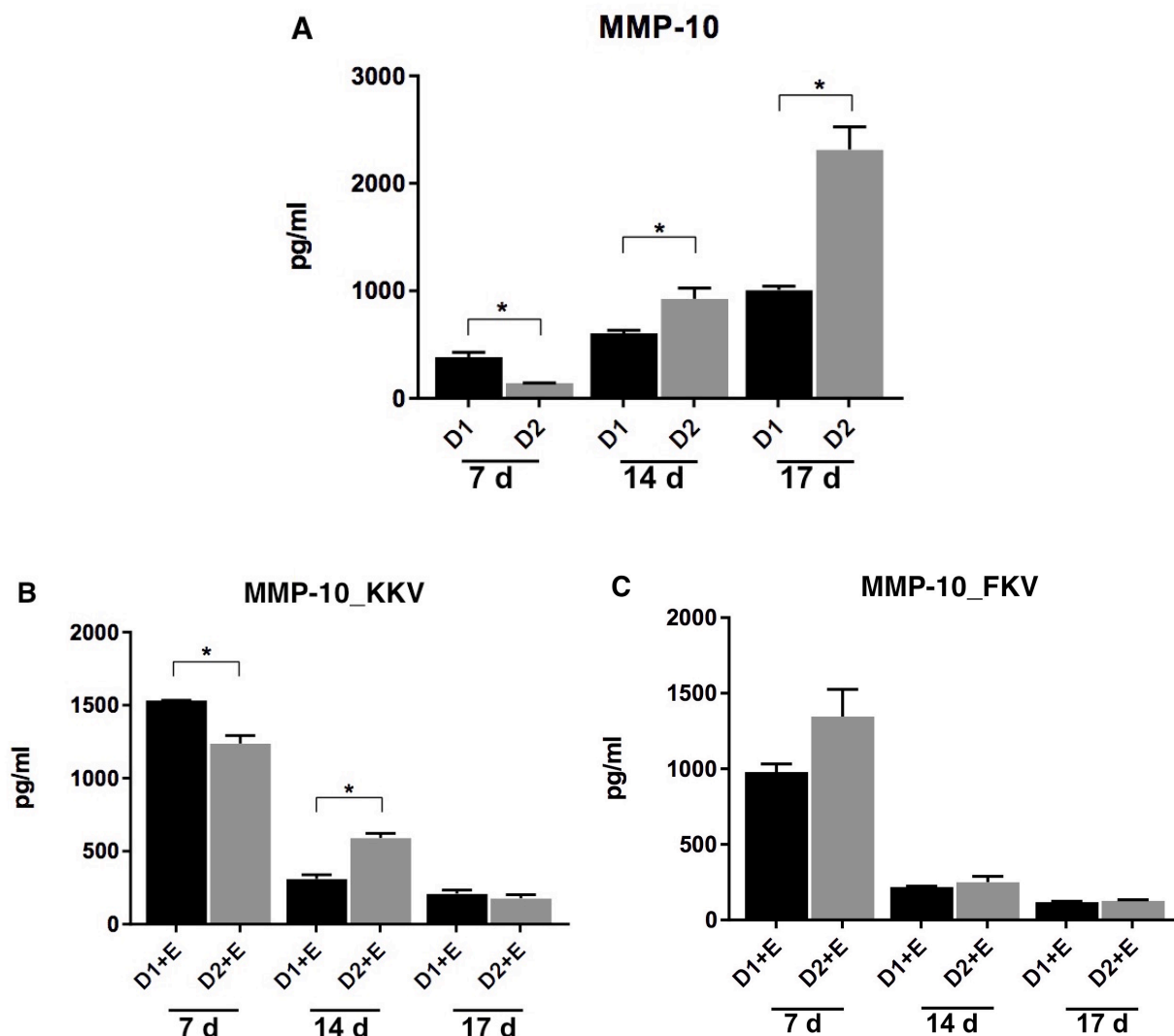
MMP-9 sekrēcija biotehnoloģiski veidotos ādas audos.



4. attēls. MMP-9 sekrēcija biotehnoloģiski veidotos ādas audos. **A** – divas fibroblastu līnijas (D1 un D2) kultivētas fibrīna matricā 7, 14 un 17 dienas. **B** – fibroblastu un keratinocītu kokultūra kultivēta fibrīna matricā uz inserta 7, 14 un 17 dienas (vide ņemta no inserta virspuses – KKV). **C** – fibroblastu un keratinocītu kokultūra kultivēta fibrīna matricā uz inserta 7, 14 un 17 dienas (vide ņemta no inserta apakšpuses – FKV). P vērtība: * $p < 0,05$ un ** $p < 0,01$.

Figure 4. Secretion of MMP-9 in bioengineered skin tissue. **A** – two dermal cell lines (D1 un D2) cultivated in a fibrin scaffold for 7, 14 and 17 days. **B** – co-culture of fibroblasts and keratinocytes cultivated in a fibrin scaffold on an insert for 7, 14 and a 17 days (cell medium – from the top of the insert (KKV)). **C** – co-culture of fibroblasts and keratinocytes cultivated in a fibrin scaffold on an insert for 7, 14 and a 17 days (cell medium – from the bottom of the insert (FKV)). P value: * $p < 0,05$ and ** $p < 0,01$.

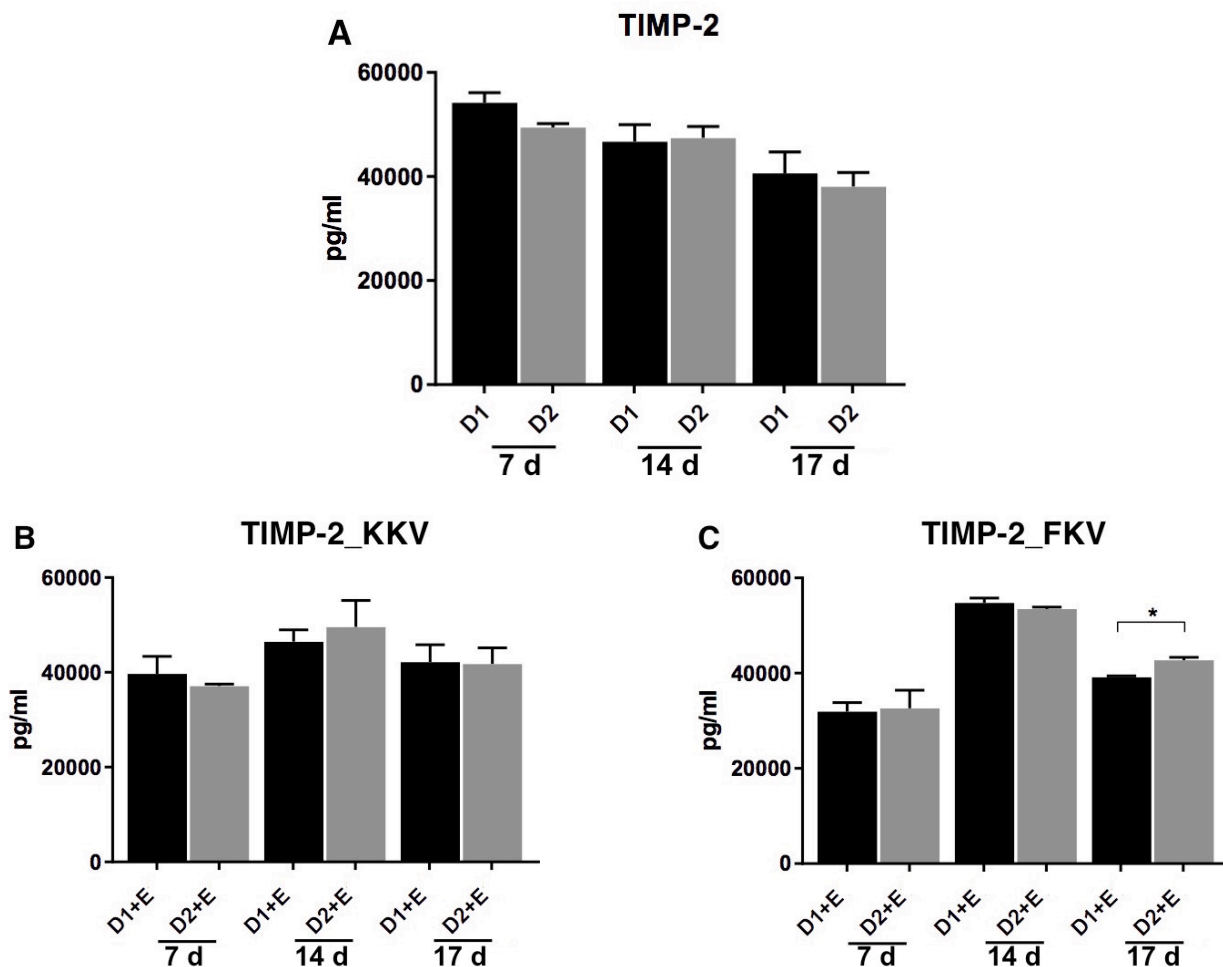
MMP-10 sekrēcija biotehnoloģiski veidotos ādas audos.



5. attēls. MMP-10 sekrēcija biotehnoloģiski veidotos ādas audos. **A** – divas fibroblastu līnijas (D1 un D2) kultivētas fibrīna matricā 7, 14 un 17 dienas. **B** – fibroblastu un keratinocītu kokultūra kultivēta fibrīna matricā uz inserta 7, 14 un 17 dienas (vide ņemta no inserta virspuses – KKV). **C** – fibroblastu un keratinocītu kokultūra kultivēta fibrīna matricā uz inserta 7, 14 un 17 dienas (vide ņemta no inserta apakšpuses – FKV). P vērtība: * $p < 0,05$.

Figure 5. Secretion of MMP-10 in bioengineered skin tissue. **A** – two dermal cell lines (D1 un D2) cultivated in a fibrin scaffold for 7, 14 and a 17 days. **B** – co-culture of fibroblasts and keratinocytes cultivated in a fibrin scaffold on an insert for 7, 14 and a 17 days (cell medium – from the top of the insert (KKV)). **C** – co-culture of fibroblasts and keratinocytes cultivated in a fibrin scaffold on an insert for 7, 14 and a 17 days (cell medium – from the bottom of the insert (FKV)). P value: * $p < 0,05$.

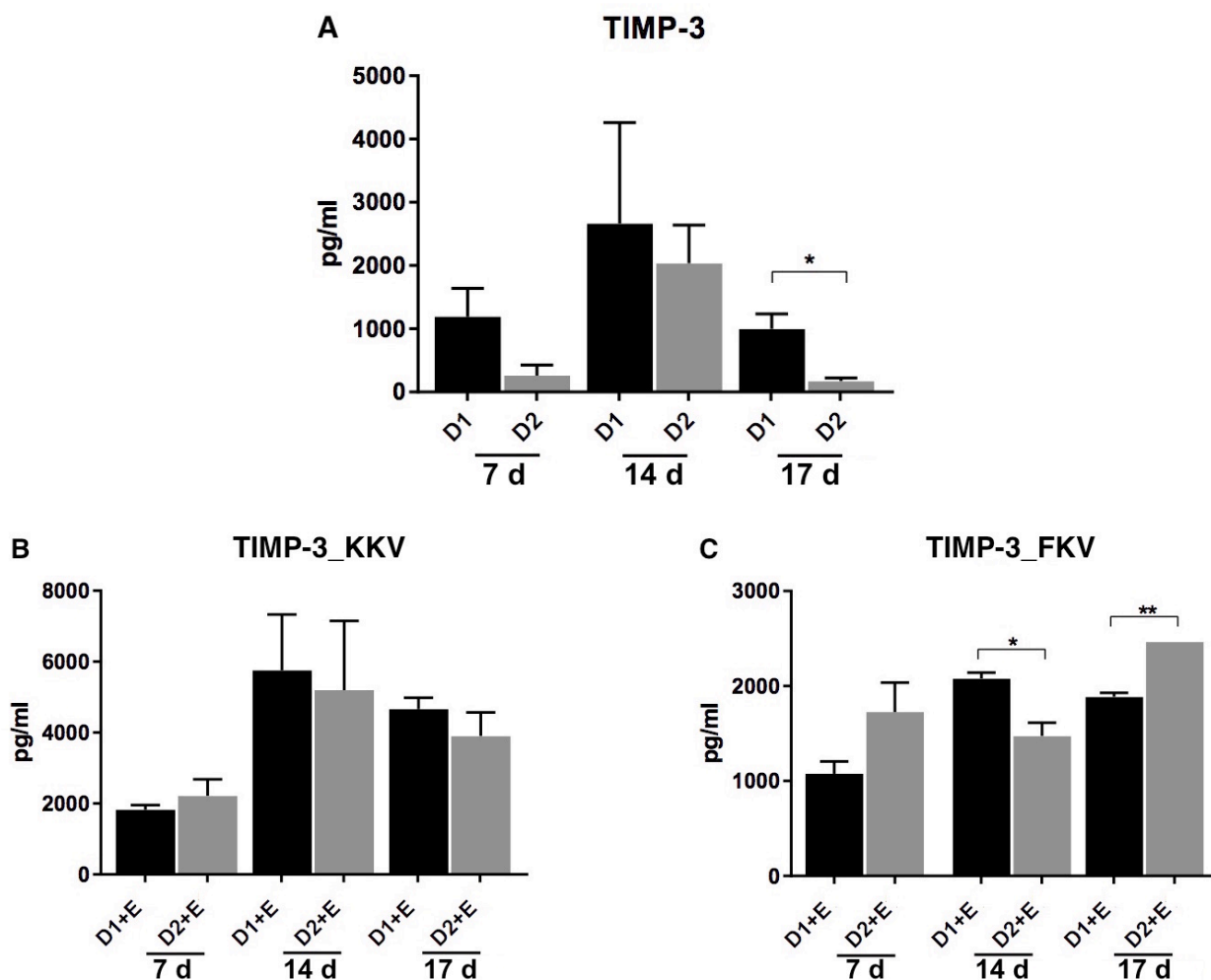
TIMP-2 sekrēcija biotehnoloģiski veidotos ādas audos.



6. attēls. TIMP-2 sekrēcija biotehnoloģiski veidotos ādas audos. **A** – divas fibroblastu līnijas (D1 un D2) kultivētas fibrīna matricā 7, 14 un 17 dienas. **B** – fibroblastu un keratinocītu kokultūra kultivēta fibrīna matricā uz inserta 7, 14 un 17 dienas (vide ņemta no inserta virspuses – KKV). **C** – fibroblastu un keratinocītu kokultūra kultivēta fibrīna matricā uz inserta 7, 14 un 17 dienas (vide ņemta no inserta apakšpuses – FKV). P vērtība: * $p < 0,05$.

Figure 6. Secretion of TIMP-2 in bioengineered skin tissue. **A** – two dermal cell lines (D1 un D2) cultivated in a fibrin scaffold for 7, 14 and a 17 days. **B** – co-culture of fibroblasts and keratinocytes cultivated in a fibrin scaffold on an insert for 7, 14 and a 17 days (cell medium – from the top of the insert (KKV)). **C** – co-culture of fibroblasts and keratinocytes cultivated in a fibrin scaffold on an insert for 7, 14 and a 17 days (cell medium – from the bottom of the insert (FKV)). P value: * $p < 0,05$.

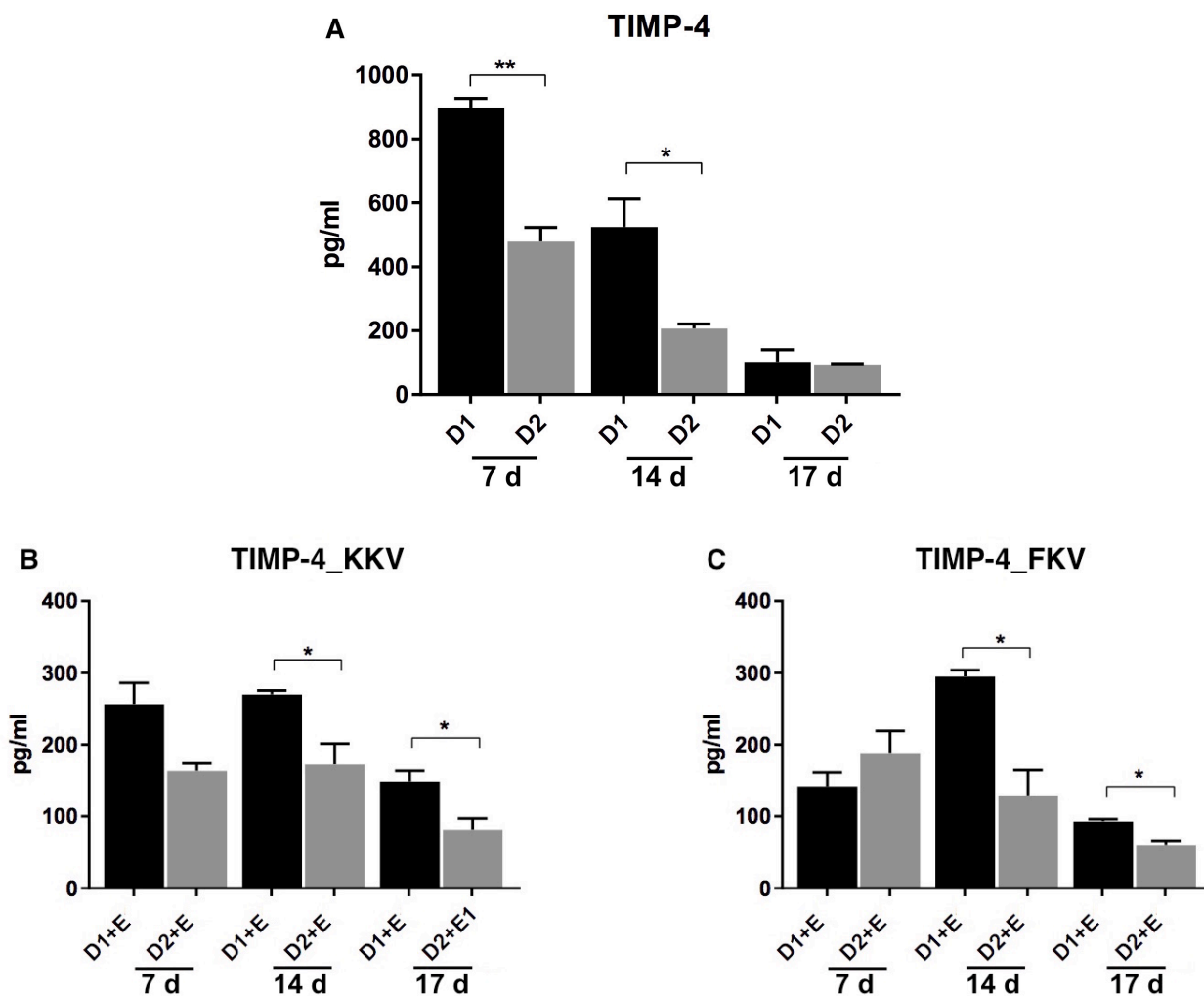
TIMP-3 sekrēcija biotehnoloģiski veidotos ādas audos.



7. attēls. TIMP-3 sekrēcija biotehnoloģiski veidotos ādas audos. **A** – divas fibroblastu līnijas (D1 un D2) kultivētas fibrīna matricā 7, 14 un 17 dienas. **B** – fibroblastu un keratinocītu kokultūra kultivēta fibrīna matricā uz inserta 7, 14 un 17 dienas (vide ņemta no inserta virspuses – KKV). **C** – fibroblastu un keratinocītu kokultūra kultivēta fibrīna matricā uz inserta 7, 14 un 17 dienas (vide ņemta no inserta apakšpuses – FKV). P vērtība: * $p < 0,05$ un ** $p < 0,01$.

Figure 7. Secretion of TIMP-3 in bioengineered skin tissue. **A** – two dermal cell lines (D1 un D2) cultivated in a fibrin scaffold for 7, 14 and a 17 days. **B** – co-culture of fibroblasts and keratinocytes cultivated in a fibrin scaffold on an insert for 7, 14 and a 17 days (cell medium – from the top of the insert (KKV)). **C** – co-culture of fibroblasts and keratinocytes cultivated in a fibrin scaffold on an insert for 7, 14 and a 17 days (cell medium – from the bottom of the insert (FKV)). P value: * $p < 0,05$ and ** $p < 0,01$.

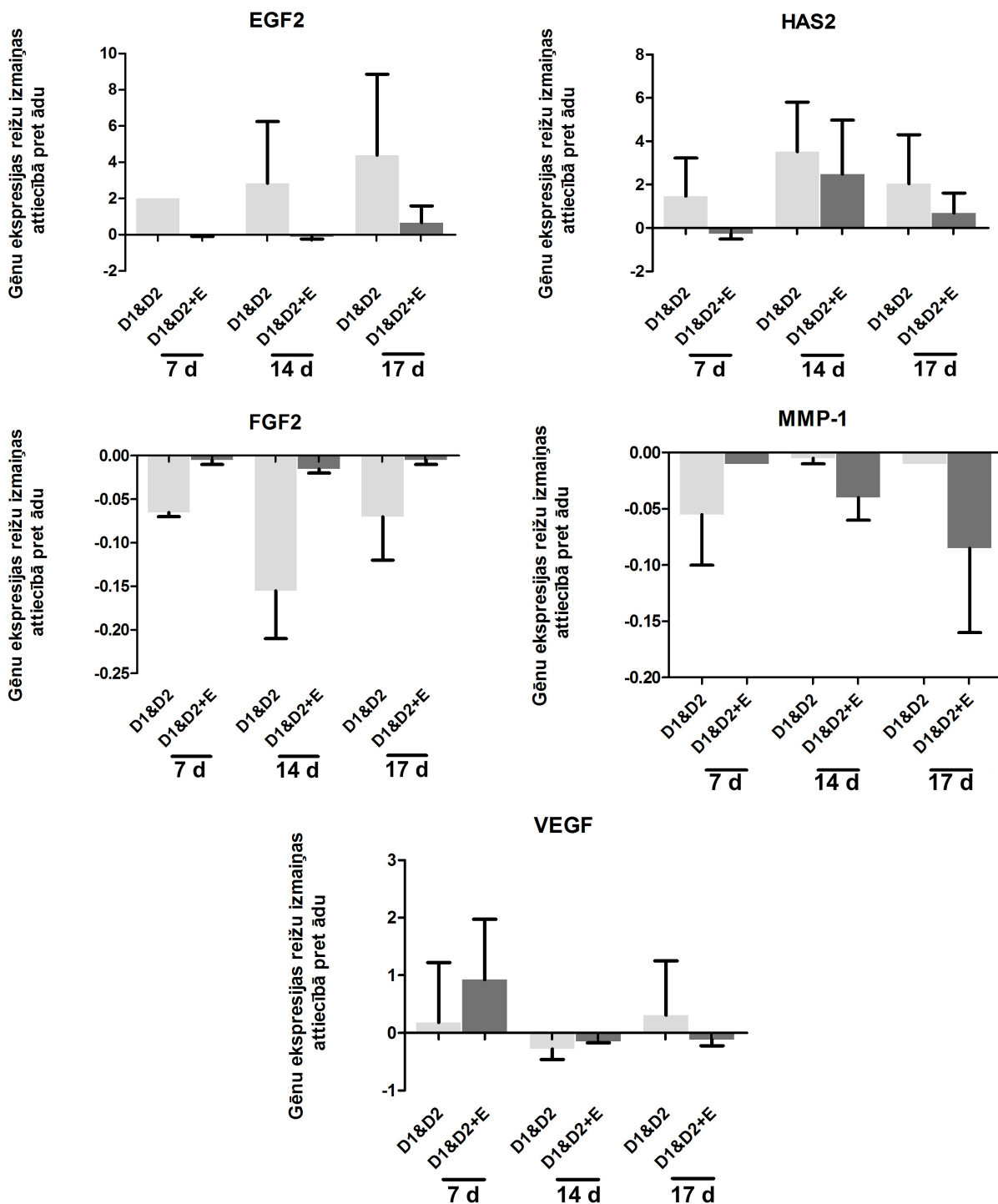
TIMP-4 sekrēcija biotehnoloģiski veidotos ādas audos.



8. attēls. TIMP-4 sekrēcija biotehnoloģiski veidotos ādas audos. **A** – divas fibroblastu līnijas (D1 un D2) kultivētas fibrīna matricā 7, 14 un 17 dienas. **B** – fibroblastu un keratinocītu kokultūra kultivēta fibrīna matricā uz inserta 7, 14 un 17 dienas (vide ņemta no inserta virspuses – KKV). **C** – fibroblastu un keratinocītu kokultūra kultivēta fibrīna matricā uz inserta 7, 14 un 17 dienas (vide ņemta no inserta apakšpuses – FKV). P vērtība: * $p < 0,05$.

Figure 8. Secretion of TIMP-4 in bioengineered skin tissue. **A** – two dermal cell lines (D1 un D2) cultivated in a fibrin scaffold for 7, 14 and a 17 days. **B** – co-culture of fibroblasts and keratinocytes cultivated in a fibrin scaffold on an insert for 7, 14 and a 17 days (cell medium – from the top of the insert (KKV)). **C** – co-culture of fibroblasts and keratinocytes cultivated in a fibrin scaffold on an insert for 7, 14 and a 17 days (cell medium – from the bottom of the insert (FKV)). P value: * $p < 0,05$.

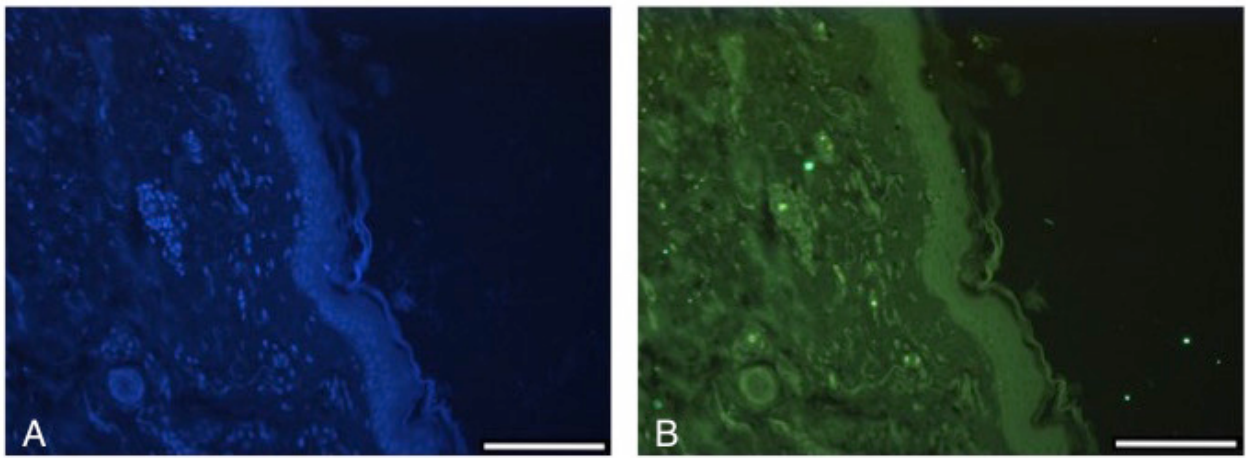
Gēnu ekspresijas reižu izmaiņas biotehnoloģiski veidotās ādas audos.



9. attēls. EGF-2, HAS2, FGF-2, MMP-1 un VEGF gēnu ekspresijas reižu izmaiņas biotehnoloģiski veidotās ādas audos (D1&D2 un D1&D2+E) attiecībā pret īstas ādas paraugu. Paraugi tika kultivēti 7, 14 un 17 dienas.

Figure 9. EGF-2, HAS2, FGF-2, MMP-1 and VEGF gene expression for bioengineered skin tissue samples (D1&D2 and D1&D2+E) in comparison with real skin. Samples were cultivated for 7, 14 and 17 days.

Ādas audu paraugs apstrādāts ar fluorescentās imunohistoķīmijas metodi.



10. attēls. Ādas audu paraugs – negatīvā kontrole. **A** – DAPI filtrs. **B** – FITC filtrs, izteikta autofluorescence. Mērogs atbilst 50 μm .

Figure 10. Skin tissue sample – negative control. **A** – DAPI filter. **B** – FITC filter, strong autofluorescence. Scale corresponds to 50 μm .

Maģistra darbs “*Ekstracelulārā matrkksa sintēzes un degradācijas loma ādas dzīšanā un tās analīze biotehnoloģiski veidotos ādas audos*” izstrādāts P. Stradiņa Klīniskās universitātes slimnīcas Šūnu transplantācijas centrā, LU Bioloģijas fakultātē, Mikrobioloģijas un biotehnoloģijas katedrā, Latvijas Universitātes Bioanalītisko un biodozimetrijas metožu laboratorijā.

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

Autors: Liene Pirtiece 29.05.2015.

Rekomendēju darbu aizstāvēšanai

Vadītājs: Dr. biol. Inese Čakstiņa 29.05.2015.

Recenzents: Dr. biol. Jānis Ancāns

Darbs iesniegts Bioloģijas fakultātē 29.05.2015.

Metodiķe: Dzintra Zaļā

Darbs aizstāvēts maģistru gala pārbaudījuma komisijas sēdē

05.06.2015. prot. Nr. _____ Vērtējums _____

Komisijas sekretāre: _____