

LATVIJAS UNIVERSITĀTE
MEDICĪNAS FAKULTĀTE
FARMĀCIJAS MAĢISTRA STUDIJU PROGRAMMA

**Uz hialuronskābes bāzes veidotu funkcionalizētu
biomateriālu efektivitātes un drošības izvērtējums *in vivo*
brūču modelī**

MAĢISTRA DARBS

Autors: **Katrīna Jukēvica**

Stud.apl.: kj1004

Darba vadītājs: Dr.med., asoc. profesore Baiba Jansone

RĪGA 2015

ANOTĀCIJA

Joprojām ir aktuāla dzīšanu stimulējošu, jaunu funkcionālu biomateriālu izveide, lai nodrošinātu ātrāku un efektīvāku brūču dzīšanas procesu klīnikā.

Maģistra darbā tika izvērtēti jaunizveidotie biomateriāli, kas ietver glikoproteīnu, efektivitāte brūču dzīšanas procesos *Wistar* žurku tēviņiem un veikti akūtas toksicitātes noteikšanas pētījumi *C57BL/6* līnijas peļu tēviņiem.

Iegūtie rezultāti uz brūču dzīšanas procesu apstiprina jaunizveidoto biomateriālu (1 un 2) efektivitāti un progresīvu dinamiku brūču dzīšanas procesos, jau sākot ar pētījuma ceturto dienu, salīdzinot ar kontroles grupas rezultātiem. Pēc lielu devu intraperitoneālas ievadīšanas dabīgais imunomodulators uzrāda drošību akūtas toksikoloģijas novērtējumā, jo neizraisa iekaisuma reakciju, nozīmīgas svara un temperatūras izmaiņas *C57BL/6* līnijpelēm.

Atslēgvārdi: brūču dzīšana; imunomodulatori; glikoproteīni; *in vivo* brūču modeļi

SUMMARY

Nowadays the creation of healing stimulating and new functional biomaterials is still important to provide faster and more effective wound healing process in the clinic.

In this research the effectiveness of the new biomaterials, which contain glycoproteins, was evaluated. Wound healing in Wistar male rats was analyzed in specific. Acute toxicity of the product was detected in C57BL/6 line male mice as well.

The results show that the new biomaterials are effective and have a positive effect on the dynamics of the healing processes. This effect was observed during the 4th day in comparison to the control group. The natural immunomodulators were proven to be safe after high dose administration in acute toxicology assessment, because does not cause an inflammatory response, significant weight and temperature changes in the C57BL / 6 line mice.

Keywords: wound healing; immunomodulators; glycoproteins; wound *in vivo* models

SATURS

ANOTĀCIJA.....	2
APZĪMĒJUMU SARAKSTS.....	7
IEVADS	9
1. LITERATŪRAS APSKATS	12
1.1. Dzīšanas process	12
1.1.1. Normāls dzīšanas process.....	12
1.1.2 Traucēts dzīšanas process un tā faktori	14
1.2. Hroniskas ādas čūlas un to veidi.....	15
1.2.1. Neirotrofiskās čūlas.....	17
1.2.2. Arteriālās čūlas.....	18
1.2.3. Venozās čūlas	18
1.2.4. Jaukta tipa un sistēmiskas čūlas	20
1.3. Mūsdienu terapeitiskās stratēģijas	21
1.3.1. Brūču pārsēji	22
1.3.2. Kompresijas terapija.....	24
1.3.3. Citi terapijas veidi	25
1.4. Jaunākās terapeitiskās stratēģijas.....	28
1.4.1. Imunomodulatoru izmantošana.....	28
1.4.2. Audu inženierija	30
1.4.3. Augšanas faktori.....	30
1.4.4. Gēnu terapija	31

1.4.5. Neuropeptīdi.....	31
1.4.6. Augu pielietojums	32
2. MATERIĀLI UN METODES.....	33
2.1. Dzīvnieki.....	33
2.2. Eksperimentā izmantotās vielas.....	33
2.3. Eksperimenta darba gaita ar žurkām.....	34
2.3.1. Operācija brūču izveidošanai un aktīvās vielas uzklāšana.....	34
2.3.2. Aktīvās vielas atkārtota uzklāšana	36
2.3.4. Brūču dzīšanas dinamikas izvērtējums ar <i>ImageJ</i> programmu	36
2.3.3. Eitanāzija un biopsijas paraugu paņemšana	37
2.3.5. ELISA metode.....	37
2.3.6. Multipleks metode.....	38
2.4. Eksperimenta darba gaita ar pelēm	39
2.4.1. Aktīvās vielas akūtas devas toksicitātes novērtējums	40
2.5. Statistika.....	41
3. REZULTĀTI UN DISKUSIJA	42
3.1. Metožu analīze Wistar līnijas žurkām	42
3.1.1. Attēlu analīze, lai noteiktu brūču dzīšanas dinamiku.....	42
3.1.2 Proteīnu sekrēcijas analīžu izvērtējums žurku plazmā.....	47
3.1.3. Žurku svara izmaiņas	51
3.2. Aktīvās vielas akūtas devas metožu analīze C57BL/6 līnijpelēm	52
3.2.1. Svara izmaiņas pēc intraperitoneālas aktīvās vielas akūtas devas ievadīšanas.....	52

3.2.2. Temperatūru izmaiņas pēc intraperitoneālas aktīvās vielas akūtas devas ievadīšanas	53
3.2.3. Proteīnu sekrēcijas analīžu izvērtējums peļu asins plazmā	54
SECINĀJUMI	55
LITERATŪRAS AVOTI	56
PATEICĪBAS	63
DOKUMENTĀRĀ LAPA	64

APZĪMĒJUMU SARAKSTS

AIDS – iegūts imūndeficīta sindroms

AMPD – adenilāta dezamināze

BMSCs – kaulu smadzeņu mezenhimālās cilmes šūnas

DNS – dezoksiribonukleīnskābe

ECM – ekstracelulārā matrica

EGF – epidermālais augšanas faktors

ERAF – Eiropas Reģionālās attīstības fonds

FGF – fibroblastu augšanas faktors

GRO/KC – augšanas regulēts onkogēns/keratinocītu hemoatraktants

HA – hialuronskābe

HBOT – hiperbāriskā skābekļa terapija

HIF – hipoksiju inducējošais faktors

IFN γ – interferons γ

IL-1 β – interleikīns 1 β

IL-6 – interleikīns 6

IL-10 – interleikīns 10

IL-18 – interleikīns 18

IP-10 – interferona γ inducētais proteīns 10

MAPK – mitogēnu aktivētā proteīnkināze

MIP-1 α – makrofāgu iekaisuma proteīns 1 α

MMP – matricas metaloproteināze

O₂ – skābeklis

PAS – perifēro artēriju slimības

PBS – fosfātu buferšķīdums

PDGF – trombocītu augšanas faktors

SEPS – subfasciālā endoskopiskā operācija

SIP – sēņu imūnmodulatorie proteīni

TGF- β – transformējošais augšanas faktors β

TNF- α – tumornekrozes faktors α

VEGF – vaskulārais endoteliālais augšanas faktors

IEVADS

Brūču dzīšanas process ietver precīzi koordinētu celulāru un imunoloģisku reakciju kaskādi (Masoko et al., 2010). Tas ir normāls bioloģisks process cilvēka organismā, kurš tiek panākts caur četriem precīziem un ieprogrammētiem posmiem: hemostāzi, iekaisumu, proliferāciju un remodelēšanu. Lai brūce veiksmīgi sadzītu, visiem posmiem jānotiek secīgi un konkrētā brīdī (Cheredy et al., 2012). Traucēta brūču dzīšana, tostarp akūtas un hroniskas brūces, parasti nenotiek caur šiem četriem dzīšanas procesiem (Guo et al., 2010). Hronisku brūču dzīšanas traucējumi tiek saistīti ar neefektīvu dzīšanas procesu akūtajā iekaisuma fāzē, samazinātu dzīšanai svarīgo augšanas faktoru sekrēciju, traucētu angiogēnēzi, pārmērīgu proteolītisko enzīmu sekrēciju un oksidatīvo stresu, kā arī hroniskas brūces tiek raksturotas ar paaugstinātu dažādu infekciju risku (Tellechea et al., 2010).

Lielākā daļa brūču sadzīst diezgan ātri, taču hroniskas brūces var dzīt vairākas nedēļas vai mēnešus (Costa et al., 2007). Mūsdienās ir pieejami dažādi brūču pārsienamie materiāli un terapeitiskas manipulācijas, proti, kompresijas terapija, ķirurģiska iejaukšanās, antibakteriālie līdzekļi, taču to izmantošana bieži vien nenoved pie vēlamā rezultāta. Materiālam, kas pārklātu hronisko brūci, jābūt ne tikai efektīvam, funkcionālam, brūci pārklājošam, bet jāspēj regulēt gan dzīšanu stimulējošo lokālo iekaisumu, gan veidot matricu šūnu migrācijai un proliferācijai, kas rosinātu ekstracelulārās matricas sintēzi, remodelēšanu, neovaskuloģenēzi, kā arī veicinātu reepitelizāciju. (Moura et al., 2014).

Hroniskas brūces ir bieži sastopama patoloģija, kas pārsvarā ir saistīta ar diabētu un venozo mazspēju. Joprojām venozo čūlu izplatība populācijā saglabājas gandrīz nemainīga, lai gan hroniskas venozas nepietiekamības diagnostika un ārstēšana turpina strauju attīstību. Pēdējo trīsdesmit gadu laikā, tā ir sastopama vienam līdz diviem procentiem no pieaugušajiem (Thora, 2007). Hroniskās brūces rada pacientam sāpes, diskomfortu, kā arī var samazināt darbaspējas, un bieži vien var novest pie locekļu amputācijas. Brūču ilglaicīgā medicīniskā aprūpe, kā arī ilgtermiņa darbaspēju zudums vai invaliditāte rada lielas tiešās un netiešās izmaksas (Mekkes et al., 2003).

Jauno biomateriālu efektivitātes izvērtēšanai tiek izmantoti gan akūtu, gan hronisku brūču modeļi *in vivo*. Pārsvarā hronisko brūču ārstēšanas pētījumos aprakstītas vienas substances iedarbība, taču arvien biežāk tiek pētīta vairāku vielu mijiedarbība uz dzīšanas procesu. Maģistra darba eksperimentālā daļa ir izstrādāta Eiropas Reģionālā attīstības fonda

ietvaros Nr 2014/0044/2DP/2.1.1.1.0/14/APIA/VIAA/046 un projekta nosaukums: „Hronisku brūču dzīšanu veicinošas medicīnas ierīces izstrāde”, kura galvenais mērķis ir izveidot jaunu medicīnas ierīci, kas satur biodegradējamu materiālu ar imunomodulatoru glikoproteīnu, lai risinātu aktuālo problēmu - dzīšanu stimulējošu funkcionālu, iekaisumu modulējošu biomateriālu trūkumu.

Darba mērķis

Maģistra darba mērķis ir izvērtēt jaunizveidotā biomateriāla, kas ietver glikoproteīnu, efektivitāti brūču dzīšanas procesos *Wistar* žurku tēviņiem, un veikt akūtas toksicitātes noteikšanas pētījumu *C57BL/6* līnijas peļu tēviņiem.

Darba uzdevumi

Jaunizveidotās medicīnas ierīces ietekmes novērtēšana uz dzīšanas procesu akūtu brūču modelī *in vivo* un drošības novērtējums *in vivo*:

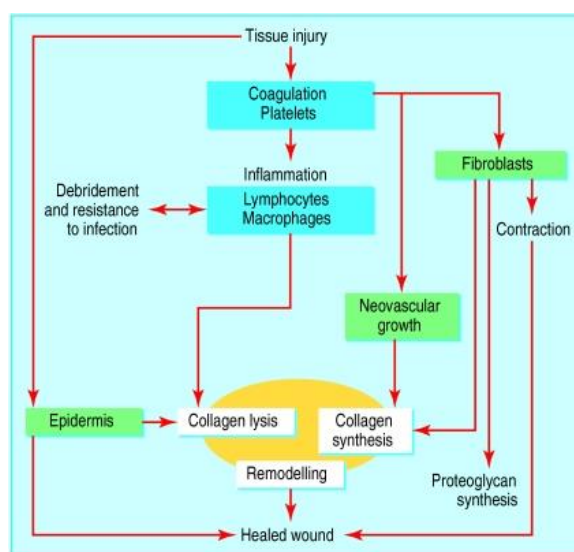
1. brūču izveidošanas operācijas, pētāmo (biomateriālu, kas satur AMPD ar nekroslinkotu hialuronskābi un AMPD ar nekroslinkotu hialuronskābes kombināciju ar kroslinkotu; kontroli, kas satur buferšķīdumu; biokontroli, kas satur nekroslinkotu hialuronskābi un nekroslinkotu hialuronskābes kombināciju ar kroslinkotu; AMPD grupu) vielu uzklāšana un brūču pārsēju maiņa pētījuma gaitā;
2. brūču dzīšanas procesa dokumentēšana un iegūto fotogrāfiju analīze, lai izvērtētu biomateriāla ietekmi uz brūču dzīšanas dinamiku;
3. proteīnu sekrēcijas analīze žurku asins plazmā brūču dzīšanas procesā 6. dienā un eksperimenta pēdējā 12. dienā;
4. biomateriāla funkcionalizēšanā izmantotā glikoproteīna (AMPD) akūtas devas toksicitātes noteikšana pelēm;
5. proteīnu sekrēcijas analīze pelēm pēc intraperitoneālas aktīvās vielas akūtas devas ievadīšanas.

1. LITERATŪRAS APSKATS

1.1. Dzīšanas process

1.1.1. Normāls dzīšanas process

Brūču dzīšanas process ietver precīzi koordinētu celulāru un imunoloģisku reakciju kaskādi (Masoko et al., 2010), iesaistot mediatorus, asins šūnas, ārpus šūnu matricu un parenhīmas šūnas (Nikolajeva et al., 2009). Tas ir normāls bioloģisks process cilvēka organismā, kurš tiek panākts caur četriem precīziem un ieprogrammētiem posmiem: hemostāzi, iekaisumu, proliferāciju un remodelēšanu (skat. *1.1.1.attēls*). Lai brūce veiksmīgi sadzītu, visiem posmiem jānotiek secīgi un konkrētā brīdī (Cheredy et al., 2012). Cilvēka ķermenis var saskarties ar dažādām traumām, tai skaitā penetrējošu traumu, apdeguma un trulām traumām. Visas šīs iejaukšanās izprovocē sakārtotu notikumu secību, kas ir saistīta ar dzīšanas atbildi, kurai raksturīga ir specializētu šūnu nonākšana čūlas rajonā.



1.1.1.1. attēls **Fundamentālā brūces dzīšanas fāžu mijiedarbība - iekaisums (zilā krāsā), proliferācija (zaļā krāsā), un audu remodelēšana (dzeltenā krāsā)** (Harding, 2002)

Pirmās brūces rajonā nonāk iekaisuma šūnas - trombocīti, un nodrošina galvenās funkcijas un signālus, kas ir nepieciešami saistaudu šūnu un jaunai asins piegādes sistēmas veidošanai. Šie ķīmiskie signāli ir zināmi kā citokīni vai augšanas faktori (Diegelmann et al.,

2004). Traucēta brūču dzīšana, tostarp akūtas un hroniskas brūces, parasti nenotiek caur šiem četriem dzīšanas procesiem. Šādas brūces bieži ietver pataloģisku dzīšanu, nepilnīgu vai nekoordinētu dzīšanas procesu. Lielākā daļa hronisku brūču ir čūlas, kas ir saistītas ar išēmiju, cukura diabētu, venozo stāzi vai spiedienu.

Pieaugušiem cilvēkiem optimāla brūču dzīšana ietver šādus procesus:

- 1) ātru hemostāzi;
- 2) atbilstošu iekaisuma procesu;
- 3) mezenhimālo šūnu diferenciāciju, proliferāciju un migrāciju uz brūces vietu;
- 4) atbilstošu angiogēnēzi;
- 5) tūlītēju reepitelizāciju (epitēlija audu augšanu uz brūces virsmas);
- 6) attiecīgu sintēzi, kolagēna krustenisku savienošanos un izkārtošanos, lai nodrošinātu izturību audiem.

Pirmais posms sākas tūlīt pēc ievainojuma ar asinsvadu sašaurināšanos un fibrīna recekļa veidošanos. Trombi un apkārtējo brūču audi izraisa citokīnu un augšanas faktoru izdalīšanos – trombocītu augšanas faktoru (PDGF), fibroblastu augšanas faktoru (FGF) un epidermālo augšanas faktoru (EGF). To sauc par hemostāzes procesu. Pēc tam, kad asiņošana tiek apturēta, iekaisuma šūnas migrē uz brūces vietu un ierosina iekaisuma procesu, ko raksturo ar secīgu neitrofilo leukocītu, makrofāgu un limfocītu infiltrāciju. Neitrofilo leukocītu funkcija ir degradēt mikrobus un atmirušās šūnas. Savukārt makrofāgiem ir vairākas lomas (Guo et al., 2010). Tie ir iesaistīti angiogēnēzes veicināšanā, matricas nogulsnešanās procesā un epitelizācijā (Thackham et al., 2007). Dzīšanas sākotnējā procesā makrofāgi atbrīvo citokīnus, kas veicina iekaisuma atbildi, aktivizējot papildus leukocītus. Makrofāgi arī inducē un savāc apoptiskās šūnas, to skaitā arī neitrofilos leukocītus. Tie arī stimulē keratinocītu, fibroblastu izdalīšanos, un veicina angiogēnēzi, lai veidotos audu reģenerācija. Tādā veidā makrofāgi izraisa pārēju uz nākamo posmu – proliferāciju.

Šo posmu raksturo epiteliālā proliferācija un migrācija caur pagaidu matricu brūcē. Dermā fibroblasti un endotēlija šūnas iesaistās kapilāru augšanā, kolagēna un granulācijas audu veidošanā skartajā brūces vietā. Fibroblasti ražo ne tikai kolagēnu, bet arī glikozaminoglikānus un proteoglikānus, kuri ir galvenās sastāvdaļas ekstracelulārā matricā

(Guo et al., 2010). Fibroblasti diferencējas par miofibroblastiem, un tie nostājas gar jaunizveidoto ECM un izveido stiepes izturību visā brūces garumā, kā rezultātā tā kontrahējas. Matrica darbojas kā " gultne", kurā endotēlija šūnas un šūnas, kas veido asinsvadus, var migrēt. Fibroblasti turpina izdalīt augšanas faktorus, piemēram, vaskulāro endoteliālo augšanas faktoru (VEGF), transformējošo augšanas faktoru β (TGF- β), un trombocītu augšanas faktoru (PDGF). Savukārt keratinocīti turpina migrēt un vairoties, radot epitēlija slāni, kas aptver brūces virsmu. Nākamais ir remodelēšanas posms.

Augšanas faktoru kokteilis, kas klāj brūci, stimulē asinsvadu endotēlija šūnas, kas atrodas blakus esošajos veselajos audos, un atbrīvo proteāzes, piemēram, matricas metaloproteināzes (MMP). Tās sagremo membrānas pamatus, ļaujot endotēlija šūnām izkļūt ārpus asinsvadu robežām. Augšanas faktori, kā VEGF, EGF, un TGF- β , stimulē sistemātisku endotēlija šūnu pārkārtošanu no blakus esošajiem asinsvadiem. Šūnas pagarinās un migrē, lai formētu jauna kapilāra izveidi. Tas signalizē angiogēnēzes iestāšanos.

Angiogēnēze ir skābekļa atkarīgs process. Skābeklis ir nepieciešams kolagēna nogulsnešanās procesā, kas, savukārt, nodrošina vidi, kurā var veidoties asinsvadi. Hipoksiju inducējošais faktors (HIF) stimulē VEGF produkciju, kas stimulē endotēlija šūnu proliferāciju un tādējādi stimulē angiogēnēzi proliferācijas fāzē (Thackham et al., 2007). Pēc ekstracelulārās matricas sintēzes, iekaisuma process pāriet noslēguma remodelēšanas posmā. Šajā posmā notiek daudzu, jaunizveidoto kapilāru regresijas, lai brūces asinsvadu blīvums normalizētos (Guo et al., 2010).

Izšķir lokālos un vispārīgos faktorus, kas ietekme brūču dzīšanu. Lokālie ietver: oksigēnāciju, infekciju, svešķermeņus, vēnu slimības. Vispārīgie faktori ietver: vecumu, dzimumu, dzimumhormonus, stresu, išēmiju, dažādas slimības: cukura diabētu, dzelti, iedzimtus dzīšanas traucējumus, aptaukošanos, medikamentu lietošanu (glikokortikoīdu steroīdu, nesteroido pretiekaisuma līdzekļu lietošana un ķīmijterapija), alkoholismu un smēķēšanu, imūnsistēmas traucējumus (vēzis, AIDS) (Guo et al., 2010).

1.1.2 Traucēts dzīšanas process un tā faktori

Sliktu čūlu dzīšanas procesu ietekmē četri saistīti faktori:

- 1) hipoksija;
- 2) infekcija;
- 3) tūska;
- 4) metabolisma traucējumi.

Čūlas sadzīšanai un normālam šūnu dalīšanas procesam nepieciešams 30mmHg skābekļa spiediena. Skābeklis palielina fibroblastu migrāciju un replikācijas, normālu kolagēna ražošanu, un leikocītu aktivāciju. Hroniskās čūlās samazināta asinsrite un līdz ar to izveidojusies hipoksija nespēj nodrošināt palielināto šūnu metabolismu un enerģijas prasības. Lai gan kolagēns tiek ražots, tā izturība ir vāja, ir ierobežota asinsvadu veidošanās, kas veicinātu kolagēna veidošanos. Baktēriju pārprodukcija noved pie infekcijas, jo ir samazināta leikocītu spēja tās neizneutralizēt, un ir palielināts nekrotisko audu skaits, kas ir saistīts ar hipoksiju, sliktu asinsvadu izveidošanos un samazinātu lokālo čūlu dzīšanas inhibitoru faktoru atbrīvošanu (Hess et al., 2007). Pavājināto dzīšanas procesu ietekme izveidojušies brīvie radikāļi, kas atrodas brūcē, izraisot lipīdu peroksidāciju, fermentatīvo noārdīšanos un DNS saplīšanu (Babu et al., 2013). Disbalanss starp proteīnāzēm un to inhibitoriem ir vēl viens iemesls sliktai brūču dzīšanai. Pārmērīga proteīnāžu darbība hroniskās brūcēs, iespējams, no pārmērīgas matricas metalloproteīnu ekspresijas, izraisa patoloģisku ekstracelulārās matricas degradāciju. Kā arī pazemināts skaits aktīvo augšanas faktoru brūcē, daļēji izskaidro, brūču vājo dzīšanu. Hroniskās brūcēs ir samazināts trombocītu augšanas faktoru, fibroblastu augšanas faktoru, epidermālā augšanas faktora un transformējošā augšanas faktora β līmenis, salīdzinot ar akūtām brūcēm (Harding, 2002).

1.2. Hroniskas ādas čūlas un to veidi

Vārds ‘‘trofisks’’ ir atvasināts no grieķu vārda *Trophe* = barība, uzturs. Amerikāņu Medicīniskā vārdnīca 2007 definē trofiskās čūlas kā izveidojušās čūlas daļu uzturvielu traucējumu dēļ. Savukārt Mosbija Medicīniskā vārdnīca 2009 trofiskās čūlas definē kā spiediena čūlas, ko izraisa ārējās traumas ķermeņa daļai, kas ir sliktā stāvoklī asinsvadu nepietiekamības, aferento nervu šķiedru zuduma gadījumā vai citu slimību dēļ (Puri et al., 2012). Čūlas ir definētas kā anatomiska un funkcionāla audu dzīvotspējas izjaukšana (Farzaei et al., 2014). Čūlas var būt dažādas formas un izmēra, un var klasificēt pēc etioloģijas, ilguma

un audu zudumu. Čūlas ar mazu audu zudumu ietver ķirurģiskus iegriezumus, nelielus nobrāzumus, applaucējumus un nelielus kodumus. Hroniskām čūlām ir ievērojams audu zudums, un tās ietver kāju čūlas, spiediena čūlas un fistulas, savukārt akūtas čūlas ir smagi plēstās čūlas, šāviena čūlas, apdegumi un durtas brūces (Bradley et al., 1999).



1.2.1.attēls Čūlu veidi: A arteriāla čūla, B venozā čūla, C diabētiskā čūla, D neurotrofiskā čūla (Fonder et al., 2008)

Lai gan pārsvarā hronisku čūlu aprūpe ir līdzīga, tomēr katru gadījumu vajadzētu izskatīt atsevišķi atkarībā no bojājumu etioloģijas un patofizioloģijas. Piemēram, cukura diabēta izraisītām čūlām piemīt multifaktoriāla patofizioloģija, kas ir saistīta ar neurotrofiskiem, išēmiskiem un uztruvieļu faktoriem, un tie visi veicina čūlu izveidošanos un to hroniskumu (Puri et al., 2012).

1.2.1. tabula

Hronisko ādas čūlu klasifikācija (Puri et al., 2012)

Hronisku ādas čūlu klasifikācija	Slimības, kas izraisa hronisku čūlu veidošanos
Neurotrofiskās čūlas	Hansena slimība, <i>syringomyelia</i> , <i>spina bifida</i> , diabētiskās neiropātijas, alkoholiķu neiropātijas
Arteriālās čūlas	perifērā arteriālā slimība, ateroskleroze, mikroangiopātijas diabēta gadījumā, slikta arteriālā plūsma
Venozās čūlas	venozās slimības (vēnu mazspēja)
Jaukta tipa, sistēmiskas čūlas	diabēts, vitamīna B12 deficīts, dažādas avitaminozes,

1.2.1. Neurotrofiskās čūlas

Neurotrofiskās čūlas ietver visas kāju un roku čūlas pacientiem ar neiropātijām, piemēram, Hansena slimība (lepra), siringomiēlija (patoģenēze nav zināma), *spina bifida* (var novērst 70% gadījumu) (Rayner et al., 2009), nervu traumas, cukura diabēta neiropātijas, dažādu iemeslu polineirīts.



1.2.1.1. attēls Pa kreisi attēlā apakšstilbu trofiska čūla (arterio-venozas gēnēzes) ar alerģisku dermatītu un pa labi - neurotrofiska čūla papēdī (Thora, 2007)

Neiropātiskās čūlas rodas kājas rajonos, kas pakļautas atkārtotam augstam spiedienam ikdienas aktivitātēs, piemēram, pastaigās vai strādājot. Cilvēkiem ar neizmainītu jušanu profilaktiski pasākumi, piemēram, gaitas maiņa vai aktivitāšu modificēšana, atbrīvo cilvēku no diskomforta sajūtas, ko izraisa atkārtots spiediens. Savukārt pacientiem ar perifēro maņu deficītu, šis protektīvās maņas nav, tādējādi netiek novērsta atkārtota spiediena iedarbība, kas rada ādas bojājumu, kā arī čūlu veidošanos. Papildus maņu deficītam, izmaiņas gaitā varbūt saistītas ar motoro vājumu un muskuļu masas samazināšanos, kas var strauji palielināt spiedienu zem pēdas plantārās virsmas ar pastiprināti lokalizētu spiedienu zem metatarsālo kaulu galviņām un zem papēža. Pārmērīgs spiediens izraisa reaktīvu hipertrofisku atbildi ar lokālu pastiprinātu keratinocītu veidošanos. Tādējādi vietās, kur patoloģiski iedarbojas berze un svara izraisītais spiediens, var notikt ādas sabiezējumu jeb hiperkeratozes veidošanās. Tā var saplīst un novest pie čūlas izveidošanās. Tādējādi pastāv augstāks čūlas izveidošanās risks vietās, kur jau ir izveidojusies hiperkeratoze (Puri et al., 2012).

1.2.2. Arteriālās čūlas

Šis čūlu veids attīstās sakarā ar artēriju oklūziju, kas ierobežo asins apgādi un izraisa išēmiju un nekrozes audu veidošanos attiecīgajā ķermeņa daļā (Greer et al., 2012). To varētu izskaidrot ar emboliju - bloķētas artērijas, vai ar artēriju sašaurināšanos (aterosklerozi) (Cullum et al., 2001). Visbiežāk oklūziju veicina ateroskleroze, tāpēc galvenie riska faktori išēmiskām čūlām, ir tādi paši kā tie, kas ir perifēro artēriju slimību gadījumā (PAS): cigarešu smēķēšana, cukura diabēts, hiperlipidēmija un hipertensija. Tāpat, pacienti ar išēmiskām čūlām sūdzas par PAS simptomiem, piemēram, mijklibošanu vai sāpēm, kas turpinās, neskatoties uz kāju pacēlumu. Citas pazīmes ekstremitāšu samazinātas perfūzijas gadījumā var būt arī, piemēram, spīdīga, atrofiska āda, samazināts kāju apmatojums, aukstas kājās, un distrofiski nagi. Tā kā išēmiskas čūlas ir saistītas ar sliktu perfūziju, visvairāk tās parasti rodas distālās vietās, piemēram, kāju pirkstgalos, vai vietās, kur ir palielināts spiediens, piemēram, uz izvirzītām kaulu virsmām (Greer et al., 2012). Daudzas slimības un veselības traucējumi var izraisīt perifēro arteriālo čūlu rašanos, ieskaitot Reino slimību, arteriālo emboliju vai trombu, obliterējošo vai ādas vaskulopātijas. Atšķirībā no pacientiem ar venozām čūlām, pacienti ar arteriālām čūlām sūdzas par sāpēm kājas slodzes laikā vai atrodoties guļus stāvoklī. (Aydin et al., 2009).

1.2.3. Venozās čūlas

Hroniskas kāju vēnu čūlas ir definētas kā atvērti bojājumi starp ceļa un potītes locītavu, kas paliek neizārstēti vismaz četras nedēļas, un paralēli noris vēnu slimības (Morley et al., 2010) (skat. 2.1.4.1. attēls). Vēnu čūlas ir izplatītas pieaugušo populācijā. Tās būtiski ietekmē pacientus gan sociāli, gan ekonomiski, jo to ārstēšana bieži ir ilglaicīga un novērojami recidīvi. Neskatoties uz to augsto izplatību un nozīmi, venozās čūlas bieži vien tiek atstātas novārtā un nepietiekami apkoptas, kas noved pie tā, ka 30% čūlas kļūst recidīvas un pēc 2 gadiem ir paredzami jau 78%, ka šī čūla atkal atkārtosies (Abbade et al., 2009). Riska faktori hroniskas vēnu slimības gadījumā ietver pamatā slimības, kur ir slikta venozā attece (piemēram, sirds mazspēja un aptaukošanās), primāra venozās sistēmas saslimšana (piemēram, anamnēzē dziļo vēnu tromboze), injicējamo medikamentu lietošanu (ādas nitroglicerīns), flebīts, un vēnu vārstuļu disfunkcija (Zenilman et al., 2013). Klīniskā diagnoze

ir balstīta uz pacienta slimības vēsturi un fizisko pārbaudi, liekot uzsvāru uz pazīmēm un simptomi, un apakšējo ekstremitāšu pulsa palpēšanu (Abbade et al., 2009). Apakšējo ekstremitāšu vēnas un to vārstuļi, kā arī apakšstilba muskuļu kontrakcijas ir organisma galvenais mehānisms, kas nodrošina asiņu atplūdi no kāju vēnām atpakaļ uz sirdi (Mekkes et al., 2003). Jebkuri šī mehānisma sastāvdaļu traucējumi var izraisīt paaugstinātu venozo spiedienu vai venozo hipertensiju. Tāpēc vēnu hipertensiju var izraisīt viens vai vairāki no patofizioloģiskiem mehānismiem: 1) dziļo vēnu obstrukcija (piemēram, tromboze), 2) dziļo, perforācijas vai virspusējo vēnu vārstuļu mazspēja (iegūtas vai iedzimtas) 3) neiromuskulārā disfunkcija. Veidojoties venozai hipertensijai, paaugstināts spiediens ir konstatēts zemādas audos, izraisot mikrovaskulāros bojājumus un turpmāku čūlas veidošanos (Gonsalves et al., 2003). Hronisko vēnu čūlu patoģenēze ir saistīta ar palielinātu venozo ambulatoro hipertensiju ar mikrocirkulācijas traucējumiem, notiek eritrocītu ekstravazācija uz interstīciju, kur tie sabrūk. Šie noārdīšanās produkti ir ķīmiski piesaistoši leikocītiem un to infiltrācijai kapilāros un postkapilāru venulās. Leikocītu aktivācija, citokīnu un matricas metallo-proteināzes uztur iekaisuma reakciju, kas stimulē fibroblastu nenormālu kolagēna ražošanu, proliferēšanu un patoloģisku fibrozi. Šī iekaisuma reakcija noved pie ādas izmaiņām ar lipodermatoskleroze un čūlu veidošanos. Turklāt hroniskas venozās čūlas eksudāts pastiprina šūnu nomākšanu un palielina matricas metallo-proteināzes citokīnus, kas bojā šūnas un brūču dzīšanu. Sistēmiskie faktori ir vecums un aptaukošanās (Puri et al., 2012).



1.2.3.1. attēls **Hroniska venozā čūla** (Indian, 2011)

1.2.4. Jaukta tipa un sistēmiskas čūlas

Diabēts ir nopietna hroniska slimība, kurai nepieciešama regulāra glikēmijas rādītāju kontrole. Aptuveni 15% no visiem cilvēkiem, kuri slimo ar cukura diabētu, saskaras ar diabētisko pēdas čūlu (Münter et al., 2012). Diabētiskās čūlas patoģenēze ir multifaktoriāla, un tā iederas visos trofisko čūlu klasifikācijas veidos (Puri et al., 2012). Slimības sarežģītību izsauc traucēta brūču dzīšanu diabēta pacientiem - šūnu un molekulāru signālu trūkums, kas nepieciešams normālai brūču dzīšanai, piemēram, angiogēnēzes procesā, granulēšanas audu veidošanā, epitelizācijā un remodelēšanā (Wang et al., 2008). Čūlas raksturīgas ar ekstracelulārās matricas (ECM) sintēzes un remodelēšanas traucējumiem, jo notiek ādas fibroblastu izmaiņas, metaloproteināžu matricas izmaiņas, atkārtoti epitelizācijas traucējumi un pastāvīgas iekaisuma reakcijas (Gainza et al., 2013). Sakarā ar motoro nervu iesaistīšanos, pacientam rodas patoloģiska gaita, kas rezultātā izraisa smagnēju, neierastu spiedienu kājām un veidojas trauma, kas tālāk izraisa čūlu veidošanos. Sensorā neiropātija izraisa kāju vai roku sāpju jušanas samazināšanos, temperatūras sajūtas traucējumi, un atkārtota trauma var izraisīt čūlu veidošanos. Simpātiskās veģetatīvās sistēmas neiropātijas izraisa vazodilatāciju, kā arī samazina svīšanu, kas noved pie siltām, sausām kājām vai rokām. Āda uz tām biežāk plīst un ar tendenci inficēties, kas noved pie čūlu rašanās.

Išēmija pasliktina brūču dzīšanu, novēršot vai samazinot O₂ skābekļa plūsmu un pārējo komponentu esamību dzīšanas procesā. Ir divu veidu išēmiskas problēmas cukura diabēta gadījumā:

- 1) samazināta angiogēnēze mazajos asinsvados;
- 2) mikroangiopātija, kur var būt gan strukturāla, gan funkcionāla asinsvadu novirze. Abnormālas strukturālās novirzes biežāk saistītas ar tīklenes un nieru asinsvadiem, kas noved pie akluma un nieru mazspējas.

Perifērā arteriālā slimība var norisināties vienlaikus ar cukura diabētu. Aterosklerotiskās plātnītes var parādīties iegurņa, paceles un apakšstilba artērijās, izraisot asinsvadu oklūziju vai plūsmas samazināšanos. Šie diabētiskie pacienti ir vairāk tendēti uz čūlu rašanos nekā tie, kam nav perifērā arteriālā slimība.

1.tipa un 2. tipa cukura diabēts var izraisīt neironu un asinsvadu sistēmas komplikācijas. Tas ietekmē gan mazos, gan lielos asinsvadus, tāpēc izraisa mikrovaskulāras

un makrovaskulāras komplikācijas (Tellechea et al., 2010). Išēmija, neiropātija un infekcija ir trīs patoloģiskās sastāvdaļas, kas noved pie diabētiskās pēdas komplikāciju rašanos (Lima et al., 2011; Singh et al., 2013). Atkarībā no cukura diabēta ilguma ir sastopamas tādas mikrovaskulāras komplikācijas kā nefropātijas, retinopātijas un perifērās neiropātijas. Savukārt makrovaskulāras komplikācijas ir koronārās sirds slimības, smadzeņu asinsvadu slimības un perifēro asinsvadu slimības, kas rezultējas aterosklerozē. Perifēro artēriju slimības un neiropātijas ir galvenie iemesli diabētiskās pēdas čūlas veidošanā. Perifēro artēriju slimības ir plašs jēdziens, kas ietver sevī jebkurus traucējumus perifērās asinsrites sistēmā. Perifērā neiropātijas raksturojas ar progresīvu nervu šķiedru zaudējumu, kas noved pie sāpju sajūtu zuduma. Perifērā neiropātija ir galvenais faktors diabētiskās pēdas čūlas attīstībā. Diabētiskās neiropātijas riska faktori ir hiperglikēmija, hiperlipidēmija, augsts asinsspiediens, aptaukošanās, vecums virs 40 gadiem un ilgtermiņa diabēts. Perifērā neiropātija ietekmē arī motoro sistēmu, izraisot muskuļu vājumu. Turklāt neiropātija izraisa anhidrozi, kuras rezultātā veidojas sausa āda ar samazinātu barjeras funkciju, un pavairojas arteriovenoza šuntu daudzums un izmainās ādas un kaulu perfūzijas.

Pacientiem ar diabētu ir patoloģiska angiogēnēze dažādos orgānos. Vaskulopātijas, kas ir saistītas ar diabētu, ietver pastiprinātu asinsvadu veidošanos (piemēram, retinopātijas, nefropātijas) un paātrinātu aterosklerozes veidošanos, kas noved pie koronāro artēriju slimības, perifēro asinsvadu slimības un smadzeņu asinsvadu slimības. Tomēr diabēta gadījumā angiogēnēzes process ir samazināts, tāpēc ir ierobežota jaunu asinsvadu veidošanās un iekaisuma šūnu iekļūšana. Daudzu nozīmīgu faktoru samazinājums ir atrasts diabētiskās brūcēs, tostarp fibroblastu augšanas faktors un trombocītu augšanas faktors. Vaskulārā endotēlija augšanas faktoram ir nozīmīga loma asinsvadu veidošanā (Tellechea et al., 2010).

1.3. Mūsdienu terapeitiskās stratēģijas

Lielākā daļa brūču sadzīst diezgan ātri, taču hroniskas brūces var dzīt vairākas nedēļas vai mēnešus. To var ietekmēt citi procesi, kā, piemēram, infekcija, asinsvadu mazspēja, ilgstošs spiediens vai citi iemesli. Ir pieejami vairāki ārstēšanas veidi, piemēram, pārsienamie materiāli, kompresijas pārsēji, ķirurģiska iejaukšanās, antibakteriālie līdzekļi (Costa et al., 2007). Ir būtiski izprast patoloģiskos mehānismus, kas izraisa čūlu, jo kāju čūlas var izraisīt vēnu slimības, artēriju slimības, diabēts, neiropātijas, vaskulīts, infekcijas, un audzējs. Rodas

bieži arī dažādu veidu kombinācijas, tādējādi sarežģījot ārstam diagnostiku (Coleridge-Smith et al., 2009). Par hronisku venozo čūlu ārstēšanas mērķiem, tiek definēti šādi pasākumi:

- saīsināt čūlu epitelizācijas laiku;
- samazināt recidīvu biežumu;
- uzlabot pacienta dzīves kvalitāti;
- minimizēt ārstēšanas blakusefektus (Thora, 2007).

1.3.1. Brūču pārsēji

Brūču pārsiešana ir paredzēta, lai saglabātu brūci tīru un brīvu no piesārņojuma un arī, lai veicinātu brūču dzīšanu, jo īpaši hroniskas brūces, kur var būt ievērojams audu zudums. Lielākā daļa no modernajiem pārsienamajiem materiāliem tiek uzskatīti kā okluzīvi vai daļēji okluzīvi. Tie novērš vai samazina mitruma daudzumu, iztvaikošanas caurlaidību no brūces virsmas. Pilnīgi okluzīvie pārsienamie materiāli (piemēram, polietilēna maisi) izveido ļoti mitru brūces vidi un var novest pie apkārtējās ādās mitrināšanas. Daļēji okluzīvie pārsienamie materiāli ir mitruma tvaiku caurlaidīgi (Hongbo et al., 2007, Xie et al., 2013). Rezultātā ūdens tvaiki uzkrājas uz virsmas, kas palīdz uzturēt mitru brūces vidi. Interaktīvie pārsienamie materiāli var arī siltināt brūces virsmu.

Pārsienamos materiālus klasificē pēc to īpašībām un darbības:

1. Pārsēju spilventiņi - ietilpst trikotāžas viskozes un marles materiāli. Tie parasti izskatās kā kokvilnas spilventiņi, kas ir piemēroti tieši čūlas virsmām. Dažām ir perforēts plēves slānis, lai samazinātu brūces virsmas pielipšanu (Tricotex®, Smith & Nephew Healthcare Ltd).
2. *Tulle gras* pārsēji - izgatavoti no kokvilnas vai kokvilnas un viskozes auduma, kas ir piesūcināti ar baltu mīkstu parafīnu. Tos izmanto, kā primāro čūlu kontakta slāni un parafīns ir klāt, lai samazinātu produkta pielipšanu pie granulēšanas čūlas virsmas. Pretmikrobu vielas var arī tikt iekļautas, piemēram, povidona jods vai hlorheksidīns (Paratulle®, Seton Scholl Healthcare Ltd) (Nelson et al., 2009, Xie et al., 2013).

3. Daļēji caurlaidīgi pārsēji - smalks, lipīgs akrila slānis nodrošina tā pielipšanu pie ādas, bet ne brūces virsmas. Šis materiāls ir puscaurlaidīgs un ļauj notikt gāzu apmaiņai, bet ir necaurlaidīgs pret baktērijām (Tegaderm®, 3M Ltd).
4. Hidrokoloīdie pārsēji - okluzīvi materiāli, kas satur hidrokoloīdu matricu (piemēram, želatīns, pektīns un karboksimetilceluloze) ar elastomēru un līmvielām, kas pievienotas polimēra bāzei. Saskaroties ar brūces eksudātu, hidrokoloīda matrica absorbē ūdeni, uzbriest un pārveidojas mitrā gēlā (Granuflex).
5. Hidrogēli - sastāv no cietes polimēra, piemēram, polietilēna oksīda vai karboksilmetilcelulozes polimēra un līdz pat 80% ūdens. Tiem ir spēja absorbēt čūlas eksudātu vai rehidratēt čūlu, atkarībā no tā, vai brūce ir sausa un nekrotiska (Intrasite®, Smith & Nephew Healthcare Ltd) (Bradley et al., 1999), taču tiem nepieciešams sekundārs pārsējs (White et al., 2008). Brūču dzīšanas procesa laikā, epitēlija šūnām ir vieglāk migrēt mitrā vidē, nekā sausā vidē. Hidrogēla kapacitāte saglabāt mitru vidi ir svarīga, lai atvieglotu brūču dzīšanas procesu, novēršot audu dehidratāciju un apoptozi, paātrinot angiogēnēzi, uzlabojot mijiedarbību starp augšanas faktoriem un mērķa šūnām. Turklāt biomimētiskā hidrogēla mikrostruktūra var nodrošināt šūnu adhēziju, izplatīšana, citokīnu, barības vielu un gala produktu transportēšanu (Suvarna et al., 2013, Xie et al., 2013).
6. Algināta pārsēji - izgatavoti no jūras aļģēm, kas izgatavotas kā sāls algīnskābes. Nonākot saskarē ar seruma, čūlas eksudāts vai šķīdumi, kas satur nātrija jonus (nešķīstošais kalcija algināts daļēji pārveidojas šķīstošā nātrija sāļi) veido hidrofilu gēlu (Kaltostat®, ConvaTec Ltd).
7. Lodītes pārsēji - sastāv no sterila, hidrofilā, dekstrāna polimēra lodītēm, 0,1-0,3 mm diametrā. Kad tās nonāk eksudējošā brūcē, lodītes uzsūc eksudātu līdz pat četrām reizēm, pārsniedzot to svaru. Baktērijas un šūnu atliekas uz čūlas tiek savāktas ar kapilāro darbību un tiek ieslēgtas starp lodītēm. Kad materiāls tiek mainīts, šīs atliekas tiek nomazgātas. Tas tiek lietots kā sekundārais materiāls (Debrisan®, Pharmacia & Upjohn).

8. Putu pārsēji - sastāv no hidrofobiskām, poliuretānām putuplasta loksnēm vai šķidrumu, kas izplešas, lai aizpildītu čūlas dobumu. Tas absorbē šķidrumus ar kapilāro darbību (piemēram Lyofoam®, Seton Scholl Healthcare Ltd) (Bradley et al., 1999). To bieži izmanto pacientiem ar venozām čūlām, kuri lieto kompresijas zeķes (Snyder et al., 2012).

1.3.2. Kompresijas terapija

Kompresijas terapija tiek lietota ārēji uz apakšējās kājas daļas, palielinot spiedienu uz ādas un esošajām struktūrām, lai neitralizētu gravitācijas spēka iedarbību. Tas var palīdzēt atvieglot veidojušos simptomus apakšējās ekstremitātēs, iedarbojoties uz venozo un limfātisko sistēmu, lai uzlabotu šķidruma (asins un limfas) plūsmu ekstremitātēs.

Kompresijas terapijas sistēmas iedalās divos veidos:

- 1) ap kāju pilnīgi vai tikai līdz ceļim aptītu pārsēju;
- 2) kompresijas zeķes.

Kopumā pārsēji visbiežāk tiek izmantoti, lai ārstētu kāju vēnu čūlas; kompresija zeķes parasti lieto, lai novērstu atkārtosanos, kad čūla jau ir sadzījusī. Kompresijas zeķes var lietot arī hroniskas vēnu slimības agrīnajās stadijās, tajā skaitā trombozes slimības gadījumā (dziļo vēnu tromboze), lai palīdzētu novērst slimības progresēšanu.

Kompresijas terapijas sistēmas sastāv no:

- 1) elastīga materiāla;
- 2) neelastīga materiāla.

Neelastīgajam materiālam piemīt lielāka izturība nekā elastīgajam. Kompresijas terapijas elastību/stīvumu var novērtēt pēc statiskās cietības indeksa. To mēra pacietam guļus vai stāvus pozā un novērojot tieši spiediena izmaiņas – mijiedarbību. Kompresijas terapijas sistēmas ar augstu statiskās cietības indeksu (neelastīga vai daudzslāņu pārsēju sistēma) veidos augstāku spiedienu stāvus pozā un -, zemāku guļošanās pozā nekā kompresijas sistēmas ar zemu statiskās cietības indeksu (elastīgā sistēma). Efektīva kompresija tiek panākta ar

piemērotu precīzu pārsēju sistēmu, kurai vajadzētu nodrošināt mazliet kompresiju miera stāvoklī un pilnīgu kompresiju slodzes laikā.

Ideālai kompresijas sistēmai jābūt:

- 1) iestrādātai neelastīgai sastāvdaļai – šīs sistēmas ražo lielākas iekšējā spiediena variācijas staigāšanas laikā – tā saucamo masāžas efektu – un tiek uzskatas par efektīvākām nekā elastīgās sistēmas. Taču spiediena variācijas ir atkarīgas no apakšstilba muskuļu kustībām, piemēram, pastaigas laikā;
- 2) anatomiski atbilstoši – vienota divslāņu sistēma var tikt izmantota pat ļoti bojātām ekstremitātēm, tāpēc, ka pielāgotās pārsēja īpašības piemērojas ekstremitāšu formai;
- 3) ērtai miera stāvoklī – pacienti bieži nevar panest augsto spiedienu miera stāvoklī – nav ērts, un sliktā panesamība var sekmēt konkordances samazināšanos, kas samazina dzīšanas rezultātus un paildzina tās laiku;
- 4) ļauj viegli kustēties un funkcionēt;
- 5) viegli lietojamai un spēj piemēroties dažādiem ekstremitāšu izmēriem, formām;
- 6) nealerģiskai un izturīgai – materiāli bieži izraisa ādas reakcijas, piemēram, latekss, no kura lietošanas vajag izvairīties (Flecher et al., 2013).

Lai gan tas ir efektīvs terapijas veids, lai samazinātu čūlu atkārtēšanos, par problēmām tiek uzskatītas ādas alerģijas, nekroze un audu bojājumi sakarā ar spiedienu (Palfreyman et al., 1998). Kontrindikācijas kompresijas terapijai ietver klīniski nozīmīgu artēriju slimību un sirds mazspēju (Prakash et al., 2013).

1.3.3. Citi terapijas veidi

Venozo čūlu ārstēšana ar ķirurģisko palīdzību ir izmantota daudzus gadus. Pēdējos gados subfasciālās endoskopiskās operācijas (SEPS), kas rada mazāku problēmu risku čūlu dzīšanas procesos, tiek izmantotas, lai ligētu nepareizi perforējošu vēnu. Jaunas metodes varikozu vēnu ārstēšanā ir ieguvušas plašu atbalstu daudzās valstīs un ietver endovazālu lāzera un radiofrekvences ablāciju, kā arī ultraskaņas vadāmās putu skleroterapiju metodes (Coleridge-Smith et al., 2009). Ķirurģiskās metodes ļauj tieši attīrīt brūci no nekrotiskiem

audiem un novērtēt brūces dziļumu un stāvokli, bet bieži šīs manipulācijas noved pie tā, ka tiek atdalīti arī veselie audi (Analise et al., 2014).

Hroniskas venozās čūlas ir uzņēmīgas pret mikrobu invāziju, un komplikācijas var rasties, ja netiek savlaicīgi kontrolēta infekcijas parādīšanās (skat.3.1.3.1.attēls). Pacientiem ar hroniskām venozām brūcēm var rasties daudz komplikācijas, kas var palielināt jutību pret mikrobu invāziju. Tās ietver tūsku, lipodermatosklerozi, hemosiderīna nogulsnešanos, dermatītu, *atrophie blanche* un ilglaicīgas pirms iekaisuma imūnreakcijas. Šādiem pacientiem ir tendence uz neiropātijas attīstīšanos, ierobežotu potītes mobilitāti, dziļo vēnu trombozi, tromboflebītu, kā arī tiek minētas biežas pavadošās slimības, piemēram, aptaukošanās, arteriālā mazspēja, cukura diabēts un autoimūnas saslimšanas (Tuttle, 2015).



1.3.3.1. attēls Hroniskas venozas brūces iemesli, kas var palielināt noslieci uz mikrobu invāziju – dermatīts, ekzēma, hemosiderīna nogulsnešanās (Collins et al., 2010)

Hroniskās brūcēs bieži kolonizējas dažādi mikroorganismi, ieskaitot *Staphylococcus* un *Streptococcus* sugām, *P. aeruginosa* un *E. coli*. Palielināts baktēriju skaits var vājināt dzīšanu, jo īpaši, ja brūce inficējas ar rezistentu baktēriju (Parnés et al., 2007; Federman et al., 2014). Baktēriju klātbūtne norāda par brūces piesārņojumu, kolonizāciju, kritisku kolonizācijas un infekciju. Antibakteriālos līdzekļus lieto pret šiem organismiem un ietver dažādas vielas, piemēram, antiseptiķus, antibiotikas un dezinfekcijas līdzekļus, ko izmanto, lai atbrīvotos no mikroorganismiem, piemēram, baktērijām, sēnītēm, vīrusiem un viensūņiem. Tomēr, dezinfekcijas līdzekļi ir pārāk toksiski uzklāšanai uz ādas, līdz ar to tikai divus no minētajiem izmanto lokālai čūlu terapijai. Antiseptiķiem ir nespecifiska darbība un tie

iznīcina visus mikroorganismus.. Parasti izmanto antiseptiķus, kuri satur povidīna jodu, hlorheksidīnu, ūdeņraža peroksīdu, sudraba nitrātu, sudraba sulfadiazīnu, borskābi, acetātu, alkoholu un nātrija hipohlorītu. Svarīgi ir pareizas devas/koncentrācijas, antibiotiku pamatojums. No otras puses, atšķirībā no antiseptiķiem, to nepareiza lietošana var novest pie baktēriju rezistences attīstības. Visbiežāk izmantojamās antibiotikas ir bacitracīns A, neomicīns, fucidīns, mupirocīns retapamulīns (Dinker et al., 2013).

Hiperbāriskā skābekļa terapiju (HBOT) dažreiz izmanto kā palīg līdzekli standarta čūlu aprūpei. HBOT balstīta uz pamatojumu, ka audu hipoksija veicina sliktu hronisku brūču dzīšanu (Fonder et al., 2008). Šo terapijas veidu izmanto jau vairāk nekā 40 gadus (Kranke et al., 2003; Murphy et al., 2012). Skābeklis ir nepieciešams prolīna un lizīna hidroksilēšanai, polimerizācijai, kolagēna transportam, fibroblastu un endotēlija šūnu replikācijām, efektīvai leukocītu samazināšanai, angiogēnēzei un daudziem citiem procesiem (Hess et al., 2007). Tomēr priekšrocības paaugstinātai skābekļa terapijai joprojām ir pretrunīgas, jo HBOT saistīta ar vairākām iespējamām nelabvēlīgām sekām, tostarp skābekļa toksiskumu uz smadzenēm un plaušām, kā arī barotraumām ausīs, plaušās un deguna blakusdobumā. Turklāt tuvredzība ir ļoti izplatīts blakusefekts šai terapijai (Fonder et al., 2008). Lai mazinātu šīs terapijas toksiskumu, tiek izstrādāta metode skābekļa piegādei transdermāli caur drenāžas caurulīti uzreiz uz brūces vietu, tas varētu samazinātu terapijas ilgumu un izmaksas (Park et al., 2014).

Tiek izmantotas dažādas jaunas metodes. Brūces attīrīšanai no bojātajiem audiem, piemēram, augsta spiediena ūdens apūdeņošana un bionekrotisko audu atdalīšana ar ārstnieciskajiem kāpuriem, kas ļauj selektīvi atdalīt nekrotiskos audus divu dienu laikā (Swezey et al., 2013).

Elektrostimulācijai brūču dzīšanas pamats sākās 1860. gadā, kad DuBois-Reimonds aprakstīja elektriskās strāvas cilvēka ādas čūlās. Pašlaik ir četri galvenie stimulēšanas veidi, ko izmanto: līdzstrāvas, zemas frekvences strāvas impulsi, augstsprieguma strāvas impulsi un pulsējošie elektromagnētiskie lauki. Visvairāk pieejamais un tādējādi visātrāk izpētītais ir līdzstrāvas stimulēšanas veids. Tas sastāv no negatīva vai pozitīva elektroda novietojuma uz čūlas, un otra elektroda uz ādas virsmas, lielākā attālumā no čūlas (skat.3.1.3.1.tabulu). Taču tā izmantošana tika pārtraukta, jo netika ieviesti nekādi atjauninājumi. Zemas frekvences strāvas impulsu stimulēšanas veids ir plaši izmantots fizikālās terapijās. Tiek novietoti pa diviem elektrodiem uz ādas blakus čūlai un rezultātā notiek apkārtējā muskuļa stimulēšana un kontrakcijas, un tādējādi palielinās asins plūsma.

Dažādu strāvu terapijas ietekme uz čūlu (Hess et al., 2007)

Dažādu strāvu terapijas ietekme uz čūlu dzīšanu	
Pozitīvā strāva	Negatīvā strāva
veicina epitēlija augšanu un organizāciju	samazināta tūska ap elektrodu
darbojas kā vazokonstriktors un inducē salipšanu	lizē vai sašķidrina nekrotiskos audus
denaturē proteīnus	piesaista neitrofilus un stimulē granulēšanas audu augšanu
novērš postišēmisko lipīdu peroksidācijas	palielina asins plūsmu
samazina tuklo šūnu daudzumu	ietekmē fibroblastu proliferēšanos un spēju veidot kolagēnu
piesaista makrofāgus	inducē epidermālo šūnu migrāciju un tieši stimulē neironu daļu augšanu

1.4. Jaunākās terapeitiskās stratēģijas

Āda ir lielākais orgāns cilvēka organismā. Nopietnus ādas bojājumus izraisa traumas, slimības, apdegumi vai operācijas, kas iznīcina ādas funkcijas un apkārtējos audos. Tradicionālās terapijas brūču dzīšanā būtībā ir pasīvas - brūces ir sadzijušas, ļaujot tālāk procesam notikt dabiskā ceļā. Jaunās brūču dzīšanas tehnoloģijas kā ādas bioinženierija un audu aizvietotāji ir izstrādāti, lai atjaunotu ādas pamata funkcijas un rastu piemērotu vidi audu reģenerācijai. Ideālam čūlu dzīšanas materiālam jāspēj spēlēt ECM lomu līdz brīdim, kad saimniekorganisma šūnās var pašas izveidot jaunu dabisku matricu (Xin et al., 2013).

1.4.1. Imunomodulatoru izmantošana

Tiek pievērsta arvien lielāka interese sēņu un sēņu ekstraktu ietekmei uz cilvēka organismu. Publikācijās parādās netikai eksperimentāli pētījumi, bet arī epidemioloģiski. Arvien vairāk tiek izolēti farmaceitiski aktīvi sēņu producēti savienojumi, no kuriem

visplašāk ir pētīti augstmolekulāri polisaharīdi. Šīs grupas zināmākie pārstāvji ir β -glukāns lentināns, izolēts no *Lentinus (Lentinula) edodes*, sonifilāns no *Schizophyllum commune*, grifolāns no *Grifola frondosa*, kuriem piemīt pretvēža iedarbība (Borchers et al, 2004). Taču tiek pētīta arī polisaharīdu pretiekaisuma (Johannessen, 2008), imunomodulatorā iedarbība (Borchers et al, 2004). Glukāni jeb imunoloģiskie stimulatori var veicināt brūču dzīšanu, stimulējot audu granulāciju, kolagēna slāņa veidošanos un reepitelizāciju. Pētījumi liecina, ka glukānu stimulētais brūču dzīšanas mehānisms ir saistīts ar netiešu makrofāgu aktivāciju un iekaisuma citokīnu sekrēciju, kā TNF-a un IL-6 (Johannessen, 2008, Son et al., 2007). Turklāt tiek uzskatīts, ka cilvēka fibroblastiem ir glukāna specifiskie receptori, kas, iespējams, modulē šūnu funkcijas ar glukāna liganda mijiedarbības palīdzību (Son et al., 2007).

Sēņu imunomodulatorie proteīni (SIP), kas iegūti no *Lingzhi* sēnēm, ir glikoproteīnu grupa, kas iedalās vēl četrās apakšgrupās, iegūtas no *Ganoderma lucidum*, *Flammulina velutipes*, *Volvariella volvacea*, *Ganoderma tsugae*. Tām piemīt hepatoprotektīva, antifibrotiska, pretvēža un liela antioksidantu darbība, taču to iedarbība uz cilvēka organismu vēl tiek pētīta (Jinn et al., 2006).

Jau iepriekš in vivo pētījumos ir pierādīta pozitīvā *P.lanosoviride* AMPD ietekme – ātrāka ādas čūlu reepitelizācija, aizsardzība pret eksperimentālām infekcijām, aizkavēts akūts eksperimentālais autoimūnais encefalomielīts (Nikolajeva et al, 1996, Nikolajeva et al, 2000, Nikolajeva et al, 2009). Ir bijuši ziņojumi par sēņu polisaharīdu un glikoproteīnu receptoru klātbūtni cilvēka epidermas keratinocītos, no kuriem viens no izplatītākajiem receptoriem ir dektīns. Kad pie dektīna-1 saistās sēņu glikoproteīni, tiek inducēts MAPK signāla ceļš (Hau et al, 2011). MAPK ceļi tiek aktivizēti arī ar dažādiem ekstracelulāriem un intracelulāriem kairinājumiem, tostarp peptīdu augšanas faktoriem, citokīniem, hormoniem, un dažādiem šūnu faktoru, piemēram, oksidatīvo stresu. Šie signāla ceļi regulē dažādas šūnu darbības, tostarp proliferāciju, diferenciāciju, šūnu izdzīvošanu un nāvi (Kim et al., 2010). Jau iepriekš tika ziņots par beta-glukāna ietekmi uz keratocītu proliferācijas stimulāciju (Zulli et al, 1998). Daži autori uzver to spēju saistīties ar specifiskiem receptoriem dermas šūnās, un ar specifisku signālceļu starpniecību, stimulējot kolagēna sintēzi. Viens no veidiem, kā beta-glukāns stimulē kolagēna sintēzi, ir aktivējot transkripcijas faktoru NF- κ B t.i. kodola faktoru 1 (Wei et al, 2002). Bez dektīna ir identificēti arī citi beta glukānu saistīšanās receptori dermas šūnās, starp tiem arī *toll like* receptori (Kougiyas et al, 2001). Glukānu saistīšanās ar fibroblastu receptoriem, savukārt stimulē specifisku transkripcijas faktoru aktivizēšanu. *In vitro* testos parādīts, ka pastāv faktori, kas tiek inducēti uzreiz pēc glikānu pievienošanas kultivēšanas vidē, un ir faktori, kas izdalās vēlāk. Transkripcijas faktoru izdalīšanas izraisa strukturālo

proteīnu un augšanas faktoru ekspresijas izmaiņas. Vairāku autoru dati parāda, ka uzreiz pēc imunomodulatoru pievienošanas, notiek fibroblastu stimulācija ādā (Wei et al, 2002).

1.4.2. Audu inženierija

Pacientiem ar išēmiskām čūlām joprojām nav pieejama efektīva ārstniecības metode. Bieži amputācija ir bijusi gala rezultāts nesekmīgam dzīšanas procesam, veicinot ekonomisku spiedienu un slogu gan pacientiem, gan sabiedrībai. Pēdējos gados cilmes šūnu transplantācija tiek uzskatīta par jaunu terapeitisko stratēģiju šādu čūlu gadījumos. Kaulu smadzeņu mezenhimālās cilmes šūnas (BMSCs) ir izmantotas dažādās audu inženierijas stratēģijās, to multidiferenciālā potenciāla dēļ un tā imunomodulatora un audu atjaunošanas funkciju dēļ. BMSCs implantācija var ievērojami veicināt brūču dzīšanu, palielinot epitēlija veidošanos citoplazmā un lokālo angiogēnēzi čūlā. Lai gan BMSCs ir liels potenciāls bojāto audu terapijā, šūnu sliktā dzīvotspēja un tolerance ierobežo to spēju atjaunot audus (Chunli et al., 2013).

1.4.3. Augšanas faktori

Daudzsološa alternatīva kompresijas monoterapijai ir augšanu faktoru uzklāšana uz brūces, tādējādi sekmējot ātrāku brūču dzīšanas procesu. Hroniskas brūces dzīšanu var sekmēt trombocītu augšanas faktors (PDGF). Audos lielos daudzumos šis proteīns atrodas pēc trombocītu degranulācijas īsi pēc traumas iegūšanas. PDGF izdala arī vairākas citas šūnu līnijas, kas piedalās brūces dzīšanā, piemēram, makrofāgi, endotēlija šūnas, fibroblasti, un keratinocīti (Margolis et al., 2009). Izmantojot augšanas faktorus, ir iespējams ietekmēt dzīšanas fāzes. Citi augšanas faktori, kas varētu uzlabot hronisku čūlu dzīšanu, ir fibroblastu augšanas faktori, vaskulārie endotēlija faktori, granulocītu kolonijstimulējošie faktori un hepatocītu augšanas faktori (Tellechea et al., 2010). Eksogēnā vaskulārā endotēlija faktora un fibroblastu augšanas faktora izmantošana varētu veicināt neovaskularizāciju, reepitelizāciju un kolagēna nogulsnešanos, tādējādi stimulēt brūču dzīšanu. Tomēr hroniskas brūces vide var izraisīt priekšlaicīgu augšanas faktoru degradāciju un inaktivāciju, ko izraisa paaugstināts

matricas metālproteināzes darbība, tādējādi pasliktinot to terapeitisko iedarbību (Losi et al., 2013).

1.4.4. Gēnu terapija

Par svarīgu izpētes orgānu gēnu terapijā ir kļuvusi āda, jo tās izmaiņas var viegli novērot. Gēnu terapija ir pētīta arī kā alternatīva augšanas faktoriem, jo šūnas infiltrācijas veidā uzņem gēnus un ražo nepārtraukti terapeitiskos proteīnus lokālajā zonā. Pastāv vairākas metodoloģijas gēnu piegādei. Vīrusu vektoru tehnoloģija ir plaši atzīta un tā ietver adenovīrusu un lentivīrusu. Ir izstrādāti vairāki veiksmīgi vīrusu medītēto gēnu pārneses modeļi, taču to izmantošana ir ar augstām izmaksām un laika patērējoša, un to efektivitāte ir mainīga un pastāv risks lokālai vai sistemātiskai infekcijai. Citas metodes ietver neapbruņotu DNS, liposomas, elektroporāciju vai biomateriālu izmantošanu. Šāda pieeja var novērst infekciju risku un samazināt izmaksu lielumu.

Trombocītu augšanas faktora-b adenovirālā izmantošana dod ievērojamus uzlabojumus čūlu dzīšanā, granulācijas audu veidošanā un asinsvadu blīvumā, kā arī uzabo angioģenēzi un kolagēna veidošanos, bet neietekmē epitelializāciju. Slāpekļa oksīda sintāzes endotēlija izoforma gēnu piegādes terapijā uzlabo slāpekļskābes oksīda ražošanu un uzlabo brūču dzīšanu. Turklāt elektroporēšanas un vienlaicīga keratinocītu augšanas faktora plazmīdas DNS izmantošana palielina dzīšanas procesus.

1.4.5. Neuropeptīdi

Imūnsistēmai pastāv cieša mijiedarbība ar perifēro nervu sistēmu un ir nozīmīga loma neuroimūno funkciju regulēšanā. Aferentie nervi reaģē uz daudziem kairinājumiem, un šādu stimulāciju iespaidā neuropeptīdi tiek ātri atbrīvoti mikrovidē. Ādā šie neuropeptīdi saistās ar tajā esošajiem receptoriem, tai skaitā mikrovaskulāro edotēlija šūnu, keratinocītu, tuklo šūnu, fibroblastu un imūnsistēmas šūnu receptoriem (Tellechea et al., 2010). Taču šķērslis to izmantošanai terapijā ir viņu īsais pussabrukšanas laiks un bioloģiskās aktivitātes zudums peptidāzes iespaidā, kas atrodas brūces vidē (Moura et al., 2014).

1.4.6. Augu pielietojums

Mūsdienu medicīnas izaicinājums ir efektīvāku un zemāku izmaksu meklēšana terapeitiskajiem nolūkiem brūču dzīšanas procesos. Meklējot jaunas terapeitiskās iespējas, augi un to metabolīti var kļūt par labu pirmavotu jaunām biomolekulām. 90% ēterisko eļļu veido monoterpēni, kas uzrāda atbilstošu efektivitāti, piemēram, antimikrobu, pretiekaisuma, antioksidantu, un paātrina brūču dzīšanu (Barreto et al., 2014). Ēteriskās eļļas tiek uzskatītas par drošākiem antibakteriāliem aģentiem nekā sintētiskie, jo satur bioaktīvas sastāvdaļas. Augu ēteriskām eļļām piemīt insekticīdas, pretsēnīšu, un antibakteriālas īpašības. Piemēram, eikalipta eļļa, kas iegūta no *Eucalyptus globulus* satur apmēram 45,4% 1,8-cineola (eikaliptola). Eikaliptolam piemīt spēcīga pretmikrobu darbība pret cilvēka un barības izraisītiem patogēniem. Intradermāla eikalipta ēteriskās eļļas ievadīšana palielina kapilāru caurlaidību un veicina brūču dzīšanu (Sugumar et al., 2014).

2. MATERIĀLI UN METODEDES

2.1. Dzīvnieki

Pētījumā tika izmantoti *Wistar* žurku tēviņi, kuru svars bija 220 - 240 g un *C57BL/6* līnijas peļu tēviņi, kuru svars bija 22 - 24 g. Žurku un peļu tēviņi tika saņemti no Rīgas Stradiņa Universitātes Eksperimentālo dzīvnieku audzētavas, kur tos uzturēja atbilstoši visiem dzīvnieku labturības noteikumiem - standarta laboratorijas apstākļos (21-23°C), ar 12 stundu gaismas - tumsas ciklu un baroti ar „*Tukuma straume*” standarta barības maisījumu grauzējiem. Dzīvniekiem tika nodrošināta brīva pieeja barībai un ūdenim. Žurku adaptācijai izmantoja plastikātu būrus, katrā būrī ievietojot pa astoņiem līdz desmit dzīvniekiem. Visas darbā aprakstītās eksperimenta procedūras veiktas saskaņā ar Eiropas Parlamenta un Padomes konvenkcijas direktīvu 2010/63/ES vadlīnijām un saskaņotas ar Latvijas Pārtikas un veterināro dienestu un Dzīvnieku aizsardzības ētikas padomi.

2.2. Eksperimentā izmantotās vielas

Pētījumā izmantotā aktīvā viela bija imunomodulatora glikoproteīns - adenilāta dezamināze (AMPD), biotehnoloģiski iegūts no mikroskopiskas micēlijsēnes *Penicillium lanoso-viride* (Nikolajeva et al., 2009). Biomateriāla gēlveida matricas veidošanai tikai izmantota hialuronsābe (*Contipro*). *In vivo* novērtēšanai tika saņemts gatavs biomateriāls darba izstrādes vajadzībām no LU Bioanalītisko un biodozimētrijas metožu laboratorijas.

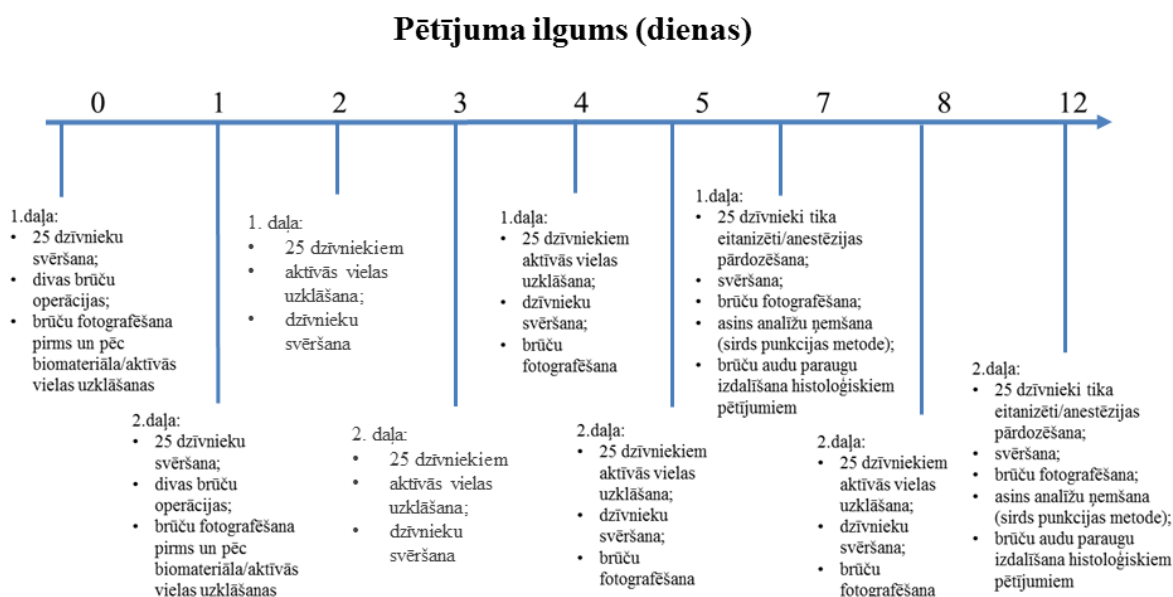
Pētījumā tika izmantotas divas veida anestēzijas vielas:

1. gāzes anestēzija – izoflurāns;
2. injekciju anestēzija – 10% ketamīns 75 mg/kg (*AlfaSan*, Holande), 2% ksilazīns 15 mg/kg (*Bremer Pharma GMBH*, Vācija).

Dzīvniekiem pilināja acu pilienus (*Naphcon A*, ASV). Brūces tika skalotas ar fizioloģisko šķīdumu, savukārt ādas rajons pirms brūces izveidošanas tika apstrādāts ar 70% etanolu. Brūču audu paraugi tika ievietoti 10% formalīnā un uzglabāti tālākiem histoloģiskiem pētījumiem.

2.3. Eksperimenta darba gaita ar žurkām

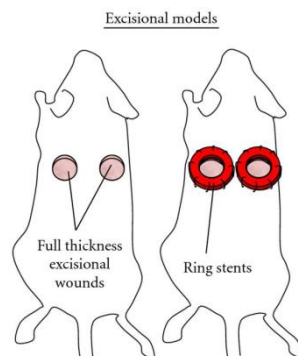
Pētījuma dzīvnieki (50 gab.) tika iedalīti divās grupās pa 25 dzīvniekiem katrā. Abās grupās tika veiktas secīgi vienādās manipulācijas (skat. 2.3.1.attēls). Pirmās daļas dzīvniekiem brūču dzīšanas process tika novērots 6 dienas, savukārt otrās daļas žurkām brūču dzīšana tika novērota 12 dienas. 6. un 12. dienā tika ņemti asins un brūču biopsijas paraugi.



2.3.1. attēls Pētījuma dizains

2.3.1. Operācija brūču izveidošanai un aktīvās vielas uzklāšana

Pētījumā izmantoja 50 Wistar līnijas žurku tēviņus. Dzīvnieki tika sadalīti sešās grupās. Pirms operācijas dzīvniekus nosvēra un anestezēja, ievadot 10% ketamīnu devā 75 mg/kg, sajauktu ar 2% ksilazīnu 15 mg/kg. Anestezētiem dzīvniekiem tika noskūta muguras daļas vilna. Noskūto ādudezinficēja ar 70% etanolu. Pirms brūču izveidošanas, dzīvniekiem tika iepilināti acu pilieni, lai novērstu acis izžūšanu. Brūces izveidošanai izmantoja ādas biopsijas instrumentu (d=8mm *Kai Medical*, Japāna). Muguras āda tika nostiepta pa mugurkaula viduslīniju, un simetriski abās pusēs mugurkaulam ar biopsijas instrumentu tika izgrieztas divas vienādas brūces. Izveidotās brūces noskaloja pāris reizes ar fizioloģisko šķīdumu. Lai brūces nekontrahētos, ap brūču malām tika apšūtas silikona riņķveida šinas ar diametru 10 mm (*Sigma*, ASV), izmantojot 6/0 izmēra ķirurģisko diegu (skat.2.3.1.1.attēls).



2.3.1.1. attēls Divas simetriski izveidotas brūces ar silikona šinām

Pirms vielas uzklāšanas uz brūcēm, uz katras žurkas muguras novietoja papīra lineālu, uz kura bija atzīmēta attiecīgā grupa un diena, un fotografēja katru brūci.

Uz tīras brūces, pilnībā to pārklājot, aplicēja 100µl testējamo biomateriālu/šķīdumu:

1. Kontroles grupai: ~0,1 ml 1xPBS (biomateriāla veidošanā izmantotais šķīdinātājs);
2. Biomateriāla kontrolei I.: ~0,1 ml;
3. Biomateriāla kontrolei II.: ~0,1 ml;
4. AMPD šķīduma: ~0,1 ml šķīdumu;
5. Biomateriālam I (satur nekroslinkotu hialuronskābi (HA) un 20 mkg/ml AMPD): 0,1 ml gēlveida biomateriāla;
6. Biomateriālam II (satur kroslinkotu HA un 20 mkg/ml AMPD): 0,1 ml gēlveida biomateriāla.

Biomateriāls I un biomateriāls II savstarpēji atšķiras ar izmantotajiem hialuronskābes tipiem – biomateriāls I satur nekroslinkotu (nešķērssaistītu) hialuronskābi, biomateriāls II satur nekroslinkotas hialuronskābes kombināciju ar kroslinkotu (šķērssaistītu).

Trīsdesmit sekundes pēc biomateriālu/šķīdumu aplicēšanas, uz brūču rajona uzlika primāro pārsēju *Mepitel One Safetac*. To nostiprināja ar elastīgu pašlīpošu lentu *Nowopress* un papildus, lai nodrošinātu noturību, virs pašlīpojošās lēntas tika aplikts *Mefix* plāksteris. Pēc apsēju uzlikšanas, žurkām injicēja subkutāni fizioloģisko 2ml šķīdumu. Dzīvnieki pēc operācijas tika atsevišķi turēti pa vienam būrī.

2.3.2. Aktīvās vielas atkārtota uzklāšana

4., 6., 8. un 12. dienā pēc brūču izveidošanas žurkas anestezēja ar izoflurānu, ievietojot anestēzijas aparātā *Quaniflex Low Flow V.M.C 'Matrix'* (*Harvard Apparatus GmbH, ASV*). Pirms pārsēju noņemšanas, dzīvniekus nosvēra. Izmantojot šķēres, pārgrieza plāksteri un pašlīpošo lentu un ar pinceti noņēma *Mepitel One Safetac* primāro pārsēju. Brūci noskaloja ar fizioloģisko šķīdumu. Katras žurkas brūces tika fotografētas trīs reizes ar Pentax istDS digitālo kameru. Lai fiksētu brūču dzīšanas parametru izmaiņas, pirms fotografēšanas zem brūces tika novietots papīra lineāls (ar mazāko iedaļu 1mm), uz kura norādīta bija attiecīgā diena un dzīvnieka grupa.

Trīsdesmit sekundes pēc biomateriālu/šķīdumu aplicēšanas, uz brūču rajona uzlika jaunu primāro pārsēju *Mepitel One Safetac*. To nostiprināja ar elastīgu pašlīpošu lentu *Nowopress* un papildus, lai nodrošinātu noturību, virs pašlīpojošās lentas tika aplikts *Mefix* plāksteris.

2.3.4. Brūču dzīšanas dinamikas izvērtējums ar *ImageJ* programmu

Pirms tālākas žurku brūču attēlu apstrādes ar *ImageJ* programmu, tās tika sadalītas atsevišķās mapēs pa dienām un grupām. Lai mērījums būtu efektīvāks, tika izmantotas pietuvinātās bildes, un izvēlēta tālākai analīzei attiecīgās žurkas kvalitatīvāk uzņemtā brūces bilde. Žurku brūču bilžu apstrāde notika, izmantojot *ImageJ* programmu. Vispirms ielādēju izvēlēto bildi, tad veicu bildes kalibrēšanu – ar bildē esošo lineālu un programmas palīdzību. Izmantojot programmas daudzveidīgās opcijas, tika izvēlēta brūces laukuma iezīmēšana un programma automātiski izrēķināja rezultātu. Katras brūces attēls tika atkārtoti analizēts trīs reizes un izrēķināts vidējais rādītājs no trim mērījumiem.

Brūces dzīšanas procentuālai dinamikas aprēķināšanai pielietoja sekojošu formulu:

brūces dzīšana % = $(A_0 - A_t) / A_0 * 100\%$, kur A_0 ir 0 dienas brūces laukums un A_t ir attiecīgi 4, 6, 8 vai 12 dienas brūces laukums.

2.3.3. Eitanāzija un biopsijas paraugu paņemšana

Žurkas eitanizēja, injicējot 10% ketamīnu 100 mg/kg, 2% ksilazīnu 10 mg/kg. Pirms pārsēju noņemšanas, dzīvniekus nosvēra. Izmantojot šķēres, pārgrieza plāksteri un pašlīpošo lentu un ar pinceti noņēma *Mepitel One Safetac* primāro pārsēju. Pēc riņķu noņemšanas, uz žurkas brūces novietoja papīra lineālu un fotografēja brūces. Izmantojot sirds punkcijas metodi, žurkām tika paņemti asins paraugi. Pirms atkārtotas fotografēšanas, tika izgriezti silikona riņķi. Pēc fotografēšanas tika paņemti brūces biopsijas paraugi, un tie tika ievietoti 10% formalīnā.

2.3.5. ELISA metode

ELISA tests jeb enzīmu saistītā imunosorbentā analīze ir metode, ar kuras palīdzību var kvantificēt šķīstošu proteīnu klātbūtni pētāmajā paraugā. Metodes pamatā ir saistīšanās - antivielu imobilizācija uz plates virsmas, kas nodrošina pētāmā proteīna piesaisti. Pievienojot ar enzīmu konjugētu detekcijas antivielu un enzīma substrātu, tiek panākta krāsas reakcija, ko detektē spektrofotometriski, un tās intensitāte korelē ar pētāmā proteīna koncentrāciju paraugā.

ELISA tika veikta pēc ražotāja (R&D Systems) rekomendācijām:

1. sagatavo 96-lauciņu ELISA plati, uznesot saistīšanās antivielu 100 µl/lauciņā, noslēdz ar plēvi un inkubē pa nakti istabas temperatūrā;
2. nākamajā dienā plati mazgā 3 reizes ar 200 µl mazgāšanas buferi (0.05% Tween20/PBS);
3. uznes bloķēšanas buferi (1% BSA/PBS) 300 µl/lauciņā un inkubē 1 stundu istabas temperatūrā;
4. plati mazgā 3 reizes ar 200 µl mazgāšanas buferi;
5. pa 100 µl/lauciņā dublikātos uznes paraugus un standartšķīdumus (2000 – 31,25 pg/ml), inkubē 2 stundas istabas temperatūrā;
6. plati mazgā 3 reizes ar 200 µl mazgāšanas buferi;
7. uznes biotinilētu detekcijas antivielu 100 µl/lauciņā, inkubē 2 stundas istabas temperatūrā;
8. plati mazgā 3 reizes ar 200 µl mazgāšanas buferi;

9. uznes ar peroksidāzi saistītu streptavidīnu 100 µl/lauciņā un inkubē 20minūtes istabas temperatūrā, tumsā;
10. plati mazgā 3 reizes ar 200 µl mazgāšanas buferi;
11. uznes iepriekš svaigi sagatavotu substrāta šķīdumu (1:1, H₂O₂: tetrametilbenzidīns) 100µl/lauciņā un inkubē 20 minūtes istabas temperatūrā, tumsā;
12. krāsu reakciju apstādina, pievienojot 50 µl/lauciņā 2N H₂SO₄;
13. Proteīnu koncentrāciju nosaka spektrofotometriski, mērot optisko blīvumu pie viļņu garuma 450nm (OD450).

2.3.6. Multipleks metode

Tika izmantots Milliplex MAP komerciāli pieejamais komplekts. Šajā metodē tiek izmantotas ar divām dažādām fluorescentām krāsvielām iekrāsotas magnētiskas lodītes, no kurām, balstoties uz krāsvielu koncentrācijām, var tikt izveidoti 100 atšķirīgi iekrāsoti lodīšu komplekti. Katrs no tiem satur specifisku uztveršanas antivielu, pie kuras turpmāk tiek piesaistīts analīts. Ar analītu savukārt saistās biotinilēta detekcijas antivielu. Reakcija tiek pabeigta ar streptavidīna piesaisti, kas konjugēta ar fikoeritrīnu, un kalpo par reportiera molekulu. Piesaistītā analīta veids un koncentrācija paraugā tiek noteikta, izmantojot duālas detekcijas plūsmas citometru, kas identificē katru mikroloidi pēc tās krāsas un rezultātus kvantificē pēc reportiera molekulas fluorescences intensitātes.

Šāda sistēma pieļauj dažādu vielu koncentrāciju mērījumus vienam paraugam, jo iespējams pievienot vairāku veidu lodītes, kas katra atbilst noteiktam mērāmajam parametram.

Metode veikta vadoties pēc komerciālā komplekta ražotāja (EMD Millipore Corporation) ieteiktā protokola.

Tika analizēti 10 dažādi analīti: TNF- α , IL-1 β , IL-6, VEGF, IFN γ , IL-10, IL-18, IP-10, MIP-1 α , GRO/KC.

Pirms darba uzsākšanas pēc ražotāja rekomendācijām tika sagatavotas ar antivielām imobilizētas magnētiskās lodītes, standartšķīdumi, kvalitātes kontroles, seruma matricas šķīdumi.

Darba gaita:

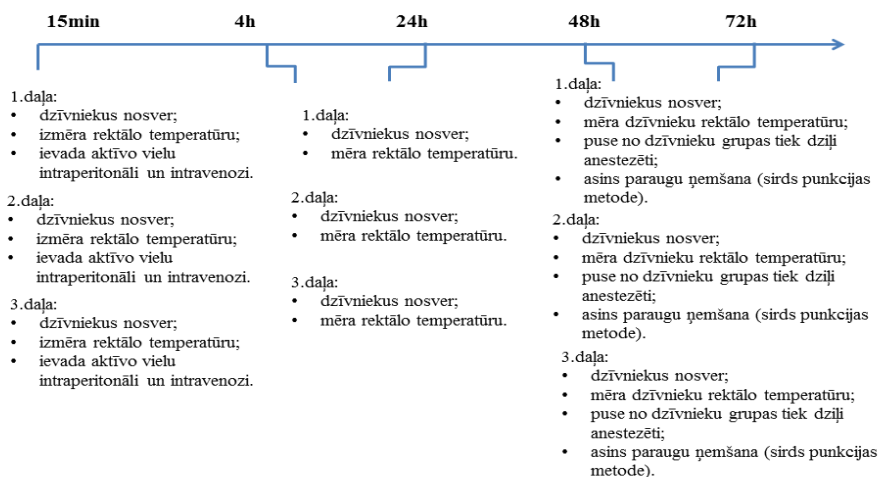
1. platē katrā lauciņā uznes 200 μL mazgāšanas buferšķīdumu, liek uz aktīva plašu kratītāja 10 minūtes istabas temperatūrā;
2. vadoties pēc eksperimenta plānojuma, attiecīgajos 96-lauciņu plātes lauciņos pievieno 25 μL standartšķīdumu, kontroles šķīdumu vai analizējamo paraugu, fona nolāstijumam izmanto komplektā pievienoto seruma matriksu;
3. plātes visiem lauciņiem pievieno 25 μL magnētisko lodīšu maisījuma, plāti noslēdz ar optisko plēvi un foliju, inkubē 2 stundas tumsā uz aktīva plašu kratītāja;
4. pēc inkubācijas plāti mazgā 2 reizes ar 200 μL mazgāšanas buferšķīduma;
5. pievieno 25 μL detekcijas antivielu, plāti noslēdz ar optisko plēvi un foliju, inkubē 1 stundu tumsā uz aktīva plašu kratītāja;
6. pēc inkubācijas, pievieno 25 μL streptavidīna-fikoeritrīna, plāti noslēdz ar optisko plēvi un foliju, inkubē 30 minūtes tumsā uz aktīva plašu kratītāja;
7. pēc inkubācijas plāti mazgā 2 reizes ar 200 μL mazgāšanas buferšķīduma;
8. pievieno 125 μL lodīšu nesējbuferi, inkubē 5-10 minūtes tumsā uz aktīva plašu kratītāja.

Datus nolasa izmantojot Luminex 200 analizatoru.

2.4. Eksperimenta darba gaita ar pelēm

Eksperiments ilga trīs dienas, un 36 pētījuma dzīvnieki tika sadalīti trīs grupās, katrā pa 12 dzīvniekiem. Trīs grupās tika veiktas secīgi vienādās manipulācijas (skat.2.4.1.attēls), kas bija paredzētas eksperimenta plānā.

Aktīvās vielas toksicitātes noteikšanas gaita (laiks)



2.4.1. attēls Eksperimenta dizains

2.4.1. Aktīvās vielas akūtas devas toksicitātes novērtējums

AMPD šķīduma akūtās devas toksicitātes izvērtēšanai tika izmantoti peļu tēviņi (C57BL/6 līnijas). Peles nosvēra un sadalīja trīs grupās katrā pa 12 dzīvniekiem:

1. fizioloģiskā šķīduma grupa (kontrolē);
2. AMPD šķīdums devā 10,5 mg/kg;
3. AMPD šķīdums devā 3,5 mg/kg.

Divas aktīvās vielas koncentrācijas tika ievadītas intraperitonāli un intravenozi peles astes laterālajā vēnā.

Pirms vielu ievadīšanas pelēm tika izmērīta rektālā temperatūra (izejas jeb „nulle” mērījums). Vielas ievadīja intraperitoneāli tilpumā 10 ml/kg. Rektālā temperatūra tika atkārtoti mērīta pēc 15 minūtēm, 4 stundām, 24 stundām, 48 stundām un pusei dzīvnieku no katras grupas pēc 72 stundām, jo otra puse tikai dziļi anestezēta. Dzīvnieki tika atkārtoti nosvērti pēc 24 stundām, 48 stundām un 72 (pusei dzīvnieku no katras grupas, n=6). Visa eksperimenta gaitā izvērtēja peļu vispārējo stāvokli un uzvedību.

Četrdesmit astoņas stundas pēc vielu ievadīšanas un pēc mērījumu veikšanas, pusi dzīvnieku dziļi anestezēja ar ketamīna/ksilazīna šķīdumu (100mg/10 mg/kg). Veicot sirds

punkciju, paņēma asins paraugu. Septiņdesmit divas stundas pēc vielu ievadīšanas, otru dzīvnieku daļu eitanizēja un tāpat ieguva asins paraugu.

2.5. Statistika

Iegūtie dati tika ievadīti un apstrādāti Microsoft Excel 2010 for Windows programmā. Rezultāti tika izteikti kā vidējais \pm SEM. Statistiskā ticamība tika aprēķināta, izmantojot datorprogrammu GraphPad Prism v.5.04. Atšķirības starp pētījumu grupām brūču dzišanai izvērtētas ar two-way ANOVA testu, kas sīkāk tika analizēts ar *posthoc Bonferroni multiple comparisons* testu. Rezultāti tika uzskatīti par statistiski ticamiem pie $p < 0,05$.

3. REZULTĀTI UN DISKUSIJA

Jebkurš ādas bojājums izraisa secīgu reakciju kaskādi, ieskaitot iekaisuma procesu, jaunu audu veidošanos un remodelēšanu, kas rezultātā noved pie vismaz daļēja bojāto audu rajona rekonstrukcijas. Uzreiz pēc iegūtā ādas bojājuma tiek atbrīvoti dažādi augšanas faktori, citokīni, zemas molekulmasas savienojumi. Jau pēc pāris stundām uz skarto vietu migrē iekaisuma šūnas - neitrofili, monocīti un limfocīti. Tās producē dažādas proteāzes, lai aizsargātu brūces vidi no dažādu mikroorganismu invāzijas. Vēlāk notiek keratinocītu un fibroblastu proliferācija un migrācija uz skarto rajonu. Pēc šo šūnu migrēšanas uz pagaidu matricu, notiek angiogēnēze, kuras laikā notiek jaunu asinsvadu veidošana. Rezultātā notiek kolagēna sintēze un katabolisms (Werner et al., 2002). Pēdējos gados jaunatklājumi molekulārajā bioloģijā paver lielākas iespējas, lai izveidotu labāku un efektīvāku biomateriālu, kas uzlabotu brūču dzīšanas procesu, samazinot brūču dzīšanas laiku (Kujath et al., 2008).

Mūsdienās pastāv dažādas terapijas, kas ietekmē dzīšanas procesu un sekmē čūlu ātrāku dzīšanu, taču bieži tās nenoved pie vēlamā rezultātā, kas galu galā ietekmē netikai pacienta dzīves kvalitāti, bet arī izmaksas, kas mūsdienās ir ļoti aktuāla problēma. Čūlu ārstēšanas ilgums katram pacientam variē, jo bieži pati terapija nav efektīva un nākas meklēt citu terapiju problēmas risināšanai, tāpēc jaunizveidotā biomateriāla pētījums paver jaunas iespējas čūlu ārstēšanai, iespējams, pacienta samazinot netikai brūču sadzīšanas laiku, bet arī ārstēšanās ilguma izmaksas un uzlabo kopējo dzīves kvalitāti.

3.1. Metožu analīze *Wistar* līnijas žurkām

3.1.1. Attēlu analīze, lai noteiktu brūču dzīšanas dinamiku

Divi svarīgi mērķi brūču dzīšanas procesā ir:

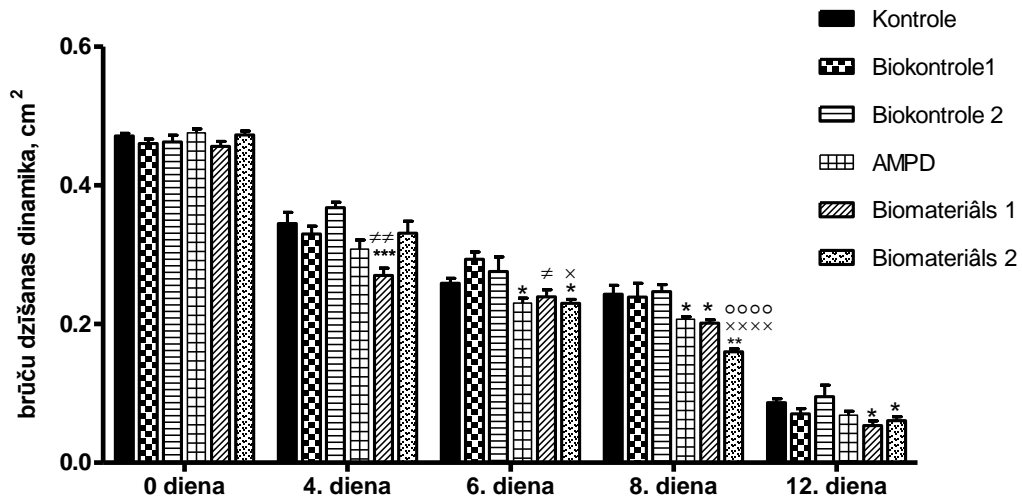
1. noteikt dažādu faktoru ietekmi;
2. izpētīt vielas, kas veicina efektīvāku brūču sadzīšanu (Nikolajeva et al., 2009).

Iepriekš jau ir pētīta dažādu vielu ietekme uz brūču dzīšanas procesu, taču tā ir ļoti dažāda, tāpēc ir nepieciešama padziļinātāka izpēte un izstrāde jaunas, efektīvas vielas atrašanai.

Maģistra darba pētījums paver jaunas iespējas brūču ārstēšanai. Par to liecina vairāku pielietoto metožu rezultāti un brūču dzīšanas dinamikas analīze.

Sākot no dienas (0 diena), kad žurkām tika radītas brūces, 4., 6., 8. un 12. dienā, dzīvnieku katra brūce tika fotografēta. Brūču dzīšanas dinamika tika analizēta ar *ImageJ* programmas palīdzību, rezultāts tika izteikts kā brūces laukums kvadrātcentimetros (skat. 3.1.1.1.attēls). Brūces laukums 0 dienā visās grupās bija gandrīz identisks, kā tam būtu jābūt, jo visu brūču radīšanai tika izmantots vienādā diametra ($d=8\text{mm}$) biopsijas instrumenti, taču jau pēc četrām dienām brūču dzīšanas dinamika jau atšķīrās pa grupām. Visas grupas, sākot no ceturtais dienas, tika salīdzinātas pret kontroles grupu. Rezultāti uzrāda, ka biomateriāla 1 un 2 dzīšanas dinamika ir krietni labāka nekā kontroles grupai, kā arī gan biomateriāls 1, gan biomateriāls 2 tika salīdzināts pret attiecīgi biokontroli 1 vai biokontroli 2. To noteica attiecīgā grupā izmantotā hialuronskābe (HA), tāpēc biomateriāls 1, kur bija nekroslinkota HA + AMPD, tika salīdzināts pret biokontroli 1, jo tā sastāvēja no nekroslinkotas HA, taču biomateriāla 2 sastāvā bija kroslinkota un nekroslinkota HA + AMPD, tāpēc to salīdzināja ar biokontroli 2, kurā ietilpa kroslinkota un nekroslinkota HA. Jau ceturtajā dienā var novērot statistiskas atšķirības, kur biomateriāls 1 uzrāda labāku brūču dzīšanu nekā kontroles un biokontroles 1 grupas. Rezultāti parāda, ka sestajā, astotajā un divpadsmitajā dienā ir arvien lielāka brūču dzīšanas dinamikas atšķirība starp kontroles, biokontroles 1 un 2 grupām no AMPD, biomateriāla 1 un 2 grupām. Var novērot, ka kontroles un biokontroles grupu brūču dzīšana nebija tik ātra, kā AMPD, biomateriāla 1 un 2 grupās visa pētījuma ilgumā. Rezultāti ir statistiski ticami, kas norāda uz to, ka biomateriāla efektivitāte ir lielāka nekā kontroles, biokontroles grupām.

Žurku brūču dzīšanas dinamika



3.1.1.1.attēls Žurku brūču dzīšanas dinamika cm^2 0, 4, 6, 8 un 12 dienā kontroles (PBS šķīdums), biokontroles 1 (nekroslinkots HA), biokontroles 2 (kroslinkots un nekroslinkots HA), AMPD, biomateriāla 1 (nekroslinkots HA + AMPD) un biomateriāla 2 (kroslinkots un nekroslinkots HA + AMPD) grupām. * $p < 0.05$ vs. kontrole (PBS šķīdums), \neq $p < 0.05$ vs. biokontrolē 1 (nekroslinkots HA), \times $p < 0.05$ vs. biokontrolē 2 (kroslinkots un nekroslinkots HA), $^\circ$ $p < 0.05$ vs. AMPD, two-way ANOVA tests, kas sīkāk tika analizēts ar *posthoc Bonferroni multiple comparisons* testu

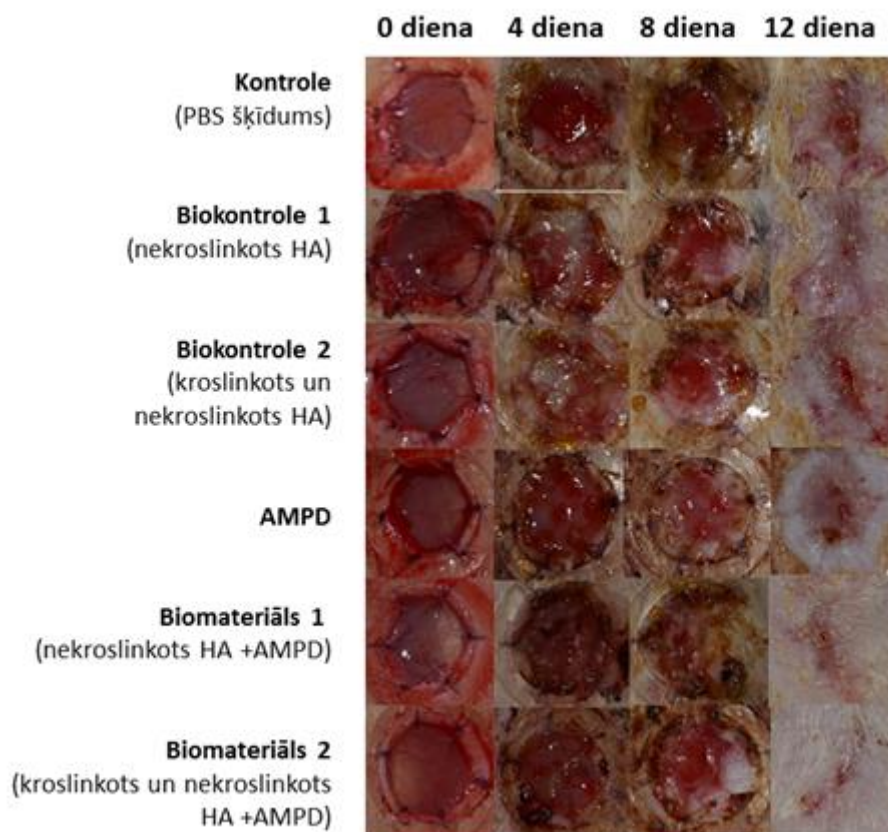
Brūču dzīšanas atšķirīgo dinamiku uzrāda arī, laukumu aprēķins procentos. Jau ceturtajā dienā pēc brūču operācijas, rezultāti uzrāda, ka biomateriāla 1 nesadzijušais brūces laukums ir mazāks nekā kontroles vai biokontroles grupām. Ar katru nākamo dienu šī atšķirība palielinās starp grupām. Divpadsmitajā dienā gan biomateriāla 1, gan biomateriāla 2 un AMPD grupas uzrāda, ka nesadzijušais brūces laukums ir mazāks nekā kontroles vai biokontroles 1 un biokontroles 2 grupām. Var secināt, ka aktīvā viela, proti, AMPD un hialuronskābes savienojums ietekmē pozitīvi brūces dzīšanas dinamiku, ko pierāda gan procentuālie aprēķini, gan statistiskie rādītāji.

Nesadzijušais brūču laukums izteikts procentos 4., 6., 8. un 12. dienā

	nesadzijušās brūces laukums procentos			
	4. diena	6. diena	8. diena	12. diena
Kontrole	73,23	54,99	51,59	18,31
Biokontrole 1	71,65	63,73	51,88	15,32
Biokontrole 2	79,55	59,53	53,24	20,61
AMPD	64,75	48,39	43,58	14,43
Biomateriāls 1	59,20	52,40	44,09	11,75
Biomateriāls 2	70,04	48,63	33,81	12,91

Lai netikai atšķirību varētu novērtēt starp grupām pēc aprēķiniem un statistiskiem rādītājiem, bet arī vizuāli, tika izvēlētas no katras grupas, proti, kontroles, biokontroles 1, biokontroles 2, AMPD, biomateriāla 1 un biomateriāla 2 grupām labāka bilde attiecīgi brūču izveidošanas dienā (0 dienā), 4. dienā, 8. dienā un 12. dienā (skat.3.1.1.2.attēls).

Vizuāli var redzēt, ka ir novērojama atšķirība starp kontroles un biomateriāla grupu brūcēm. Lielākā vizuāla atšķirība starp dažādu grupu dzīvnieku brūcēm ir 12. dienā. Tām, kurām tika uzklāts biomateriāls, kas saturēja kroslinkotu vai nekroslinkotu un kroslinkotu HA un AMPD, brūce bija sadzījusi, taču kontroles žurku brūcēm, kurām tika uzklāts PBS šķīdums, vizuāli brūce nebija pilnībā sadzījusi. Ja vizuāli izskata brūču dzīšanas dinamiku atsevišķi katrai grupai, tad var novērot, ka vizuāli kontroles grupa gan 4., gan 8., gan 12. dienā atšķiras ar sadzijušo laukumu.



3.1.1.2.attēls Brūču dzīšanas dinamika 12 dienu garumā kontroles (fosfātu buferšķīdums), biokontroles 1 (nekroslinkota hialuronskābe), biokontroles 2 (kroslinkota un nekroslinkota hialuronskābe), AMPD (adenilāta dezamināze), biomateriāla 1 (nekroslinkota hialuronskābe + adenilāta dezamināze) un biomateriāla 2 (kroslinkota un nekroslinkota hialuronskābe + adenilāta dezamināze) grupās

Kopumā šis 12 dienu pētījums paver jaunas medicīnas ierīces izmantošanas iespējas čūlu ārstēšanai, jo rezultāti acīmredzami gan vizuāli, gan izmantojot dažādas programmas un aprēķinus, pierāda jauno biomateriālu efektivitāti. Mūsdienās ir pieejami dažādi brūču pārsēji, taču nevienmēr tiek panākts vēlamais efekts un rezultāts, tāpēc joprojām tiek meklēta viela vai vielu savienojums, kas spētu pierādīt visas nepieciešamās īpašības, kas būtu vajadzīgas salīdzinoši ātrākai, efektīvai brūču dzīšanai. Šie jaunie biomateriāli, kas satur biodegradējamu materiālu ar imunomodulatoru glikoproteīnu, spēj sekmīgi un efektīvi ietekmēt dzīšanu, paātrinot šo procesu.

3.1.2 Proteīnu sekrēcijas analīžu izvērtējums žurku plazmā

„Citokīni” ir termins, kurš ietver dažādu šķīstošo proteīnu un peptīdu grupas, kas darbojas kā regulatori gan normālās, gan patoloģiskās vidēs, lai modulētu atsevišķu šūnu un audu funkcionālās darbības. Šīs olbaltumvielas mediē arī tiešas mijiedarbības starp šūnām un regulē notiekošos procesus ekstracelulārajā vidē. Citokīnu grupā ietilpst limfokīni, interferoni, koloniju stimulējošie faktori un hemokīni. Citokīnu un hemokīnu pētniecībai ir nozīmīga loma, lai sasniegtu dziļāku izpratni par imūnās sistēmas un tās daudzšūnainu reakciju darbībām uz antigēniem, kā arī slimībām, piemēram, iekaisumu, alergiskām reakcijām, sepsi, un vēzi (Werner et al., 2003).

Lai analizētu žurku asinis, tika izmantota Multiplex metode, kur no analizētajiem 10 analītiem: TNF- α , IL-1 β , IL-6, VEGF, IFN γ , IL-10, IL-18, IP-10, MIP-1 α , GRO/KC, tika detektēti VEGF un IP-10. Izmantojot Multiplex analīzi, žurku asins plazmas paraugos netika noteikts IL-6, IFN γ un GRO/KC. Tas skaidrojams ar to, ka šo analītu sekrēcijas līmenis, iespējams, ir ļoti zems, un nesasniedz izmantotās metodes detekcijas sliekšni. Attiecībā uz analītu GRO/KC visticamāk, tas netika detektēts, jo šī analīta sekrēcijas maksimums visbiežāk tiek novērots pirmajā dienā pēc brūces izveidošanas, lai regulētu neitrofilu hemotaksi. Savukārt IFN γ zemā ekspresija arī var izskaidrot ar to, ka ir sastopamas dažādas pozitīvas un negatīvās atgriezeniskās saites starp citokīniem. IFN γ ir potenciāls angiogēnēzes inhibitors, tāpēc tā zemā ekspresija liecina par normālu dzīšanas procesu (Werner et al., 2003).

Brūču dzīšanas pētījumos svarīga ir IL-6 sekrēcija, tomēr jāuzsver, ka pētījumos ir parādīts, ka šī citokīna sekrēcijas pieaugums novērojams tieši brūcē un tās apkārtējos audos. Iespējams, ka IL-6 lokāls sekrēcijas pieaugums, taču sistēmiski šis pieaugums nav būtisks, un tādēļ arī šajā pētījumā analīti netika detektēti analizētajos asins plazmas paraugos (Proksch et al. 2008).

Jāuzsver, ka analizētajos eksperimenta dzīvnieku asins plazmas paraugos vairākiem no detektētajiem citokīniem koncentrācijas variēja plašās robežās un netika novērotas šo analītu sekrēcijas izmaiņas atkarībā no brūču aprūpes – kontroles brūcēm, AMPD vai biomateriālu aplikācijas. Daži faktori tika noteikti pie dažādām vērtību robežām (skat. 3.1.2.1. tabulu, 3.1.2.2. tabulu).

Analītu koncentrāciju robežas 6. dienas eksperimenta dzīvnieku grupās

Analīts	Noteikto koncentrāciju robežas (vidējā vērtība, vai mediāna) pg/ml	6. dienas eksperimenta dzīvnieku grupas, kurās analīts detektēts
MIP-1 α	1,62 - 51,37	kontrolē, biokontrolē 1 un 2, AMPD, biomateriāls 2
IL-1 β	58,20 - 83,21	biokontrolē 1 un 2, biomateriāls 2
IL-10	4,16 - 59,09	biokontrolē 1 un 2, biomateriāls 2
TNF- α	1,13 - 3,00	kontrolē, biomateriāls 2
IL-18	30,97 - 714,43	biokontrolē 1 un 2, AMPD, biomateriāls 1 un 2

Analītu koncentrāciju robežas 12. dienas eksperimenta dzīvnieku grupās

Analīts	Noteikto koncentrāciju robežas (vidējā vērtība, vai mediāna) pg/ml	12. dienas eksperimenta dzīvnieku grupas, kurās analīts detektēts
MIP-1 α	2,02 - 11,70	kontrolē, biokontrolē 2, AMPD, biomateriāls 1 un 2
IL-1 β	8,04 - 213,69	kontrolē, biokontrolē 1 un 2, AMPD, biomateriāls 1 un 2
IL-10	3,51 - 125,87	kontrolē, biokontrolē 1 un 2, AMPD, biomateriāls 2
TNF- α	0,90 - 1,55	biokontrolē 1, AMPD, biomateriāls 1
IL-18	15,32 - 377,10	kontrolē, biokontrolē 1, AMPD, biomateriāls 1 un 2

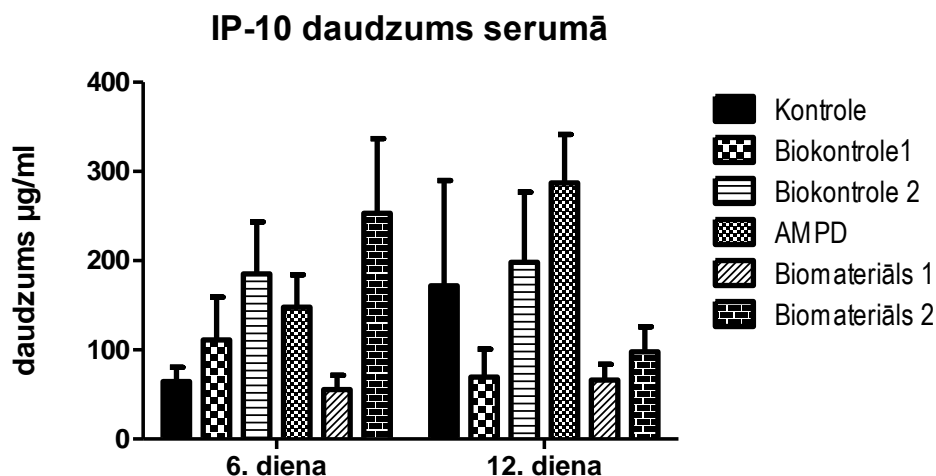
MIP-1 α , iespējams, netika detektēts, jo asins paraugi tika ņemti 6. un 12. dienā, taču to lielākā izdalīšanās parasti tiek fiksēta uzreiz (1. dienā), kad notiek ādas bojājums, kas inducē monocītu un makrofāgu rekrutēšanu uz iekaisuma vietu (Werner et al., 2003, Bryan et al., 2005).

TNF- α un IL-1 β ir iekaisuma citokīni, kas ietekmē vairākus procesus iekaisuma vietā, kā keratinocītu un fibroblastu proliferāciju, sintēzi un ekstracelulāras matricas proteīnu noārdīšanos, fibroblastu hemotaksi un imūnas sistēmas regulāciju (Werner et al., 2003). TNF- α un IL-1 β tika noteikti iepriekš minētajās robežās, taču netika novērotas šo citokīnu

sekrēcijas atšķirības starp grupām. Zemās TNF- α , MIP-1 α un arī IL-1 β koncentrācijas, kā arī tas, ka šie citokīni netika detektēti vispār lielākajā daļā no analizētajiem paraugiem, liecina, ka eksperimenta dzīvniekiem nav sistēmisks iekaisums – ne brūču dzīšanas process, ne arī ārēji aplicētie imunomodulatoru AMPD saturošie biomateriāli neierosina sistēmisku atbildi. Iespējams, ja plazmas paraugi tiktu ievākti citos laika punktos (1-2 dienas pēc brūču izveidošanas), tad iekaisuma citokīnu koncentrācijas būtu augstākas. Tomēr, ņemot vērā, ka 6. un 12. dienā no eksperimenta iegūtajiem plazmas paraugiem nav raksturīgas augstas iekaisuma citokīnu koncentrācijas un arī dzīvnieku uzvedība brūču dzīšanas laikā vērtējama kā normāla, iespējams secināt, ka lokāli ārīgi lietotam imunomodulatoram un to saturošiem biomateriāliem nav sistēmiskas iedarbības. Ja arī, iespējams, neliels sistēmisks iekaisums rodas dzīšanas sākumposmā, tas visticamāk ir dēļ brūces izveidošanas, turklāt kā parāda 6. un 12.dienas citokīnu sekrēcijas analīzes eksperimenta dzīvniekos iekaisuma proteīnu sekrēcija tiek regulēta un sistēmiski tiek uzturēta zemā līmenī.

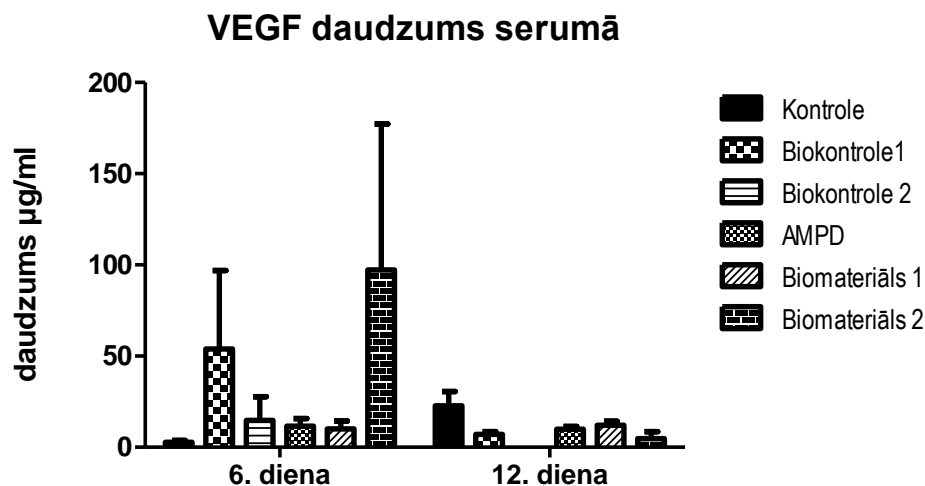
IL-10 ir iekaisuma citokīns, kuram arī ir nozīme iekaisuma procesa regulācijā. Tas regulē imūno šūnu, keratinocītu un endoteliālo šūnu augšanu un diferenciaciju (Werner et al., 2003). Tas netika noteikts visās grupās, bet gan tikai iepriekš norādītajās robežās, kas norāda uz to, ka tas neietekmēja dzīšanas procesu, samazinot makrofāgu un neitrofilu infiltrāciju.

Izteiktāki rezultāti parādījās, nosakot IP-10, kurš ir hemokīns, kas tiek detektēts iekaisuma procesā, piesaisot limfocītus. Var novērot, ka kontroles grupas serumā IP-10 tika konstatēts paaugstināts, salīdzinot sesto ar divpadsmito dienu, jo kontroles grupai, piemēram, salīdzinot ar biomateriāla 2 grupu, netika uzklāta viela, kas stimulētu dzīšanas procesu un audu reepitelizāciju, kas savukārt veicināja IP-10 mediētas iekaisuma reakcijas un, iespējams, traucēja traucētu angiogēnēzi un normālu granulācijas fāzes norisi (skat.3.2.1.attēls). To var novērot arī ar parējām grupām, taču, ja salīdzina AMPD un biomateriāla 1 grupas rezultātus starp dienām, tad var redzēt, ka IP-10 serumā ir paaugstinājies, kas norāda, ka iekaisuma reakcijas joprojām ir ļoti aktīvas, un, iespējams, brūces vidē notiek pastiprināta granulācija. To var izskaidrot ar to, ka žurku fizioloģija ir dažāda un iekaisuma process var būt atšķirīgs neatkarīgi no grupas. Vēl viens skaidrojums varētu būt tas, ka AMPD un kontroles gadījumā brūces vidē netiek nodrošināts optimāls matrikss šūnu migrācijai un jaunu audu veidošanai, līdz ar to arī pats dzīšanas process ir ilgāks. Attiecībā uz IP-10 sekrēciju interesants novērojums ir samazinātā šī citokīna sekrēcija AMPD saturošu biomateriālu gadījumā (biomateriāls 1 un 2), salīdzinot ar šo biomateriālu attiecīgajām kontrolēm un AMPD šķīdumu vēlinājā brūces dzīšanas fāzē – t.i. 12 dienā.



3.1.2.1.attēls IP-10 daudzums plazmā

Vaskulārais endotēlija augšanas faktors (VEGF) sākotnēji tika identificēts kā endotēlija šūnu specifiskais augšanas faktors, kas stimulē angiogēzi un asinsvadu caurlaidību (Byrne et al., 2005). VEGF ir labi zināms kā angiogēns faktors, kas ir svarīgs, lai izveidotos un tiktu uzturēti asinsvadi visos zīdītāju orgānos. Dažādu molekulāro instrumentu un farmakoloģisko aģentu izstrāde, lai selektīvi inhibētu VEGF funkciju un bloķētu angiogēzi, un asinsvadu caurlaidību, ir devusi lielas iespējas, lai ārstētu dažādus audzējus, makulu deģenerācijas un brūču dzīšanas. Tomēr VEGF ir arī nozīmīgs dzīvniekiem, lai regulētu angiogēzi, cilmes šūnu un monocītu / makrofāgu rekrutēšanu, nieru un plaušu barjeras funkciju uzturēšanu un neiroprotekciju. Papildus endotēlija šūnu proliferācijas regulēšanā, migrācijā un šūnu izdzīvošanā, VEGF receptori atrodas arī daudzās ne endotēliālās šūnās, un darbojas caur autokrīna ceļiem, lai regulētu šūnu izdzīvošanu un funkcijas (Breen, 2007). TNF- α , IL-1 β stimulē VEGF ekspresiju keratinocītos un makrofāgos, arī epidermā (Werner et al., 2003), taču atšķirībā no tiem, VEGF tika dektēts visās sešās grupās (skat.3.2.2.attēls). Tas stimulē brūcē angiogēzi. Salīdzinot kontroli ar biomateriāla grupu, var novērot, ka šī citokīna daudzums ir palielinājies, savukārt biomateriāla grupā tas ir krietni samazinājies, kas, iespējams, liecina par to, ka biomateriāla uzklāšana veicināja ātrāku audu un asinsvadu veidošanos izveidotajā brūcē.



3.1.2.2.attēls VEGF daudzums plazmā

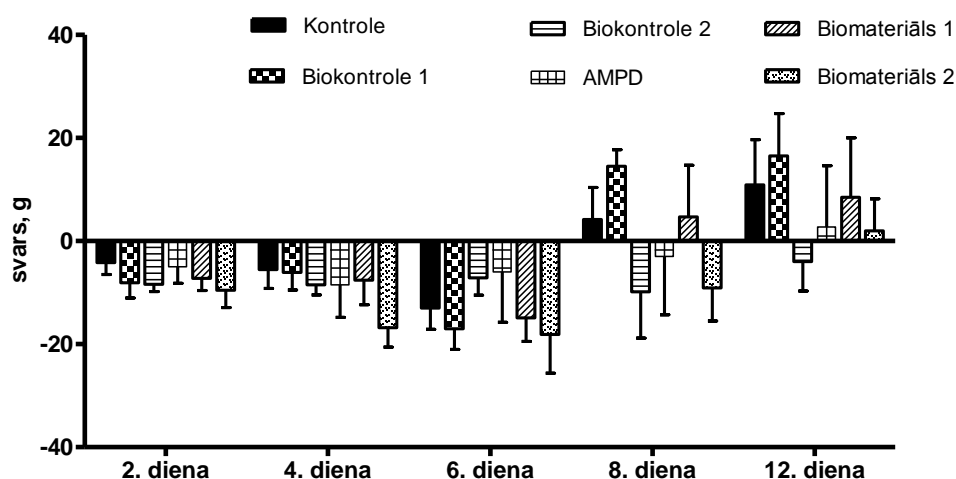
Rezultātā var secināt, ka pētāmās vielas iedarbība uz žurkas organismu nav sistēmiska, kas liecina par to, ka tas ir drošs un neprovocē iekaisumu. Būtiski uzsvērt, ka noteiktu analītu koncentrācijas variēja starp dzīvniekiem grupu ietvaros, kas liecina par konkrēto citokīnu sekrēcijas līmeņu plašajām variācijas robežām grauzējos.

3.1.3. Žurku svara izmaiņas

Pētījuma 2., 4., 6., 8. un 12. dienā žurkas tika svērtas, lai fiksētu svara izmaiņas (skat.3.1.3.1.attēls). Var novērot, ka pētījuma pirmajās dienās svars kritās. Tas izskaidrojams ar to, ka starp otro, ceturto, sesto un astoto dienu bija mazāks laika posms, un žurkas tika pakļautas atkārtotai anestēzijai, kas varēja rast, pirmkārt, stresu, otrkārt, pēc atgūšanās pagāja laiks, līdz tās varēja uzņemt pārtiku. Taču, ja salīdzina astoto ar divpadsmito dienu tad, var novērot, ka žurku svars palielinās.

Apstrādājot rezultātus ar statistisko programmu, netik novērotas atšķirības starp grupām, kas norāda uz to, ka AMPD un HA savienojums neiedarbojas uz organismu sistemātiski, un tā ietekme neizraisa nozīmīgas svara svārstības.

Žurku svara izmaiņas



3.1.3.1.attēls Žurku svara izmaiņas pētījuma gaitā

3.2. Aktīvās vielas akūtas devas metožu analīze C57BL/6 līnijpelēm

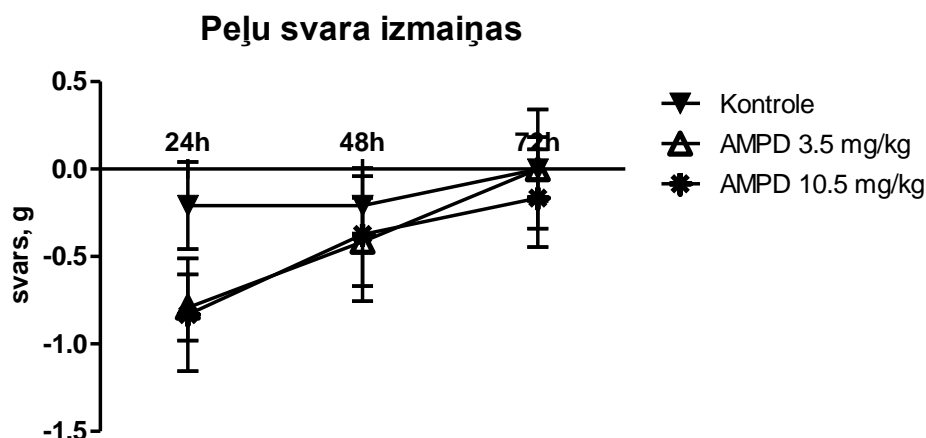
3.2.1. Svara izmaiņas pēc intraperitoneālas aktīvās vielas akūtas devas ievadīšanas

Peles tika sadalītas trīs grupās:

1. kontroles grupa, kurai ievadīja fizioloģisko šķīdumu;
2. AMPD grupa, kurai ievadīja 3,5 mg/kg devā aktīvās vielas;
3. AMPD grupa, kurai ievadīja 10,5 mg/kg devā aktīvās vielas.

Vielas ievadīja intraperitoneāli tilpumā 10 ml/kg. Peles tika svērtas pēc 24, 48 un 72 stundām. Var novērot svara izmaiņas jau pēc 24 stundām visām grupām, taču mazāks kritums ir kontroles grupai (skat.3.2.1.1.attēls). Ja salīdzina aktīvo vielu atšķirības uz svara ietekmi, tad būtisku izmaiņu nav, jo abām AMPD grupām, kurām tika ievadīts 3,5 mg/kg un 10,5 mg/kg aktīvās vielas, svara samazināšanās bija līdzīga. Peles sverot pēc 72 stundām, kontroles un AMPD grupai, kurai tika ievadīta 3,5 mg/kg aktīvās vielas, svars bija tāds pats kā pētījuma sākumā, savukārt AMPD grupai, kurai tika ievadīta 10,5 mg/kg aktīvās vielas, svars mazliet bija samazināts, taču tas neietekmē rezultātu, jo tas bija niecīgs.

Var secināt, ka aktīvā viela neietekmē organismu sistemātiski, par ko liecina, nelielais svara samazinājums. Aktīvās vielas deva vai tā ir 3,5 mg/kg, vai 10,5 mg/kg neizmaina dzīvnieku svaru, kas ir pozitīvs rādītājs, jo rezultātā AMPD ir drošs lietošanā. To apstiprina arī tas, ka statistiski nav atšķirības starp grupām.

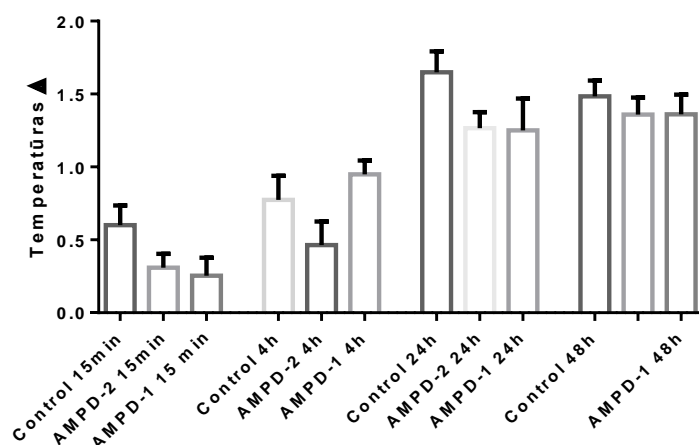


3.2.1.1.attēls Peļu svara izmaiņas 24h, 48h, 72h pēc intraperitoneālas aktīvās vielas akūtās devas ievadīšanas

3.2.2. Temperatūru izmaiņas pēc intraperitoneālas aktīvās vielas akūtās devas ievadīšanas

Pirms vielu ievadīšanas pelēm tika izmērīta rektālā temperatūra. Rektālā temperatūra tika atkārtoti mērīta pēc 15 minūtēm, 4 stundām, 24 stundām, 48 stundām un pēc 72 stundām. Rezultāti liecina, ka temperatūru paaugstinājums nav liels, kas ir pozitīvs rādītājs (skat.3.2.1.2.attēls). Pēc 15 minūtēm kontroles grupas pelēm temperatūra ir vairāk palielinājusies nekā AMPD grupās, taču pēc 4 stundām var novērot arī AMPD-1 grupas pelēm temperatūras palielināšanos. Visu trīs grupu grupu peļu temperatūras izlīdzinās pēc 48 stundām. Šīs nelielās temperatūras svārstības visās grupās varētu tikt attiecināmas kā fizioloģiskas, jo arī kontroles grupā tika novērotas nelielas temperatūras svārstības.

Rezultātā var secināt, ka aktīvās vielas deva neietekmē organisma reakciju ar paaugstinātu temperatūru, kas norāda uz to, ka organisms netiek pakļauts sistemātiskai ietekmei. To apstiprina tas, ka statistiski nav atšķirības starp grupām.



3.2.1.2.attēls Peļu temperatūras izmaiņas 15 minūtes, 4h, 24h, 48h pēc intraperitoneālas aktīvās vielas akūtas devas ievadīšanas, kur kontroles grupai ievadīts fizioloģiskais šķīdums, AMPD-1 grupai ievadīta 3,5 mg/kg devā aktīvā viela un AMPD-2 10,5 mg/kg devā aktīvā viela

3.2.3. Proteīnu sekrēcijas analīžu izvērtējums peļu asins plazmā

Ar ELISA metodes palīdzību tika analizētas TNF- α un IL-1 β koncentrācijas peļu asins plazmā pēc 48 stundām intraperitoneālas aktīvās vielas akūtas devas ievadīšanas un pēc 72 stundām intraperitoneālas aktīvās vielas akūtas devas ievadīšanas.

Rezultāti liecina par to, ka TNF- α un IL-1 β netika detektēti ne pēc 48 stundām, ne 72 stundām. To var skaidrot ar iekaisuma regulācijas īpatnībām grauzējos, kā arī TNF-a un IL-1b koncentrācijas asins plazmā tiek sasniegtas dažu stundu laikā pēc inducēšanas (imūno atbildi izraisošu savienojumu ievadīšanas). Analīti iespējams netika noteikti, jo jau iepriekš pētījumos grauzējos tie netika detektēti tādēļ, ka mēdz atgriezties bazālajā līmenī jau pēc apmēram 6 stundām (Zuckerman et al., 1989).

Var secināt, ka AMPD ievadīšana neizsauc akūtu un ilgstošu iekaisuma reakciju un līdz ar to šis dabīgais imunomodulators ir drošs lietošanā gan lokāli, gan sistēmiski. To pierāda proteīnu sekrēcijas analīžu rezultāti gan pelēm, gan žurkām.

SECINĀJUMI

1. Jau sākot ar ceturto pētījuma dienu biomateriāls 1 (nekroslinkots HA + AMPD) uzrādīja labāku, statistiski ticamu efektu brūču dzīšanas procesā, salīdzinot ar kontroles grupas un pārējo grupu uzrādītajiem rezultātiem. Sākot ar 6., 8. dienu un līdz pētījuma pēdējai 12. dienai gan biomateriāls 1 (nekroslinkots HA + AMPD), gan biomateriāls 2 (kroslinkots un nekroslinkots HA + AMPD) uzrādīja straujāku un statistiski ticamu uzlabojumu brūču dzīšanā, salīdzinot ar kontroles grupas dzīvnieku rezultātiem. Kopumā un pētījumu beigu punktā (12. dienā) abi biomateriāli (1 un 2) uzrāda vienlīdz labu efektivitāti un savstarpēji neatšķiras, ar izņēmumu, ka biomateriāla 1 uzlabojumi parādās jau sākot ar 4. dienu. Iegūtie rezultāti uz brūču dzīšanas procesu apstiprina jaunizveidoto biomateriālu (1 un 2) efektivitāti un progresīvu dinamiku brūču dzīšanas procesos.
2. Pētāmās vielas iedarbība uz žurku organismu nav sistēmiska, jo netika konstatētas nozīmīgas svara izmaiņas 12 dienu pētījuma gaitā.
3. Pēc intraperitoneālas aktīvās vielas akūtas devas ievadīšanas *C57BL/6* līnijpelēm netika konstatētas nozīmīgas svara un temperatūras izmaiņas.
4. Proteīnu (TNF- α , IL-1 β , IL-6, VEGF, IFN γ , IL-10, IL-18, IP-10, MIP-1 α , GRO/KC) sekrēcijas analīžu rezultāti gan žurku, gan peļu plazmā pierāda, ka šis dabīgais imunomodulators ir drošs lietošanā gan lokāli, gan sistēmiski, jo neizraisa iekaisuma reakciju.

LITERATŪRAS AVOTI

1. **Abbade LPF, Lastória S.** Management of patients with venous leg ulcer. *An Bras Dermatol.* 2009 ;81: 509-21.
2. **Thomas AB, Wesley P. Thayer WP.** Debridement of Chronic Wounds: A Review of Past & Present Treatment Strategies. *A review.* 2014; 8.
3. **Aydin A, Shenbagamurthi S, Brem H.** Lower Extremity Ulcers: Venous, Arterial, or Diabetic. *Emergency medicine-emed journal.* 2009; 1:18-24.
4. **Babu MK, Sabbarapu MS, Talasila EGKM.** Design and characterization of natural extracts impregnated collagen based dermal films for wound healing. *Journal of Pharmacy Research.* 2013; 7:727–733.
5. **Barreto R, Ricardo LC, Adriano AS, Jackson RGS. Almeida, Márcio RV, Barreto SAS, DeSantana JM, Pollyana S. Siqueira-Lima SS.** A Systematic Review of the Wound-Healing Effects of Monoterpenes and Iridoid Derivatives. *Journal of Synthetic Organic Chemistry and Natural Product Chemistry.* 2014; 19:846-62.
6. **Borchers AT, Keen CL, Gershwin ME.** Mushrooms, Tumors and Immunity: an update. *Rheumatology, Allergy, and Clinical Immunology minireview.* 2004; 229:393-406.
7. **Bradley M, Cullum N, Nelson EA, Petticrew M, Sheldon T, Torgerson D.** Systematic reviews of wound care management: (2) Dressings and topical agents used in the healing of chronic wounds. *Journal of Health Technology Assessment.* 1999; 3:1-135.
8. **Breen EC.** VEGF in biological control. *Journal of Cell Biochemistry.* 2007; 102:1358-67.
9. **Bryan D, Walker KB, Ferguson M, Thorpe R.** Cytokine gene expression in a murine wound healing model. *A review.* 2005; 31:429-38.
10. **Byrne AM, Bouchier-Hayes DJ, Harmey JH.** Angiogenic and cell survival functions of vascular endothelial growth factor (VEGF). *Journal of Cell Mol Medicine.* 2005; 9:777-94.
11. **Cheredy KK, Régis C, Memvanga PB, Ucakar B, Rieux A, Vandermeulen G, Préat V.** Combined effect of PLGA and curcumin on wound healing activity. *Journal of Controlled Release.* 2013; 1:208-15.

12. **Chunli H, Lei S, Qiang H, Jianhong M, Yangxiao W, Mingcan Y, Wen Z, Li L, Wen C, Chuhong Z.** The effect of heme oxygenase-1 complexed with collagen on MSC performance in the treatment of diabetic ischemic ulcer. *International Journal of Biomaterials*. 2013; 34:112-20.
13. **Coleridge-Smith PD.** Leg ulcer treatment. *Journal of Vascular surgery*. 2009; 49:804-808.
14. **Collins L, Seraj S, Jeffersons T.** Diagnosis and treatment of venous ulcers. *Journal of Am Fam Physician*. 2010; 81:989-996.
15. **Costa V, Brophy J, McGregor M.** Vacuum-assisted wound closure therapy. *A Repor*. 2007; 19: p 24.
16. **Cullum N, Nelson EA, Flemming K, Sheldon T.** Systematic reviews of wound care management: (5) beds; (6) compression; (7) laser therapy, therapeutic ultrasound, electrotherapy and electromagnetic therapy. *Journal of Health Technology Assessment*. 2001; 5:1-221.
17. **Diegelmann RF, Evans MC.** Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Frontiers in Bioscience: a journal and virtual library*. 2004; 1:283-9.
18. **Dinker RP, Simerjit SM.** Techniques in Chronic Wound Management: Review of the Literature and Recent Concepts. *Journal of Novel Physiotheraphies*. 2013; 3:3-7.
19. **Farzaei MH, Shams-Ardekani MR, Abdollahi M, Rahimi R.** A comprehensive review of plants and their active constituents with wound healing activity in traditional Iranian medicine. *A compedium of clinical research and practice*. 2014; 26:197-206.
20. **Federman DG, Ladiiznski B, Dardik A, Kelly M, Shapshak D, Ueno CM, Mostow EN, Richmond NHA, Harriet W.** Guidelines for Arterial Ulcers. *An update of Wound Healing Society*. 2014.
21. **Flecher J, Moffatt C, Partsch H, Vowden K, Vowden P.** Principles of compression in venous disease: A practitioner's guide to treatment and prevention of venous leg ulcers. *Wounds International*. 2013; 24 lpp.
22. **Fonder MA, Lazarus GS, Cowan DA, Aronson-Cook B, BSN, RN, CWOCN, Kohli AR, RN, BSN, Mamelak AJ.** Treating the chronic wound: A practical approach to the care of nonhealing wounds and wound care dressings. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2008; 58:185-206.
23. **Gainza G, Aguirre JJ, Pedraz JL, Hernjndez RM, Igartua M.** rhEGF-loaded PLGA-Alginate microspheres enhance the healing of full-thickness excisional wounds

- in diabetised Wistar rats. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2013; 50:243–252.
24. **Gonsalves CF**. Venous Leg Ulcers. *Journal of Techniques in Vascular and Interventional Radiology*. 2003; 6:132-136.
25. **Greer N, Foman N, Dorrian J, Fitzgerald P, MacDonald R, Rutks I, Wilt T**. Advanced Wound Care Therapies for Non-Healing Diabetic, Venous, and Arterial Ulcers: A Systematic Review. *Annals of Internal Medicine*. 2012; 159:532-540.
26. **Guo S, DiPietro LA**. Factors Affecting Wound Healing. *Journal Dent Res*. 2010; 89:219-229.
27. **Harding KG**. Healing chronic wounds. *Journal BMJ*. 2002; 324:160-163.
28. **Hau CS, Tada Y, Shivata S, Uratsuji H, Asano Y, Sugaya M, Kadono T, Kanda N, Watanave S, Tamaki K, Sato S**. High Calcium, ATP, and Poly(I:C) Augment the Immune Response to β -Glucan in Normal Human Epidermal Keratinocytes. *Journal of Investigative Dermatology*. 2011; 131:2255-62.
29. **Hess CL, Michael AH, Attinger CE**. A Review of Mechanical Adjuncts in Wound Healing: Hydrotherapy, Ultrasound, Negative Pressure Therapy, Hyperbaric Oxygen and Electrostimulation. *Annals of Plastic Surgery*. 2003; 51:210-8.
30. **Hongbo Z, Maibach HI**. Effect of occlusion and semi-occlusion on experimental skin wound healing: a reevaluation. *A compendium of Clinical Research and Practice*. 2007; 19.
31. **Indian J**. Venous ulcer: current concepts. *Indian Journal of Plastic Surgery*. 2011; 44: 109–111.
32. **Jinn TR, Wu CM, Tu WC, Ko JL, Tzen JTC**. Functional expression of FIP-gts, a fungal immunomodulatory protein from *Ganoderma Tsugae* in Sf21 insect cells. *Bioscience, Biotechnology, Biochemistry*. 2006; 70:2627-2634.
33. **Johannessen LN**. Fungal products and inflammatory responses in human monocytes epithelial cells. *Doctoral theses at NTNU*. 2008; 238.
34. **Kim EK, Eui-Ju C**. Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular Basis of Disease*. 2010; 1802:396-405.
35. **Kranke P, Bennett M, Roeckl-Wiedmann I, Debus S**. Hyperbaric oxygen therapy for chronic wounds. *Cochrane Database of Systematic reviews*. 2006; 1:1-30.
36. **Kujath P, Michelsen A**. Wounds – from physiology to wound dressings. *Deutsches Arzteblatt Journal*. 2008; 105:239–248.

37. **Kuogias P, Wei D, Rice PJ, Ensley HE, Kalbfleisch J, Williams DL, Browder IW.** Normal Human Fibroblasts Express Pattern Recognition Receptors for Fungal. *Glucans Infection and Immunity*. 2001; 69:3933-3938.
38. **Lau TW, Lam FFY, Lau KM, Chan YW, Lee KM, Sahota DS, Ho YY, Fung KP, Leung PC, Lau CBS.** Pharmacological investigation on the wound healing effects of Radix Rehmanniae in an animal model of diabetic foot ulcer. *Journal of Ethnopharmacology*. 2009; 123:155-62.
39. **Lima AF, Livia BC, Silva JL, Maia MBS, Ximenes ECPA.** Interventions for wound healing among diabetic patients infected with Staphylococcus aureus: a systematic review. *Sao Paulo Medicine journal*. 2011; 129:165-170.
40. **Losi P, Briganti E, Errico C, Lisella A, Sanguinetti E, Chiellini F.** Fibrin-based scaffold incorporating VEGF- and bFGF-loaded nanoparticles stimulates wound healing in diabetic mice. *Journal of Acta Biomaterialia*. 2013; 9:7814-21.
41. **Margolis DJ, Morris LM, Papadopoulos M, Weinberg L, Filip JC, Lan AS, Vaikunth SS, Crombleholme TM.** Phase I Study of H5.020CMV.PDGF- β to Treat Venous Leg Ulcer Diseases. *Journal of Molecular Therapy*. 2009; 17:1822–1829.
42. **Masoko P, Picard J, Eloff JN.** The use of a rat model to evaluate the in vivo toxicity and wound healing activity of selected Combretum and Terminalia (Combretaceae) species extracts. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*. 2010; 77:2,7.
43. **Mekkes JR, Loots MAM, Van Der Wal AC, Bos JD.** Causes, investigation and treatment of leg ulceration. *British journal of dermatology*. 2003; 148:388-401.
44. **Morley S.** Management of chronic venous leg ulcers. *A national (scottish) clinical guideline*. 2010; 120 lpp.
45. **Moura LIF, Dias AMA, Leal EC, Carvalho L, Sousa HC, Carvalho E.** Chitosan-based dressings loaded with neurotensin—an efficient strategy to improve early diabetic wound healing. *Journal of Acta Biomaterialia*. 2014; 10:843–857.
46. **Moura LIF, Dias AMA, Leal EC, Carvalho L, Sousa HC, Carvalho E.** Neurotensin-loaded collagen dressings reduce inflammation and improve wound healing in diabetic mice. *Journal of Acta Biomaterialia*. 2014; 1842:32-43.
47. **Murphy PS, Evans GRD.** Advances in Wound Healing: A Review of Current Wound Healing Products. *Plastic Surgery International Article*. 2012; 2012:8 lpp.
48. **Münter C, Sibbald G, Price P, van der Werven Wilma R.** Diabetic foot ulcers – prevention and treatment. *A Coloplast quick guide*. 2012; 1-17 lpp.

49. **Nelson EA, Bradley MD.** Dressings and topical agents for arterial leg ulcers. *The Cochrane Library review.* 2009; 3:1-26 lpp.
50. **Nikolajeva V., Eze D., Kamradze A., Indulena M., Muiznieks I.** Protective effect of adenylate deaminase (from *Penicillium lanoso-viride*) against acute infections in mice. *Immunopharmacology.* 1996; 35:163-169.
51. **Nikolajeva V., Eze D., Petrina Z., Muiznieks I.** Treatment of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis with adenylate deaminase from *Penicillium lanoso viride*. *Journal of Autoimmunity.* 2000; 14:107-113.
52. **Nikolajeva V, Eze D, Artjuha M, Mikažāns I, Petriņa Z, Antonoviča L, Babarikins D, Muižnieks I.** Treatment of skin ulcers with adenylate deaminase, a glycoprotein from microscopic fungus *Penicillium lanoso-viride*. *Journal of Acta Universitatis Latviensis.* 2009; 753:69–79.
53. **Palfreyman SJ, Lochiel R, Michaels JA.** A systematic review of compression therapy for venozus leg ulcers. *Journal of Vascular Medicine.* 1998; 3:301–313.
54. **Park Nanj DPM; Latricia Allen, DPM, MPH; Mary Nametka, MSN, RN, CWS, CWON, FNP-BC; Vickie R. Driver, MS, DPM, FACFAS.** Healing hypoxic wounds: fighting an uphill battle. *LER.* 2014.
55. **Parnés A, Lagan KM.** Larval Therapy in Wound Management: A Review. *International Journal of Clinical Practice.* 2007; 61:488-493.
56. **Prakash S, Kumar TS, Manjaree M, Kumar KA.** Venous Ulcer: Review Article. *Surgical Science.* 2013; 4:144-150.
57. **Proksch E, Brandner JM, Jensen JM.** The skin: an indispensable barrier. *Journal of experimental dermatology.* 2008; 17:1063-72.
58. **Puri V, Venkateshwaran N, Khare N.** Trophic ulcers-Practical management guidelines. *Indian Journal of Plastic Surgery.* 2012; 45:340-351.
59. **Rayner R, Carville K, Keaton J, Prentice J, Santamaria N.** Leg ulcers: atypical presentations and associated Comorbidities. *Wound practice and research.* 2009; 17:168-185.
60. **Singer A, Clark R.** Cutaneous wound healing. *The New England Journal of Medicine.* September 2, 1999; 341:738-746.
61. **Singh S, Dinker R, Chew Y.** Diabetic Foot Ulcer – Diagnosis and Management. *Clinical research on foot and ankle, an open access journal.* 2013; 1:1-9.
62. **Snyder DL, Sullivan N, Schoelles KM, S.M.** Skin Substitutes for Treating Chronic Wounds. *Technology Assessment Report.* 2012; 1-203 lpp.

63. **Son HJ, Han DW, Baek HS, Lim HR, Lee MH, Woo YI, Park JC.** Stimulated TNF- α release in macrophage and enhanced migration of dermal fibroblast by β -glucan. *Journal of Current Applied Physics*. 2007; 7:33-36.
64. **Sugumar S, Vijayalakshmi G, Nirmala MJ, Mukherjee A, Chandrasekaran N.** Ultrasonic emulsification of eucalyptus oil nanoemulsion: Antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* and wound healing activity in Wistar rats. *Ultrasonics Sonochemistry*. 2014; 21:1044–1049.
65. **Suvarna K, Munira.** Wound healing process and wound care dressing: a detailed review. *Journal of Pharma Research*. 2013; 2:6-12.
66. **Swezey L.** A Review of Recent Advances in Wound Care. *Indian Journal of Plastic Surgery*. 2012; 45:379–387.
67. **Tellechea A, Leal E, Veves A, Carvalho E.** Inflammatory and Angiogenic Abnormalities in Diabetic Wound Healing: Role of Neuropeptides and Therapeutic Perspectives. *The Open Circulation and Vascular Journal*. 2010; 3:43-55.
68. **Thackham JA, McElwain S, Long RJ.** The use of hyperbaric oxygen therapy to treat chronic wounds: A review. *The International journal of Tissue repair and regeneration*. 2008; 16:321-330.
69. **Thora S.** Venozās trofiskas čūlas ārstēšana. *Žurnāls ārstiem un farmaceitiem*. 2007; 8:4-11.
70. **Tuttle MS.** Association Between Microbial Bioburden and Healing Outcomes in Venous Leg Ulcers: A Review of the Evidence. *Journal of Advanced Wound Care*. 2015; 4:1-11.
71. **Wang W, Shaoqiang L, Yechen X, Yadong H, Yi T, Lu C, Xiaokun L.** Acceleration of diabetic wound healing with chitosan-crosslinked collagen sponge containing recombinant human acidic fibroblast growth factor in healing-impaired STZ diabetic rats. *Life Sciences*. 2008; 82:190–204.
72. **Wei D, Zhang L, Williams DL, Browder IW.** Glucan stimulates human dermal fibroblast collagen biosynthesis through a nuclear factor-1 dependent mechanism. *Wound Repair Regen*. 2002; 10:161-8.
73. **Werner S, Grose R.** Regulation of wound healing by growth factors and cytokins. A review. 2003; 83:835–870.
74. **White R, McIntosh C.** Topical therapies for diabetic foot ulcers: standard treatments. *Journal of wound care*. 2008; 17:428-32.

75. **Xie Z, Paras CB, Weng H, Punnakitikashem P, Su LC, Vu K, Tang L, Yang J, Nguyen KT.** Dual growth factor releasing multi-functional nanofibers for wound healing. *Journal of Acta Biomaterialia*. 2013; 9:9351–9359.
76. **Xin H, Yaqing Z, Xiangmei Z, Ling X, Xin C, ShichengWei.** Influence of radiation crosslinked carboxymethyl-chitosan/gelatin hydrogel on cutaneous wound healing. *Journal of Materials Science and Engineering C*. 2013; 33:4816–4824.
77. **Zenilman J, Valle F, Malas BM, Maruthur N, Wilson LM, Haberl EB, Bass EB, Lazarus G.** Chronic Venous Ulcers: A Comparative Effectiveness Review of Treatment Modalities. *A review*. 2013; 13:1-306.
78. **Zuckerman SH, Bendele AM.** Regulation of serum tumor necrosis factor in glucocorticoid-sensitive and resistant rodent endotoxin shock models. *Journal of Infection and Immunity*. 1989; 57: 3009–3013.
79. **Zulli F, Suter F.** Improving skin function with CM-glucan, a biological response modifier from yeast. *International Journal of Cosmetic Science*. 1998; 20:79-86.

PATEICĪBAS

Es vēlētos izteikt vislielāko paldies mana darba vādītājam, Latvijas Universitātes Medicīnas fakultātes farmakoloģijas katedras asociētajai profesorei, Baibai Jansonei par sniegto atbalstu, noderīgām konsultācijām, idejām un palīdzību maģistra darba tapšanas procesā, kā arī esmu ļoti pateicīga par iespēju redzēt un pašai piedalīties *in vivo* veiktā pētījumā, kas deva ne tikai daudz noderīgu zināšanu, pieredzi, bet arī pavēra jaunu skatu uz pētniecību. Izsaku vēl atsevišķu paldies par novadītajām lekcijām, jo to nozīme ir un paliks ļoti liela manai tālākai izaugsmes attīstībai.

Liels paldies arī Latvijas Universitātes Bioloģijas fakultātes mikrobioloģijas un biotehnoloģijas katedras pētniecei Annai Ramatai-Stundai un pētniekam Mārtiņam Borodušķim par sniegto palīdzību jaunu tehnoloģiju apgūšanā, informācijas dalīšanos un iespēju pašai veikt pētījumam nozīmīgus laboratorijas testus.

Izsaku paldies arī visiem Latvijas Universitātes Medicīnas fakultātes farmācijas programmas profesoriem, docentiem un pasniedzējiem par ieguldīto darbu un pacietību studentu zināšanu attīstībai, kā arī atsevišķs paldies lietvedei Jutai Bārtulei par atsaucību un vienmēr laicīgu informācijas sniegšanu studentiem visu piecu studiju gadu garumā.

DOKUMENTĀRĀ LAPA

Maģistradarbs _____

_____” izstrādāts LU Medicīnas fakultātē.

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

Autors: _____

(vārds, uzvārds)

(paraksts)

Rekomendēju/nerekomendēju darbu aizstāvēšanai

Vadītāja: _____

(amats, vārds, uzvārds, grāds)

(paraksts)

(datums)

Recenzents: _____

(amats, vārds, uzvārds, grāds)

(paraksts)

(datums)

Darbs iesniegts LU Medicīnas fakultātē _____

(datums)

Vecākā lietvede Juta Bārtule _____

(paraksts)

Maģistra darbs aizstāvēts maģistra studiju programmas „Farmācija” Maģistra gala pārbaudījuma komisijas sēdē _____2015., prot. Nr. _____.

Komisijas sekretāre: _____

(amats, vārds, uzvārds, grāds)

(paraksts)