

LATVIJAS UNIVERSITĀTE
MEDICĪNAS FAKULTĀTE
FARMĀCIJAS MAĢISTRA STUDIJU PROGRAMMA

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

MAĢISTRA DARBS

Autors: **Joanna Jeņina**

Stud.apl.: jj11039

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

RĪGA 2016

ANOTĀCIJA

Hronisko brūču dzīšana ir viena no aktuālākajām tēmām medicīnas nozarē, un tādēļ ir nepieciešams izstrādāt jaunus materiālus un aktīvās vielas, kuri būtu efektīvāki un ātrāki hronisko brūču aprūpes risinājumos.

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

Iegūtie rezultāti diabētisko brūču dzīšanas procesā parāda, ka jau sākot ar pētījuma otro dienu, salīdzinot ar kontroles grupu, diviem jaunizveidotiem biomateriāliem ir progresīva un efektīva diabētisko brūču dzīšana. Dabīgais imunomodulators uzrādīja drošus rezultātus akūtas toksicitātes novērtējumā pelēm pēc lielu devu ievadīšanas, tā neizsauca iekaisuma reakciju.

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

SUMMARY

Diabetic wound healing is one of the most popular subjects in the medical field, and it is therefore necessary to develop new materials and active substances which should be more efficient and faster in diabetic wound care.

In research study were evaluated two newly developed biomaterials (with natural immunomodulators glycoprotein functionalized hyaluronic acid), effectiveness of diabetic wound healing processes in *Wistar* male rats and detection of acute toxicity in *ICR* male mice.

The results in diabetic wound healing showed that starting from the second day of study, comparing with control group, two newly developed biomaterials have been progressive and effective in diabetic wound healing. Natural immunomodulators showed reliable results for acute toxicity assessment in mice at high doses, because it caused no inflammatory reaction.

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

SATURS

| | |
|--|----|
| ANOTĀCIJA | 2 |
| APZĪMĒJUMU SARAKSTS | 7 |
| IEVADS | 8 |
| 1. LITERATŪRAS APSKATS | 10 |
| 1.1. Brūču dzīšanas process | 10 |
| 1.2. Hroniskas ādas čūlas un to veidi | 13 |
| 1.2.1. Arteriālās čūlas s..... | 13 |
| 1.2.2. Venozās čūlas | 14 |
| 1.2.3. Diabētiskās čūlas | 15 |
| 1.2.4. Neurotrofiskās čūlas | 16 |
| 1.3. Standarta terapija..... | 18 |
| 1.4. Citas brūču kopšanas terapijas | 20 |
| 1.4.1. Adenalīta diamināze un tšd iedarbība..... | 22 |
| 2. MATERIĀLI UN METODEDES | 23 |
| 2.1. Izmēģinājma dzīvnieki | 23 |
| 2.2. Eksperimentā izmantotās vielas | 23 |
| 2.3. Eksperimenta gaita 1: diabēta brūču modelī žurkām | 24 |
| 2.3.1. Eksperimentālās grupas diabēta brūču modelī žurkām | 25 |
| 2.3.2. Diabēta eksperimentāla izraisīšana un glikozes kontroles noteikšanas <i>Wistar</i> līnijas žurkām | 25 |

| | |
|---|----|
| 2.3.3. Brūču izveidošanas operācija un vielu uzklāšana | 26 |
| 2.3.4. Aktīvās vielas atkārtota uzklāšana..... | 26 |
| 2.3.5. Brūču dzīšanas dinamikas izvērtējums ar <i>ImageJ</i> programmu | 27 |
| 2.3.6. Eitanāzija un ādas biopsijas paraugu paņemšana | 27 |
| 2.3.7. Diabētisko brūču eksudātu iegūšana | 27 |
| 2.3.8. ELISA metode | 28 |
| 2.3.9. Multipleks metode | 28 |
| 2.4. Eksperimenta gaita 2: akūtas devas iedarbība uz pelēm pēc vielu i.v.ievadīšanas | 29 |
| 2.4.1. Eksperimentālās grupas pelēm akūtas toksicitātes noteikšanā | 29 |
| 2.4.2. Rektālās temperatūras mērīšana un AMPD divu atšķirīgu koncentrācijas i.v. ievadīšana | 30 |
| 2.4.3. Eitanāzija un asins paraugu paņemšana | 30 |
| 2.4.4. Datu apstrāde un statistiskā analīze | 30 |
| 3. REZULTĀTI UN DISKUSIJA..... | 31 |
| 3.1. Metožu analīze <i>Wistar</i> līnijas žurkām..... | 31 |
| 3.1.1. Attēlu analīze, lai noteiktu brūču dzīšanas dinamiku | 31 |
| 3.1.2 Žurku svara izmaiņas..... | 35 |
| 3.1.3. Augšanas faktora CTGF sekrēcija diabētisko brūču eksudātos..... | 36 |
| 3.1.4. Proteīnu sekrēcijas analīžu izvērtējums žurku plazmā..... | 37 |
| 3.2. Aktīvās vielas akūtas devas metožu analīze <i>ICR</i> pelēm | 39 |
| 3.2.1. Rektālās temperatūra un ķermeņa svara izmaiņas pēc i.v. aktīvās vielas akūtas devas ievadīšanas..... | 39 |

| | |
|---|----|
| 3.2.2. Ietekme uz limfocītu un neitrofilu skaitu | 41 |
| 3.2.3. Izmaiņas citokīnu līmenī peļu asins plazmā pē 4h, 8h un 24h pēc AMPD i.v. | 42 |
| SECINĀJUMI..... | 44 |
| LITERATŪRAS AVOTI..... | 46 |
| PATEICĪBAS | 49 |
| PIELIKUMI | 50 |

APZĪMĒJUMU SARAKSTS

- ABI** – potītes-pleca artērijas spiediena indekss
- AMPD** – adenozīna monofosfāta dezamināze
- CSF-1** – koloniju stimulējošais faktors 1
- CTGF** - saistaudu augšanas faktors
- G-CSF** – granulocītu koloniju stimulējošais faktors
- ECM** – ekstracelulārā matrica
- ELISA** – ar enzīmiem saistītā imunosorbentā pārbaude
- ES** – Eiropas Savienība
- FGF** – fibroblastu augšanas faktors
- HA** – hialuronskābe
- IL-6** – interleikīns 6
- I.P.** – intraperitoneāli
- I.V.** – intravenozi
- MCP-1** monocītu hemotaktiskais proteīns-1
- MMP** – matricas metalloproteināzes
- O₂** – skābeklis
- PAS** – perifēro artēriju slimības
- PBS** – fosfātu buferšķīdums
- PDGF** – trombocītu augšanas faktors
- TGF- β** – transformējošais augšanas faktors β
- TNF- α** – tumornekrozes faktors α
- Tris** – trishidroksimetilaminometāns
- VEGF** – vaskulārais endoteliālais augšanas faktors

IEVADS

Balstoties uz Starptautisko Diabētu Federācijas datiem, šobrīd pasaulē ir ap 382 miljonu cilvēku, kas slimo ar diabētu. Pacienti ar cukura diabētu ir ap 15%-25% lielāks risks iegūt dzīves laikā diabetiskās pēdas čūlu savas dzīves laikā un tuvāko 5 gadu laikā recidīvu skaits var sasniegt 50%-70% (Boulton, 2010).

Standarta diabetiskās pēdu čūlu aprūpe ietver sistēmisku glikozes kontroli, atbilstošas apasiņošanas nodrošināšana, infekcijas kontrole, lokālo brūču aprūpe ar pārsējiem un pacientu izglītošana, visu to uzrauga multidisciplināra komanda. Neskatoties uz to, pat ar labāko standarta aprūpi, tikai 24-30% no diabētiskām pēdu čūlām sadzīst 12 līdz 20 nedēļu laikā (Margolis et al., 1999). Pētījumā, kurā tika iesaistīti Eiropas specializētie pēdu centri, neskatoties uz intensīvu ārstēšanu, 23 % no pacientiem ar cukura diabētu un pēdu čūlu zaudēja vismaz daļu no savas pēdas, (Schaper, 2012).

Lai sekmīgi ārstētu diabētisko pēdu čūlu, ir nepieciešams novērst un mazināt pēdu traumatizāciju, išēmiju un infekciju. Ir nepieciešama vienota pēc kuras vadiitos un strikta diabētisko pēdu čūlas aprūpes protokola ieviešana, kas iekļauj arī revaskularizāciju, palīdz un veicina hronisku čūlu sadzīšanu 75% pacientu un novērš kāju amputāciju 83% pacientu (Carrington et al., 2003).

Diabētisko brūču ārstēšana ir laikietilpīgs process, tiek novēroti līdz pat 75 % ilgstošāki dzīšanas traucējumi.

Neskatoties uz to, ka pēdējo 10 gadu laikā ir palielinājies pieejamo medikamentu un pārsienamo materiālu piedāvājums, diemžēl ārstēšanas efektivitāte nav sasniegusi vēlamo rezultātu, tādēļ ir pieprasījums pēc jauniem efektīviem terapijas līdzekļiem.

Maģistra darbs ir izstrādāts 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”. Projekta galvenais mērķis ir izstrādāt jaunu medicīnas ierīci, kombinējot biodegradējamu materiālu ar imūno atbildi modulējošu glikoproteīnu, lai, regulējot lokālo iekaisumu un veicinot reepitelizāciju, saīsinātu hronisko brūču dzīšanas laiku.

Darba mērķis

Maģistra darba mērķis ir izvērtēt uz hialuronskābes bāzes veidotu funkcionalizētu divu atšķirīgu biomateriālu efektivitāti diabētisko brūču dzīšanas procesos *Wistar līnijas* žurku tēviņiem, un veikt akūtas toksicitātes izvērtēšanu pēc vielu i/v ievadīšanas *ICR* peļu tēviņiem.

Mērķa īstenošanai izvirzīja šādus darba uzdevumus:

1. inducēt diabētu *Wistar līnijas* žurku tēviņiem un veikt brūču operācijas, noteikt glikozes rādītājus, aplicēt eksperimentātās vielas un veikt brūču fotografēšanu un analizēt iegūtos datus;
2. noteikt G-CSF un VEGF koncentrāciju brūču dzīšanas procesa 6.dienā un 12.dienā;
3. analizēt brūču eksudātos CTGF koncentrāciju;
4. veikt izmantotā glikoproteīna (AMPD) akūtas devas toksicitātes noteikšanu pelēm pēc i/v;
5. noteikt IL-6 un TNF- α sekrēcijas analīzi pelēm pēc intravenozas aktīvās vielas akūtās devas ievadīšanas;
6. noteikt limfocītu un neitrofilu skaita izmaiņas peļu asins plazmā.

1. LITERATŪRAS APSKATS

1.1. Brūču dzīšanas process

Brūču dzīšana ir sarežģīts process, kas ietver šķīstošo mediatoru, asins šūnu, ekstracelulārās matricēs (ECM) un parenhīmas šūnu vienlaicīgu aktivizēšanu. Šo procesu var iedalīt vairākos posmos: homeostāze/ koagulācija, iekaisums, proliferācija (granulācijas audu veidošanās), reepitalizācija un remodelēšana (Enoch, Leaper, 2008; Li *et al.*, 2007).

Šīs fāzes parasti nav ar laiku ierobežotas un var pārklāties (Falanga, 2005). Pāreja starp fāzēm ir atkarīga no keratinocītu, fibroblastu, tuklo šūnu un makrofāgu nobriešanas un diferenciācijas, kuras ir vissvarīgās iesaistītās šūnas brūces dzīšanas procesā (Rodero, Khosrotehrani, 2010).

Pēc audu traumas fibrīna korķis veidojas, lai atjaunotu homeostāzi, un agregētie trombocīti sekretē vairākus augšanas faktoros un citokīnus (piemēram, transformējošo augšanas faktoru beta (TGF- β) un monocītu hemotaktisko (hemoatraktanto) proteīnu (MCP-1), kuri piesaista neitrofilus un monocītus brūču vietās. Šīs iekaisuma šūnas inducē koloniju stimulējošo faktora 1 (CSF-1), tumora nekrozes faktora α (TNF- α) un asins plātnišu veidotā augšanas faktora (PDGF) ekspresijas, kurš ir ļoti svarīgi jaunu audu veidošanās procesa pirmajā posmā (Wilgus, 2008; Tsirogianni *et al.*, 2006).

Reepitalizācija parasti sākas dažas stundas pēc ievainojuma. Reaģējot uz šiem augšanas faktoriem, keratinocīti un aktivētie fibroblasti migrē no brūces malām uz bojāto vietu, kur tie strauji proliferē un izveido ECM, kas uzlabo brūču slēgšanu (Silva *et al.*, 2010; Enoch *et al.*, 2008). Sakotnējo ECM pakāpeniski aizstāj kolagēna matrica ar jaunu asinsvadu veidošanos (angioģenēze) (Singer *et al.*, 1999). Angioģenētie faktori, piemēram, kā fibroblastu augšanas faktors (FGF), vaskulārā endotēlija augšanas faktors (VEGF) un PDGF inducē angioģenēzi, stimulējot fibroblastu un VEGF ražošanu ar makrofāgiem un endotēlija šūnām (Wilgus, 2008; Schreml *et al.*, 2006). Proteāzes ekspresija un aktivitāte arī nepieciešami, lai notiktu angioģenēzes process (Schreml *et al.*, 2010).

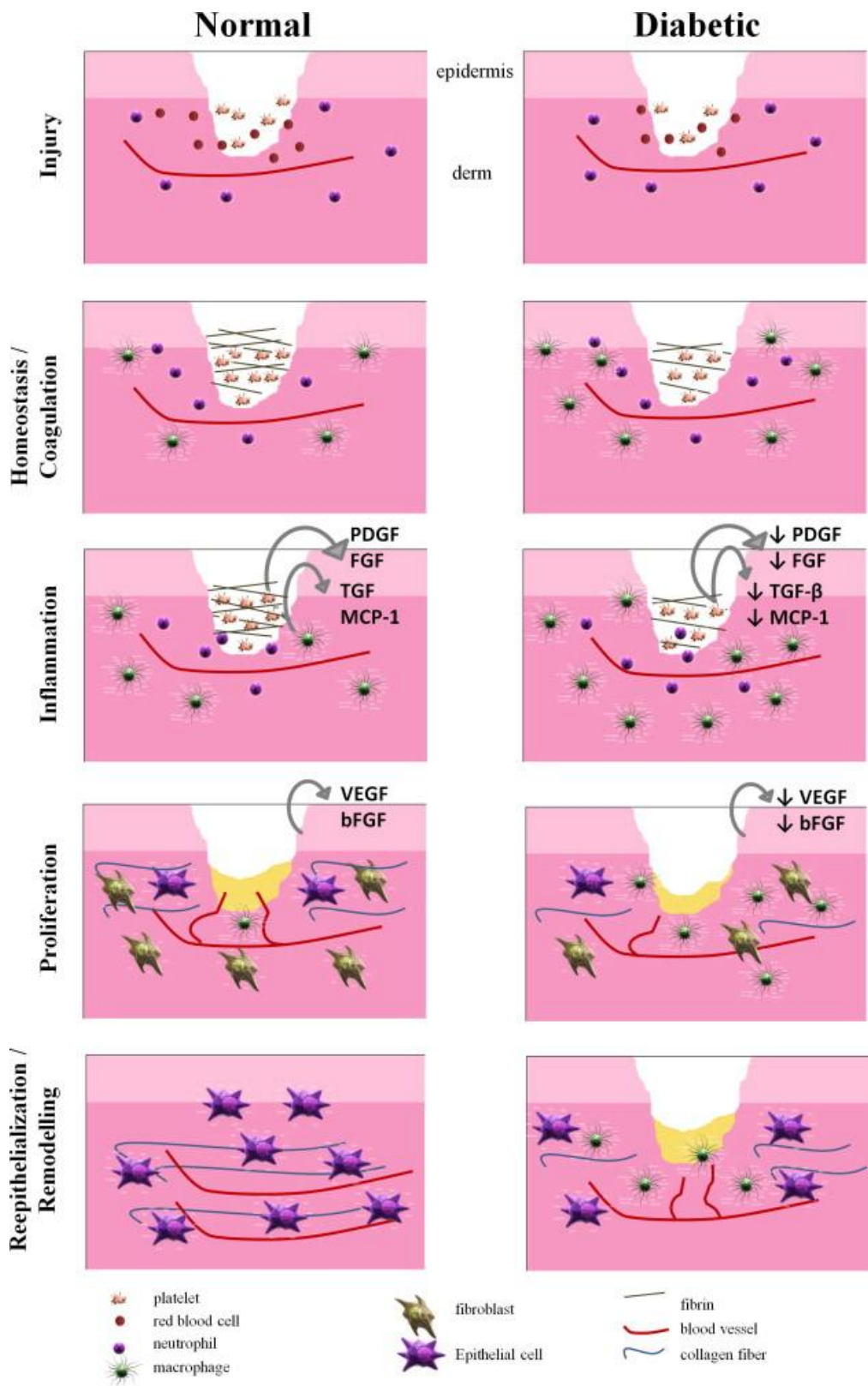
Kad brūces laukums ir pilnīgi aizpildīts ar jauniem granulācijas audiem, angioģenēze apstājas un sākas apoptoze. Pēdējo posmu brūces dzīšanas procesu raksturo iepriekš izveidoto granulācijas audu deģenerācija un dermas atjaunošanās (Rodero *et al.*, 2010)

Diabētiskā neiropātija un perifēro asinsvadu slimības parasti ir galvenie faktori, kas izraisa diabētiskās pēdu čūlas. Šie divi faktori var darboties atsevišķi vai kopā, kā arī kombinācijā ar

citiem kritērijiem, piemēram, kā mikrovaskulārās slimības, biomehāniskās novirzes, ierobežota locītavu mobilitāte un paaugstināta jutība pret infekciju (Rathur *et al.*, 2005 ;Bloulton, 2005; Snyder *et al.*, 2009).

Dažos pētījumos ir minēts, ka grūtības ar diabētisko pēdu čūlas dzīšanu ir galvenokārt saistītas ar pārmērīgu vai pastāvīgu matricisa metalloproteināžu darbību (MMP) vai arī sakarā ar zemo MMP inhibitoru līmeņiem (Lobmann *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2009).

Turklāt išēmijas un asinsvadu slimības, samazināta skābekļa un barības vielu piegādes samazina dzīšanas spējas (Acosta *et al.*, 2008; Blakytyn *et al.*, 2009). Šīs problēmas ir galvenokārt saistītas ar augšanas un angiogēno faktoru traucētu ekspresiju, proti, VEGF un PDGF (Bloomgarden, 2008). Iespējamās arī slāpekļa oksīda anomālijas, kolagēna akumulācija, keratonicītu un fibroblastu anormāla migrācija un proliferācija, kā arī ECM komponentu akumulācija un to remodelēšana ar MMP (Brem, *et al.*, 2007; Muller *et al.*, 2008). Zemāk var apskatīt bildi, kurā ir attēloti posmi un augšanas faktori, kas ir iesaistīti diabētiskās brūces dzīšanas procesā, salīdzinot ar parasto brūci.



1.1.1.attēls. Atšķirības starp parasto un diabētisko brūci dzīšanas posmos (Beanes *et al.*, 2003)

1.2. Hroniskās ādas čūlas un to veidi

1.2.1. Arteriālās čūlas

Čūlas, kuras saistītas ar perifēro artēriju slimību, bieži pazīstamas kā išēmiskas čūlas, veido aptuveni 10 % no apakšējo ekstremitāšu čūlām (Spentzouris *et al.*, 2009). Šis čūlu veids attīstās ar arteriālo oklūziju, kas ierobežo asins apgādi un kas rezultējas išēmijā un audu nekrozē.

Šī oklūzija ir visbiežāk no aterosklerozes, tāpēc galvenie riska faktori išēmiskām čūlām ir tādi paši kā perifēro artēriju slimības (PAS) gadījumā: smēķēšana, diabēts, hiperlipidēmija un hipertensija (Spentzouris *et al.*, 2009). Līdzīgi situācija pacientiem ar išēmiskām čūlām - sūdzās par PAS saistītiem simptomiem, piemēram, mijklibošana vai sāpes, kas turpinās neskatoties uz kājas pacēlumu. Citas pazīmes: samazināta ekstremitāšu perfūzija var būt arī, piemēram, spīdīgs, atrofisks ādas izskats, samazināts kāju apmatojums, aukstas kājas un distrofiski nagi (Ayello, 2005).

Išēmiskas čūlas ir saistītas ar sliktu perfūziju, tās parasti parādās dažādās distālās vietās (piemēram, pirkstu galos) vai zonās ar paaugstinātu spiedienu (piemēram, uz kaula izciļņa). Šīs sāpīgas čūlas bieži ir neierobežotas, dziļi bojātas. Išēmisko čūlu kopšana ir centrēta uz asinsrites atjaunošanu un samazinātu turpmāko perfūziju zaudēšanu. Ar smagu išēmiju primārās metodes ir asinsvadu ķirurģija un dzīvesveida izmaiņas. Ir svarīgi izvairīties no ārstēšanas ar mehānisko kompresiju. ja arteriālā oklūzija ir iemesls, kādēļ attīstās čūla, jo tas noved pie audu išēmijas pasliktināšanos un nekrozes (Ayello, 2005).



1.2.2.1. attēls Arteriālās čūlas (Spentzouris *et al.*, 2009)

1.2.2. Venozās čūlas

Visbiežākais iemesls apakšējo ekstremitāšu čūlām ir vēnu mazspēja. Tās veido 70-90% no kāju čūlu. Čūlas attīstās venozās hipertenzijas apstākļos, paaugstinātu asinsspiedienu parasti izraisa vārstu nekompence, kā rezultātā nonāk pie neefektīvas venozo asiņu atgriešanās muskuļu saraušanās laikā. Noslogotie vadi un asins apvienošana izraisa palielinātu asinsvadu caurlaidību. Ūdens, proteīni un sarkanās asins šūnas noplūst intersticiālā telpā un fibrīna nogulsnešanās notiek. Tas rada simptomus kā kāju tūska, hiperpigmentācija (no sarkano asins šūnu ekstravazācijas un hemosiderīna palielinājuma), un lipodermoskleroze (Sen, 2009).



1.2.2.1. attēls **Venozās čūlas** (Sen, 2009)

1.2.3. Diabētiskās čūlas

Aptuveni 15% - 25 % cilvēkiem ar diabētu attīstās pēdu čūlas, un apmēram 12% no šiem pacientiem ir nepieciešama apakšējo ekstremitāšu amputācija (Sen *et al.*, 2008). Diabētiskās pēdas čūlas veido gandrīz 2/3 no visam netraumatiskām amputācijām (Ayello, 2005).

Čūlu dzīšanu apgrūtina diabētiskā neiropātija, samazināta celulārā sintēze un jūtīgums pret infekcijām. Neiropātiju var kategorizēt kā sensoro (aizsardzības sajūtas zudums), motorā (pēdas anatomiskā uzbūve deformējas viedojot teritorijas, kur spiediens no slikti piegulošiem apaviem var radīt čūlas) vai autonomā (sviedru dziedzeru denervācija, kā rezultātā āda kļūst sausa un veidojas plaisas, predisponējot pēdu dažādām infekcijām, utt.) (Spentzouris *et al.*, 2009; Ayello, 2005).

Diabēta čūlas parasti atrodas uz pēdas plantārajā virsmā, pāri metatarsālai daļai, vai zem papēža (Hess, 2011). Čūlu raksturo arī brūču robežas, dziļa brūču gulta vai pamata osteomielīts, granulācijas audi (ja vien perifēro vaskulārā slimība arī ir klāt), un zema līdz vidēja drenāža (Hess, 2011). Pacientiem ir jāveic pilna veselības stāvokļa pārbaude - klibuma vai ekstremitātes sāpes miera stāvoklī, samazināti vai neesoši pulsi, aukstā temperatūra, bālums, potītes-plecu indekss (ABI), neskatoties uz problēmām, sarežģījumiem ar nespiežamiem vadiem, pirkstu spiedienu, ultrasonogrāfija, papildus neinvazīvie vaskulārie pētījumi var būt nepieciešami (McCulloch, 2012).

Diabētiskās brūces visbiežāk tiek iedalītas, izmantojot Wagnera klasifikāciju (Wagner, 1981):

- 0- nav atvērtu bojājumu, var būt deformācija
- 1- virspusēja diabētiskā brūce (daļēja vai pilna biezuma)
- 2- dziļa brūce līdz cīpslai, kaulam vai locītavas kapsulai
- 3- dziļa brūce ar abscesu vai osteomielītu
- 4- pēdas gangrēna
- 5- visas pēdas gangrēna

1.2.4. Neurotrofiskās čūlas

Nervu bojājumi diabēta gadījumā ir visaptveroši, iekļaujot motoros, sensoros un autonomos ceļus. Diabētiskās neiropātijas klīniskie tipi tika aprakstīti kā rupjo šķiedru neiropātija, mazo šķiedru neiropātija un akūtas mononeiropātijas (O'Neal *et al.*, 2008). Atsevišķi vai kopīgi tie veicina brūces veidošanos. Sakarā ar motorā nerva iesaistīšanos, pacientam ir patoloģiska gaita, kas noved pie smagnēja, neparasta spiediena uz kājām, kas traumas procesā kļūst par čūlu. Sensorā neiropātija izraisa nejūtīgumu rokās un kājās ar aizsargājošu sāpju pazušānu, spiedienu, temperatūra un atkārtotas traumas noved pie čūlu rašanos. Simpātiskās autonomās sistēmas neiropātija izraisa vazodilatāciju, kā arī samazinātu vai palielinātu svīšanu siltām, sausām rokām un kājām. Tie ir tendēti uz plaisām un spraugām, kuras tiek inficētas, kā rezultātā veidojas čūlas. Diabētiskā neiropātija izraisa lokālo vazodilatāciju. Vazodilatātoru atbilde parasti parādās traumas vai iekaisuma laikā (Nazimek-Siewniak *et al.*, 2002). Daudzas no iepriekš minētām problēmām var novērst veicot nepieciešamus pacientu izglītojošus pasākumus.

Išēmija pasliktina brūču dzīšanu, novēršot vai samazinot O₂ plūsmu un visas to sastāvdaļas, kuras nepieciešamas dzīšanai. Pastāv divu veidu išēmiskas problēmas diabēta gadījumā:

- Samazināta angiogēnēze mazos vados diabētiskās pēdas (šobrīd nav pieejamas terapētiskās iespējas, taču šī ir viena no jomām, kurā ir nepieciešama turpmāka izpēte) (Brem *et al.*, 2006).
- Mikroangiopātija var būt saistīta gan ar strukturālām, gan funkcionālām novirzēm vados. Strukturālās novirzes no normas ir redzamas visbiežāk tīklenes un nieru asinsvados, kas noved pie akluma un nieru mazspējas (O'Neal *et al.*, 2008).

Perifēro artēriju slimība (PAS) var notikt vienlaikus ar diabētu. Šie pacienti ir vairāk tendēti uz čūlas rašanos nekā tiem, kuriem nav PAS. Smagas išēmijas gadījumā šo problēmu var atrisināt ar artēriju šuntēšanas revaskularizācijas procedūras palīdzību. Diabētiķiem, kuri nespēj iziet revaskularizācijas operācijas, endovaskulārās angioplastijas ir dzīvotspējīgs risinājums (Bosiers *et al.*, 2005; Trocciola *et al.*, 2005) Multicentriskā pētījumā kurā piedalījās pacienti ar diabētisko pēdu, veica perifērisko angioplastiju, rezultāti bija pozitīvi: ABI no 0,53 līdz 0,9 ($p < 0,0001$), kā arī procedūras pazuda išēmiskās sāpes (Faglia *et al.*, 2002).

Asociētie sistēmiskie faktori:

- Augsti glikozes līmeņi audos noved pie infekcijas un līdz ar to izplatās audu bojājumi.
- Fizioloģiskie traucējumi diabēta dēļ nopietni kavē čūlas noslēgšanos.
- Plaisas, plīsumi un čūlas darbojas kā ieejas portāli sistemiskām infekcijām, un tā kā diabētiķiem ir pavājināta imunitāte, tas ievērojami palielina infekcijas risku
- Nepietiekams, nepareizs uzturs kopā ar imūndeficītu arī pasliktina brūču dzīšanu.
- Diabēts, kā arī citas slimības, ietekmē iznākumu brūces sadzīšanā (Falanga *et al.*, 2005; Stojadinovic *et al.*, 2005).

1.3. Standarta terapija

Pacientiem ar cukura diabētu ir jāapzinās savi ārstēšanas mērķi un jācenšas tos sasniegt, mērot glikēmijas kontroli, kontrolējot asinsspiedienu un lipīdu līmeni. Jāizvairās no smēķēšanas, aspirīna profilaktiskās lietošanas, jā rūpējas par pēdām, jāveic regulāras medicīniskās pārbaudes. Ja tas viss notiktu regulāri, tad būtu iespējams samazināt komplikāciju risku (O'Neal *et al.*, 2008).

Skrīnings ir svarīgs vairāku iemeslu dēļ. Hiperglikēmijai ir nozīmīga mikroangiopātijas patoģenēzē. Neiropātijas un makrovaskulārās slimības (ateroskleroze) (O'Neal *et al.*, 2008). Visiem pacientiem ir jāveic sekojošas pārbaudes – pilna asins pārbaude, cukura līmenis asinīs, protrombīna laiks, daļēja tromboplastīna laiks, nieru un aknu funkciju testi, lipīdu profils, hemoglobīna A1c līmeņi, prealbumīna līmeņi un urīnceļu albuminurija līmeņi (Brem *et al.*, 2006). Plazmas HbA1c līmeņi (ik pēc 4 mēnešiem), ir nepieciešams pārbaudīt, lai uzraudzītu glikozes kontroli ilgtermiņā. Paaugstināti HbA1c līmeņi tiek korelēti ar pavadošām slimībām, piemēram, kā sirds slimība, retinopātija, neiropātija un nefropātija (Stratton *et al.*, 2000). Prealbumīna līmeņi sniedz objektīvus datus, kas netieši korelē ar nepareizu, nepietiekamu uzturu. Tie ir ievērojami zemāki pacientiem ar spiediena čūlām. Diabētiķiem tas var palīdzēt diagnosticēt nepietiekamu uzturu un optimizēt vielmaiņas stāvokli. Visiem diabēta pacientiem ar nefropātiju būtu jāpārbauda albuminūrija ik gadu, jo pastāv liels mikro- un makroalbuminūrijas pārsvars tajos. Pēdu čūlas ir biežāk sastopamas mikroalbuminūrijas (13%) un makroalbuminūrijas (25%) pacientiem, salīdzinot ar normoalbuminūrijas pacientiem (5%) (Brem *et al.*, 2006).

Šobrīd Latvijā ir daudz dažādu pārsienamo materiālu, kuri palīdz uzturēt brūci tīru no piesārņojumiem, lai labāk veicinātu brūču dzīšanu. Tabula 1.3.1. atspoguļo šo materiālu grupas un pielietojumu.

Pieejamie brūču pārsienamie materiāli

| | |
|--------------------------|---|
| Algināti | Kalcija <i>algināta</i> pārsēji - vidēji un stipri eksudējošu brūču ārstēšanai. Piemēri: <i>Suprasorb A, Melgisorb, Algisite M, Aquacell</i> |
| Algināti + Ag | Kalcija algināta pārsēji, pastiprināti ar sudrabu, kuriem raksturīga spēcīga antimikrobā iedarbība. Piemēri: <i>Suprasorb A + Ag, Melgisorb Ag, Algisite Ag, Aquacell Ag</i> |
| Hidrocoloīdi | Paredzēti vidēji un nedaudz eksudējošām brūcēm. Piemēri: <i>Suprasorb H, Granuflex, Ultec-Pro, ReplicareUltra</i> (Bradley et al., 1999) |
| Hidroselektīvie pārsēji | Šie pārsēji faktiski ir <i>Hidrocoloīda</i> pēctecis - palīdz uzturēt brūci mitru un tīru. Piemēri: <i>Suprasorb X, Cutinova Hydro</i> |
| Putu un silikona pārsēji | Hidrocelulāri poliuretāna vai silikona pārsēji, vidēji eksudējošu un granulējošu brūču ārstēšanai. Piemēri: <i>Suprasorb P, Allewyn, Mepilex, Copa</i> (Bradley et al., 1999) |
| Hidrogeli | Attīra brūci no nekrotiskiem audiem un absorbē lieko eksudātu. Piemēri: <i>Intra Site Gel, Protosan Gel, Tegaderm Gel, Granugel, Purilon Gel, Normalgel, Hipergel</i> (Bradley et al., 1999) |
| Tīklveida pārsēji | Nodrošina atraumatisku pārsēju maiņu. Pielietojami visās stadijās. Piemēri: <i>Jelonet, Bactigras, Mepitel, Xeroflo</i> |
| Membrānu pārsēji | Caur laidīgas plēves pārsēji. Piemēri: <i>Suprasorb M, Opsite, Tegaderm.</i> |

1.4. Citas brūču kopšanas terapijas

Ja brūces nesadzīst ar standarta terapiju, tad ir nepieciešamas papildus ārstēšanas iespējas. Ir izstrādātas dažādas avancētas brūču kopšanas terapijas, kuras tiks aprakstītas tālāk, taču to efektivitāte un kaitīgums joprojām tiek pētīti.

Terapijas: kolagēna produkti, bioloģiskie pārsēji, bioloģiskie ādas ekvivalenti keratinocīti, asins plātnīšu veidotais augšanas faktors, trombocītiem bagāta plazma, sudraba izstrādājumi, intermitējošā pneimatiskā kompresija, negatīvā spiediena brūču terapija, elektromagnētiskā terapija un hiperbārsikā oksigenācija. Detalizētāk terapijas var apskatīt tabulā 1.4.1.

Tabula 1.4.1.

Bruču kopšanas terapijas

| | |
|--|---|
| Kolagēns | Dabiskas izcelsmes proteīns, kuram ir dažādi uzdevumi čūlu dzīšanas procesā: 1) darbojas kā substrāts hemostāzē 2) hemotaksisks dzīšanas celulāriem elementiem kā granulocītiem, makrofāgiem un fibroblastiem, 3) nodrošina plātni celulārai piesaistei, migrācijai un proliferācijai (Purna <i>et al.</i> , 2000). |
| Bioloģiskie pārsēji | Sastāv no biomateriāliem, kuri ir izgatavoti no dažādu komponentu ārpusšūnu matricas (ECM) un stimulē čūlas dzīšanu, (Hodde <i>et al.</i> , 2007). |
| Bioloģiskie ādas ekvivalenti | Laboratorijas apstākļos iegūtie audu paraugi, kuri ir izstrādāti lai līdzinātos cilvēku reāliem dažādiem ādas slāņiem. Galvenais mērķis ir dzīšanas procesa paātrināšana, stimulējot fibrovaskulāro ieaugšanu un epitelizāciju uzņēmēj-audos (Ehrenreich <i>et al.</i> , 2006; Límová, 2010). |
| Keratinocīti: | Uz keratinocītiem balstīta terapija brūču ārstēšanā ir dažādos veidos un tās mērķis ir stimulēt proliferāciju un uzņēmēj-epitēlija migrāciju no brūču malām caur augšanas faktoru un citu citokīnu izdali (Duinslaeger <i>et al.</i> , 1994). |
| Trombocītu atvasinājumu augšanas faktori | Palīdz atjaunot un nomainīt mirušo ādu un citus audus, piesaistot šūnas, kuras uzlabo brūces, noslēdzot tās (Pierce <i>et al.</i> , 1991). |

| | |
|--------------------------------------|---|
| (PDGF) | |
| Trombocītiem bagāta plazma | Plazma ar augstu plātnīšu koncentrāciju palīdz dzīšanas procesā, piesaistot nediferencētas šūnas un aktivizējot šūnu dalīšanos (Lacci <i>et al.</i> , 2010). |
| Sudraba produkti | Vairāki sudraba produkti ir izstrādāti, lai palīdzētu dzīšanas procesā, ņemot vērā to plašo baktericīdo darbību (Ip <i>et al.</i> , 2006) |
| Intermitējošā pneimatiska kompresija | Kompresijas stimulē, virza uz priekšu dziļo vēnu asinis uz sirdi. Šī terapija pozitīvi ietekmē neambulatoros pacientiem, palielinot asins plūsmas ātrumu dziļajās vēnās un samazinot stāzi, samazinās venozā hipertensija, pietūkums vārstu kabatās, un samazinās intersticiālā edema (Comerota, 2011). |
| Negatīvā spiediena brūču terapija | Šī terapija ietver sevī blīvi aizslēgtu dressing apkārt brūcei izmantojot sūkņa pumpi, lai piemērotu negatīvo spiedienu vienmērīgu pa virsmu vai periodiski vai intermitējošā veidā. Tas ir nepieciešams, lai uzlabotu brūču dzīšanu, palielinot granulācijas audu un lokālās perfūzijas, samazinot audu edemu, stimulējot šūnu proliferāciju, samazinot mehānisko stresu. (Saxena <i>et al.</i> , 2004). |
| Elektromagnētiskā terapija | Izmanto elektrisko lauku, kas rodas iedarbojoties uz oscilētu magnētisko lauku. Ārstēšana strādā sekojoši: atdarinot vai uzlabojot dabīgo brūču izraisītos elektriskos laukus, kuri ir producēti cilvēka normālā ādā (Nuccitelli, 2003; Zhao <i>et al.</i> , 2006). |
| Hiperbārsikā oksigenācija: | Metodes pamatā ir audu skābekļa saturācijas mērījumi. Konstatēts, ka normālos audos skābekļa saturācija ir apmēram 40 mm Hg, bet, ja saturācija ir 30 mm Hg, metaboliskā aktivitāte ir ievērojami samazināta. Konstatēts, ka inficētos, traumatizētos audos skābekļa saturs ir mazāks par 30 mm Hg, savukārt hiperbārā oksigenācija skābekļa līmeni var paaugstināt (Gill <i>et al.</i> , 2004). |

1.4.1. Adenilāta deamināze un tās iedarbība

Nespecifiskā adenilāta deamināze jeb AMPD ir glikoproteīns (M_r 210 kD), ko veido mikroskopiska micelijsēne *Penicillium lanoso-viride* konkrētā augšanas fāzē, tas ir, konidosporu veidošanās laikā (Nikolajeva *et al.*, 2009).

Jau iepriekš ir eksperimentāli apstiprināts, ka injicējot AMPD dzīvniekiem, tiek uzlabota rezistence pret infekcijām, aktivizē peļu peritoneālos makrofāģus un veicina limfocītu proliferāciju *in vitro*. Tas viss liecina, ka AMPD piemīt imūnmodulējošās īpašības (Nikolajeva *et al.*, 1999; Nikolajeva *et al.*, 2009).

Nikolajevas *et al.* 2009 veiktajā pētījumā, atklāja, ka AMPD saturošais gēls palīdz paātrināt brūces noslēgšanos žurkām un neitrofilu infiltrācijas laiku. Projektā pētītais glikoproteīna-enzīma farmakoloģiskais līdzeklis paātrināja ādas čūlu sadzīšanu, galvenokārt tieši audu reģenerāciju, salīdzinot ar kontrolēm – neapstrādātām čūlām un ar Carbopol hidrogēlu apstrādātām čūlām

Glikoproteīnu-enzīmu līdzekļa lokāla aplikācija neietekmē dzīvnieku iekšējo orgānu struktūru. Ādas makromorfoloģiskās un mikromorfoloģiskās izpētes rezultāti liecināja, ka čūlu apstrāde ar AMPD saturošu hidrogēlu uzlabo tās stāvokli čūlas rajonā gan salīdzinājumā ar kontroli,

2. MATERIĀLI UN METODES

2.1. Izmēģinājuma dzīvnieki

Pētījumu veica Latvijas Universitātes Medicīnas fakultātes Farmakoloģijas katedras eksperimentu laboratorijā. Pētījumā tika izmantoti *Wistar* žurku tēviņi (260 - 290 g) un *ICR* peļu tēviņi (27 - 31 g). Žurku un peļu tēviņi tika saņemti no Rīgas Stradiņa Universitātes Eksperimentālo dzīvnieku audzētavas. Dzīvniekiem tika nodrošināti standarta labturības apstākļi atbilstoši dzīvnieku turēšanas noteikumiem - temperatūra (21-23°C), ar 12 stundu gaismas/tumsas intervāliem un baroti ar „*Tukuma straume*” standarta barības maisījumu grauzējiem, brīva pieeja ūdenim un barībai. Žurkas līdz eksperimenta uzsākšanai tika turētas plastikāta būros, vienā būrī seši dzīvnieki. Eksperimentālās procedūras veiktas saskaņā ar Eiropas Parlamenta un Padomes konvencijas direktīvu 2010/63/ES vadlīnijām un saskaņotas ar Latvijas Pārtikas un veterināro dienesta izdoto izmēģinājuma projekta atļauju Nr.69 dzīvnieka izmantošana procedūrā.

2.2. Eksperimentā izmantotās vielas

Maģistra darbā tika pētīti divi jauni biomateriāli (imunomodulatori), kas tika veidoti kā gēlveida matrica:

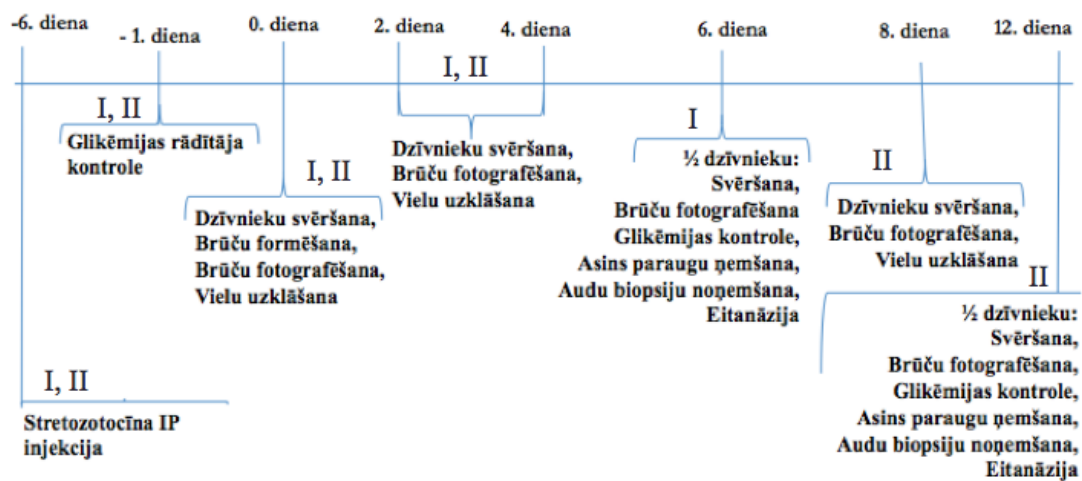
- 1) glikoproteīns (I) – adenoīna monofosfāta dezamināze (AMPD) ar nekroslinkotu hialuronskābi;
 - 2) glikoproteīns (II) – adenilāta monofosfāta dezamināze (AMPD) ar kroslinkotu un nekroslinkotu hialuronskābi.
- Fosfāta buferis (PBS) tika lietots kā šķīdinātājs biomateriāla veidošanā;
 - Adenoīna monofosfāta dezamināze (APMD), saņemta no Latvijas Universitātes Bioloģijas fakultātes Mikrobioloģijas un biotehnoloģijas katedras;
 - Hialuronskābe (HA) – kroslinkota un nekroslinkota; saņemta no Latvijas Universitātes Bioloģijas fakultātes Mikrobioloģijas un biotehnoloģijas katedras;
 - Streptozocīns (*Sigma*, Vācija) tika izmantots diabēta inducēšanai
 - Sukroze (*Sigma Aldrich*, Vācija) (10g/100ml) tika dota visām žurkām pēc

intraperitoneālas ievades.

- Anestēzijai izmantoja: gāzes anestēziju izoflurānu un skābekli; injekcijas anestēziju 10% ketamīns 75 mg/kg (*AlfaSan*, Holande), 2% ksilazīns 15 mg/kg (*Bremer Pharma GMBH*, Vācija).
- Etanols (70%) tika izmantots kā dezinficējošs līdzeklis ādas apstrādei;
- Acu pilienus *Naphcon A* (*Alcon Laboratories INC*, ASV) pilināja žurkām operācijas sākumā.
- Ringera šķīdums (*B.Braun Melsungen AG*, Vācija)
- Formalīnā (10%) tika uzglabāti brūču audu paraugus.

2.3. Eksperimenta gaita 1: diabēta brūču modelī žurkām

Pētījuma dzīvnieki (60 gab.) tika sagrupēti divās eksperimentālās daļās: I daļā - 28 žurkas un II daļā - 32 žurkas, katrai no tām veica secīgi vienādas manipulācijas (skat.2.3.1.attēls). I daļas dzīvniekiem eksperiments ilga 6 dienas, savukārt II daļas – 12 dienas. Abu eksperimenta daļu beigās, proti, 6. un 12. dienā tika veikta atkārtota glikēmijas kontrole, tika ņemti brūču biopsijas paraugi un asins paraugi tika ievākti, izmantojot sirds punkcijas metodi.



2.3.1. attēls Pētījuma dizains diabēta brūču modelī

2.3.1. Eksperimentālās grupas diabēta brūču modeli žurkām

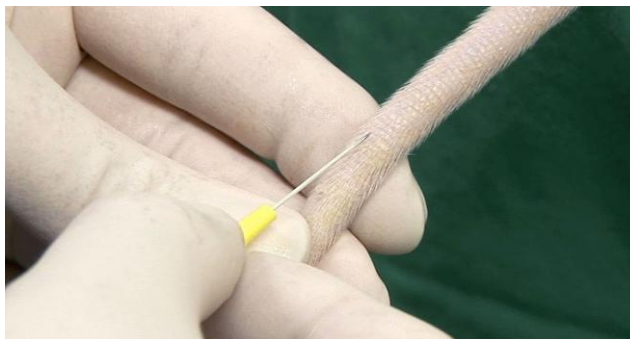
- 1) Kontrole (PBS);
- 2) Biomateriāla kontrole I (ar nekroslinkotu hialuronskābi)
- 3) Biomateriāla kontrole II (ar kroslinkotu un nekroslinkotu hialuronskābi)
- 4) AMPD
- 5) Biomateriāls I + AMPD (glikoproteīnu - adenoziņa monofosfāta dezamināze (AMPD) ar nekroslinkotu hialuronskābi);
- 6) Biomateriāls II + AMPD (glikoproteīnu - adenoziņa monofosfāta dezamināze (AMPD) ar kroslinkotu un nekroslinkotu hialuronskābi)

2.3.2. Diabēta eksperimentāla izraisīšana un glikozes kontroles noteikšana *Wistar* līnijas žurkām

Sešas dienas pirms operācijas dzīvniekus nosvēra un injicēja streptozocīnu IP devā 60 mg/kg. Žurkām tika iedots sukrozes šķīdums (10g/100ml) pirmās četras dienas, pēc tam tikai ūdens.

Dienu pirms brūču operācijas žurkām pārbaudīja glikēmijas rādītāju. Dzīvniekam no astes vēnas tika paņemts asins paraugs (skat. 2.3.2.1 attēls.) Pirmo asins pilienu noslauka, bet otro izmēra ar glikometru (*Accu-Check Active*).

Balstoties uz glikēmijas rezultātiem, eksperimentā iekļāva tos dzīvniekus, kuriem glikozes līmenis asinīs pārsniedza > 15.1 mmol/l. Šos dzīvniekus ar hiperglikēmiju sadalīja sešās eksperimentālās grupās (skat. sadaļu 2.3.1.), pa 6-7 dzīvnieki grupā.



2.3.2.1 attēls Asins paraugu noņemšana

2.3.3. Brūču izveidošanas operācija un vielu uzklāšana

Nākošajā dienā pēc glikozes rādītāja noteikšanas dzīvniekus nosvēra un anestezēja, injicējot IP 10% ketamīnu devā 75 mg/kg / 2% ksilazīnu 15 mg/kg. Žurkām tika iepilināti acu pilieni (*Naphcon A*), lai novērstu acu izžūšanu. Pēc muguras daļas vilnas noskūšanas ādu dezinficēja ar 70% etanolu. Brūces tika izveidotas uz dzīvnieka dorsālās virsmas, paceļot saliktu mugurkaula viduslīnijā ādu un izmantojot sterilu, vienreizēju ādas biopsijas instrumentu (d=8mm *Kai Medical*, Japāna), perforēja vienlaicīgi divas simetriski vienādas (0.8 mm) brūces. Izveidotās brūces apstrādāja vairākas reizes ar fizioloģisko šķīdumu. Brūču saraušanās novēršanai ap brūču malām ar ķirurģisko diegu izmērā 6/0 tika apšūtas silikona riņķveida šinas ar diametru 10 mm (*Sigma*, ASV).

Pirms vielu uzklāšanas uz žurkas muguras novietoja papīra lineālu, uz kura bija atzīmēta atbilstošā grupa un diena, un veica brūču fotografēšanu.

Pēc tam uz tīras brūces aplicēja 100µl testējamo biomateriālu vai PBS šķīdumu attiecīgi konkrētai eksperimentālai grupai. Trīsdesmit sekundes pēc biomateriālu/šķīdumu aplicēšanas, uz brūču rajona uzlika 2cm x 2cm izmēra primāro pārsēju *Mepitel One Safetac*, tad to nostiprināja ar elastīgu pašlīpošu saiti *Nowopress* un virs pašlīpojošās lentas tika aplikts vēl *Mefix* plāksteris. Pēc apsēju uzlikšanas, žurkām injicēja subkutāni 2ml Ringera šķīdumu. Līdz eksperimenta beigām katrs dzīvnieks tika turēts atsevišķā būrī.

2.3.4 Aktīvās vielas atkārtota uzklāšana

Pēc brūču izveidošanas vielu atkārtota uzklāšana notika sekojošās dienās 2, 4., 8. un 12., žurkas. Dzīvnieku anestezēja ar izoflurānu, ievietojot anestēzijas aparātā *Quaniflex Low Flow V.M.C 'Matrix'* (*Harvard Apparatus GmbH*, ASV). Pēc tam žurkas tika nosvērtas nosvēra, pārsēju tik noņemts ar šķērēm pārgriežot plāksteri un pašlīpošo lentu, un ar pinceti noņemot *Mepitel One Safetac* primāro pārsēju. Pēc eksudātu noņemšanas brūces tika noskalotas ar fizioloģisko šķīdumu. Izmantojot digitālo kameru *Pentax istDS*, žurkas abas brūces tika fotografētas trīs reizes. Lai kontrolētu brūču dzīšanas izmaiņas, pirms fotografēšanas zem brūces tika novietots papīra lineāls, uz kura norādīja attiecīgo dienu un dzīvnieka grupu. Pēc brūču nofotografēšanas un 30 sekundes pēc vielu aplicēšanas, uzlika jaunu primāro pārsēju *Mepitel One Safetac*, ko nostiprināja ar elastīgu pašlīpošu lentu *Nowopress* un virsū uzlika *Mefix* plāksteri.

2.3.5. Brūču dzišanas dinamikas izvērtējums ar *ImageJ* programmu

Brūču fotogrāfijas tika sašķirotas pa eksperimentālām grupām un tālāk grupas ietvaros, strukturētas atsevišķās mapēs pa eksperimenta fotogrāfēšanas dienām: 0., 2., 4., 6., 8. un 12.diena. Brūču attēlus analizēja izmantojot *ImageJ* programmu. Lai iegūtu korektākus datu mērījumus, analīzei izmantoja katram dzīvniekam vienāda veida - pietuvinātās, kvalitatīvākās bildes. Analīzes gaita bija sekojoša: programmā atvēra izvēlēto fotogrāfiju, veica bildes kalibrēšanu – ar bildē esošo lineālu un programmas palīdzību, brūces nesadzijušais laukums tika iezīmēts un programma automātiski izrēķināja brūces nesadzijušās daļas laukumu. Katru brūces bildi analizēja trīs reizes un, balstoties no trim mērījumiem, izrēķināts vidējais rādītājs.

2.3.6. Eitanāzija un ādas biopsijas paraugu paņemšana

Eitanizāciju veica žurkām ar anestēzijas pārdozēšanu, izmantojot 10% ketamīnu devā 100 mg/kg, 2% ksilazīnu 10 mg/kg. Pēc tam dzīvniekus nosvēra, izmantojot šķēres, pārgriezta plāksteri un pašlīpošo lentu un ar pinceti noņēma *Mepitel One Safetac* primāro pārsēju. Pēc riņķu noņemšanas zem brūces novietoja papīra lineālu un nofotografēja brūces. Pēc tam tika paņemti brūces biopsijas paraugi, kurus ievietoja trauciņos ar 10% formalīnu. Žurkām tika paņemti asins paraugi ar sirds punkcijas metodi.

2.3.7. Diabētisko brūču eksudātu iegūšana

2. un 4.dienā tika ievākti brūču eksudātu paraugi. To veica sekojoši - uz brūces novietoja nelielu 1cm x 1cm filtrpapīru, lāva uzsūkties 30 sekundes un noslēdza 15 ml stobriņos.

Eksudātus nosvēra un pievienoja tiem atbilstošu tilpumu CAB ekstragēšanas bufera (25 mM Tris-HCl pH 7.5, 200 mM NaCl, 3 mM CaCl₂, 0,03% Brij-35) un inkubēja diennakti +4°C. Pēc tam centrifugēja 15 minūtes pie 3000 apgr./min. Savāca buferi un sagatavoja eksudātu alikvotas, kuras pēc ekstragēšanas tika uzglabāti (-150°C) līdz tiks analizēti ar ELISA metodi (Moor *et al.* 2009).

2.3.8. ELISA metode

ELISA tests jeb ar enzīmiem saistītā imunosorbentā pārbaude ir metode, kuru izmanto imunoloģijā, lai noteiktu antivielu vai antigēnu klātbūtni paraugā. Metodes mehānisms: nezināms daudzums antigēnu piesaistīts pie virsmas un specifiskā antivielas tiek aplicēta pa virsmu, lai notiktu piesaiste ar antigēnu. Šī antivielas ir saistīta ar enzīmu, un beigu stadijā viela tiek pievienota, lai enzīms varētu pārvērsties par kādu uztveramu signālu, visbiežāk krāsu izmaiņas ķīmiskā substrātā, ko detektē spektrofotometriski. Darba gaita ir apskatāma pielikumā.

Ar ELISA metodi tika novērtēta augšanas faktora CTGF sekrēcija diabētisko brūču eksudātos dzīšanas pirmajās 4 dienās.

2.3.9. Multipleks metode

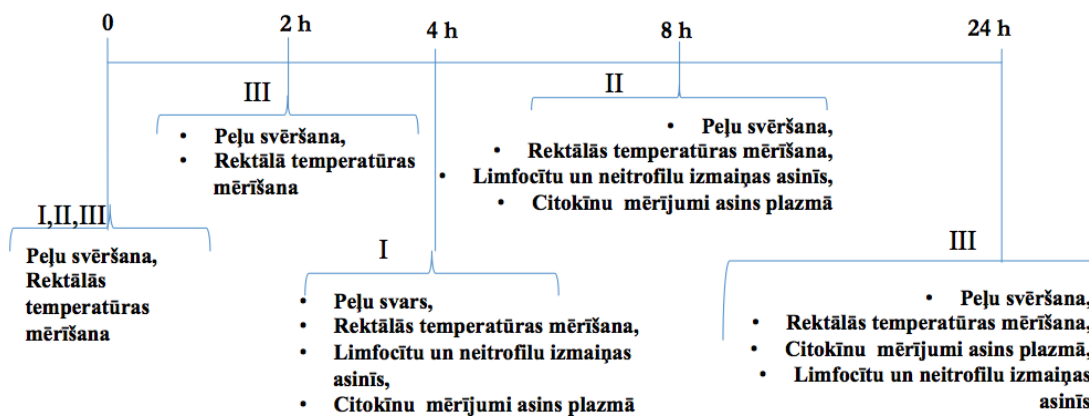
Multiplex tests ir analīzes metode, kas pieļauj vairāku analīžu analizēšanu vienā reizē. Ar šo metodi var analizēt gan dažādas ģenētiskās pazīmes, gan audu un šūnu pazīmes, kā arī mērīt dažādu proteīnu un tiem līdzīgu daļiņu daudzumu. Metodes tehniskajā pamatā ir plūsmas citometrijas principi. Uz iekrāsotām lodītēm balstīta metode, kur uz lodīšu virsmas ir uzklātas antivielas, kas uz katras lodītes ir specifiskas kādai konkrētai vielai (antigēnam). Darba gaita ir apskatāma pielikumā.

Ar xMAP Multiplexing metodi žurku asins plazmas paraugos, kas iegūti no eksperimenta dzīvniekiem 6. un 12. dienā, analizēja VEGF un G-CSF izmaiņas.

2.4. Eksperimenta gaita 2: akūtās devas iedarbību uz pelēm pēc vielu i.v. ievadīšanas

AMPD šķīduma akūtās devas toksicitātes izvērtēšanai tika izmantoti (63.gab.) ICR peļu tēviņi. Pētījums sastāvēja no trim eksperimentālām daļām, atbilstoši asins paraugu ievākšanai – pēc 4 h I daļā, pēc 8 h II daļā un pēc 24h III daļā.

Katrā eksperimentālā daļā bija 21 dzīvnieks, kurus vēlāk, balstoties uz dažādām ievadītām vielu koncentrācijām, sadalīja pa trim grupām, tas ir, pa 7 dzīvniekiem. Visās trīs grupās tika veiktas secīgi vienādās darbības (skat.2.4.1.attēls).



2.4.1. attēls Eksperimenta dizains akūtas devas toksicitātes noteikšanai ICR pelēm pēc AMPD divu atšķirīgu koncentrācijas i/v ievadīšanas

2.4.1. Eksperimentālās grupas pelēm akūtās toksicitātes noteikšanā

Peles nosvēra un sadalīja trīs grupās katrā pa 7 dzīvniekiem:

- 1) Kontroles grupa (PBS)
- 2) AMPD (0,45 mg/kg) grupa;
- 3) AMPD (4,5 mg/kg) grupa;

2.4.2. Rektālās temperatūras mērīšana un AMPD divu atšķirīgu koncentrācijas i.v. ievadīšana

Pirms AMPD akūtas devas ievadīšanas, pelēm tika izmērīta rektālā temperatūra, kā arī to mērīja šādos laika punktos: I daļai pēc 4 h, II daļai - 8 h un III daļai pēc 2 h un 24 h. Vielas ievadīja intravenozi 10 ml/kg peles astes laterālajā vēnā, izmantojot 1 ml šļirci ar adatas izmēru 27G (0.4x90mm). Pētījuma gaitā tika rūpīgi novērota un izvērtēta peļu uzvedība un vispārējais veselības stāvoklis.

2.4.3. Eitanāzija un asins paraugu paņemšana

Pēc vielu ievadīšanas un mērījumu veikšanas, dzīvniekus eitanāzēja ar anestēzijas pārdozēšanu, izmantojot ketamīnu/ksilazīnu (100mg/10 mg/kg). Asins paraugus noņēma veicot sirds punkciju.

Pēc tādas pašas shēmas kā ar žurkām (skat. sadaļu 2.3.9.) ar xMAP Multiplexing metodi analizēja peļu plazmas IL-6 un TNF- α sekrēcijas izmaiņas un limfocītu un neitrofilu skaita izmaiņas.

2.5. Datu apstrāde un statistiskā analīze

Iegūtie dati tika ievadīti Microsoft Excel 2007 un statistiski apstrādāti ar GraphPadPrism V 6.0 programmām. Rezultātus izteica kā vidējais \pm SEM. Lai izvērtētu atšķirības starp pētījumu grupām brūču dzīšanai, izmantoja variācijas analīžu testu ANOVA. Rezultāti tika uzskatīti par statistiski ticamiem ja $p < 0,05$.

3. REZULTĀTI UN DISKUSIJA

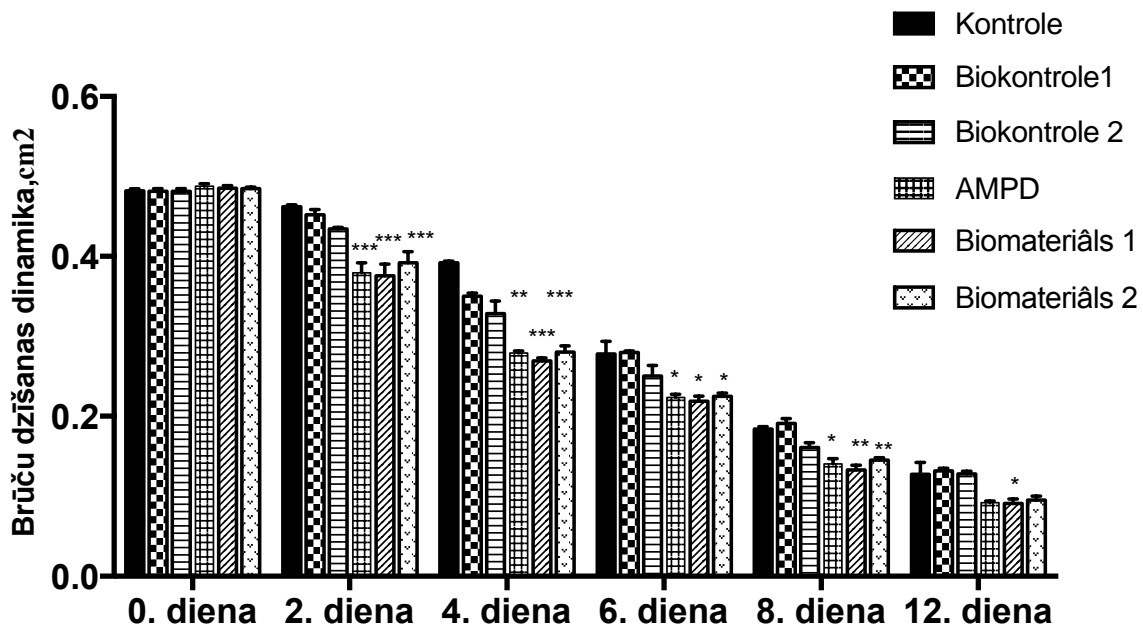
Lai gan diabētisko brūču diagnostikas un ārstēšanas pieejas strauji attīstās, joprojām pastāv nepieciešamība pēc jauniem efektīviem līdzekļiem, kas pacientam samazinātu brūču dzīšanas ilgumu un ar to saistītās ārstēšanas tiešās un netiešās izmaksas.

Jauna biomateriāla izveide nākotnē palīdzētu ārstēt nedzīstošas vai slikti dzīstošas brūces, piemēram kā trofiskās čūlas, venozās čūlas, išēmiskās čūlas, neiropātiskās čūlas, kā arī izgulējumus. Ir svarīgi, lai biomateriāla aktīvās vielas, uzliedot uz ādas, spētu modulēt, regulēt iekaisuma procesus, kas ir ļoti būtiski diabētisko brūču gadījumos.

3.1. Metožu analīze *Wistar* līnijas žurkām

3.1.1. Attēlu analīze, lai noteiktu brūču dzīšanas dinamiku

Lai izsekotu līdz brūču dzīšanas procesam, dzīvniekiem tika fotografēta katra brūce 0.dienā, 2.dienā, 4.dienā, 6.dienā, 8.dienā un 12 dienā. Vēlāk brūču dzīšanas dinamika tika apstrādāta ar programmas *ImageJ* palīdzību (skat. 3.1.1.1.attēls). Brūču operāciju 0.dienā brūces laukums visām žurkām bija identisks, tā kā katrai brūču radīšanai izmantoja biopsijas instrumentu ar vienādu diametru, tas ir, 8mm. Sākot ar otro dienu, brūču dzīšanas dinamika atšķīrās starp grupām, un turpmāk tā tika salīdzināta pret kontroles grupu. Otrajā dienā varēja novērot statistiskas atšķirības, kur AMPD, biomateriāls 1 un biomateriāls 2 uzrāda labākus brūču dzīšanas rezultātus. Ceturtajā, sestajā un astotajā dienā brūču dzīšanas dinamika pieauga un labākie dzīšanas rezultāti joprojām bija AMPD, biomateriāla 1 un biomateriāla 2 grupās. Divpadsmitā dienā statistiskā atšķirība ir novērota tikai biomateriālam 1. Iegūtie rezultāti ir statistiski ticami un norāda, ka visa pētījuma garumā visatrākā brūču dzīšana tika novērota sekojošās grupās: AMPD, biomateriāls 1 un biomateriāls 2. No tā var secināt, ka gan AMPD atsevišķi, gan kombinācijā ar hialuronskābes savienojumiem pozitīvi ietekmē diabētisko brūču dzīšanas dinamiku, pamatojoties uz statistiskiem rādītājiem un procentuāliem aprēķiniem.



3.1.1.1.attēls Žurku diabētisko brūču dzīšanas dinamika cm^2 0, 2, 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. Izmantots 2way ANOVA tests. P vērtība: * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ un **** $p < 0,0001$.

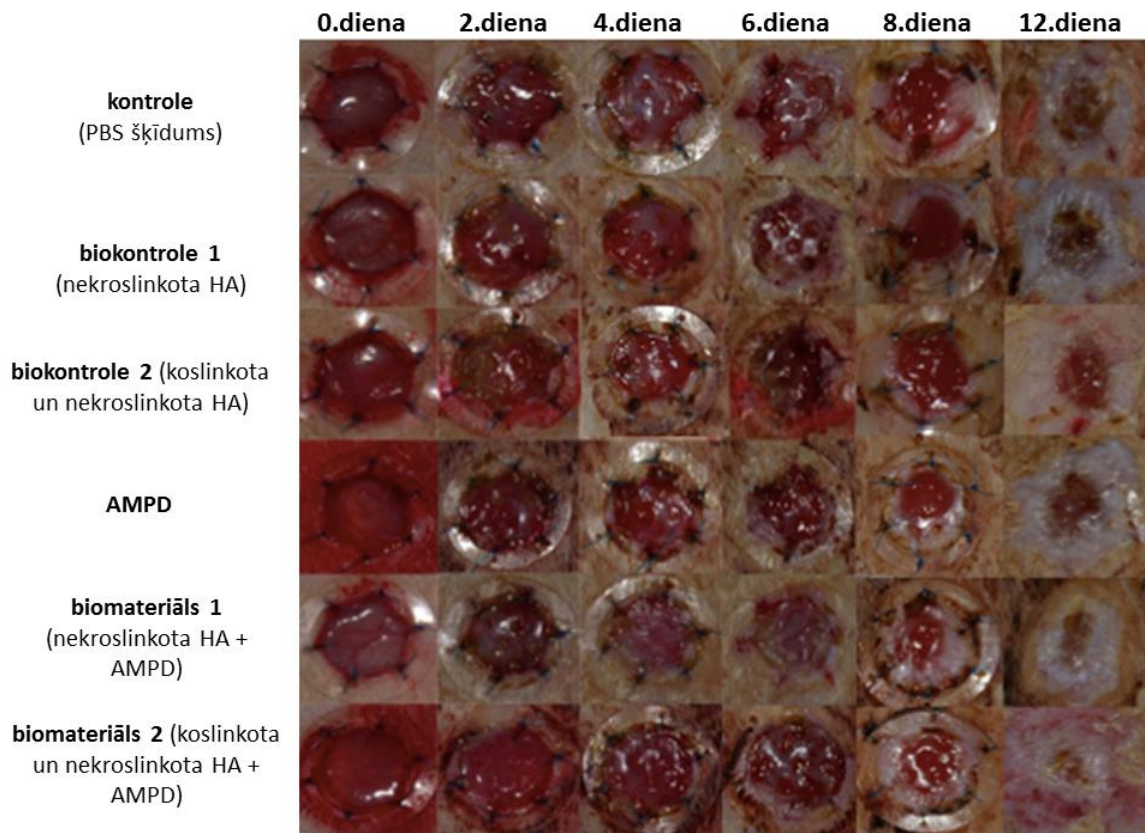
Brūču dzīšanas laukuma procentuālie aprēķini norāda, ka vismazākais nesadzījušās brūces laukums ir biomateriālam 1, salīdzinot ar kontroli. Pētījuma divpadsmitajā dienā biomateriāls 1, biomateriāls 2 un AMPD uzrāda vislabākos rezultātus, tas ir, nesadzījušais brūces laukums ir vismazākais pret kontroli, biokontroli 1 un biokontroli 2 .

3.1.1.1.tabula

Nesadzījušais brūču laukums izteikts procentos 2., 4., 6., 8. un 12. dienā

| | Nesadzījušās brūces laukums procentuāli | | | | |
|-----------------------|--|-----------------|-----------------|-----------------|------------------|
| | 2.diena | 4. diena | 6. diena | 8. diena | 12. diena |
| Kontrole | 96,00 | 81,35 | 57,73 | 38,17 | 26,50 |
| Biokontrole 1 | 93,93 | 72,79 | 58,10 | 39,68 | 27,38 |
| Biokontrole 2 | 90,20 | 68,17 | 52,95 | 33,42 | 26,59 |
| AMPD | 77,80 | 57,27 | 45,85 | 28,81 | 18,80 |
| Biomateriāls 1 | 77,45 | 55,51 | 45,20 | 27,38 | 18,76 |
| Biomateriāls 2 | 80,86 | 57,82 | 46,45 | 29,92 | 19,62 |

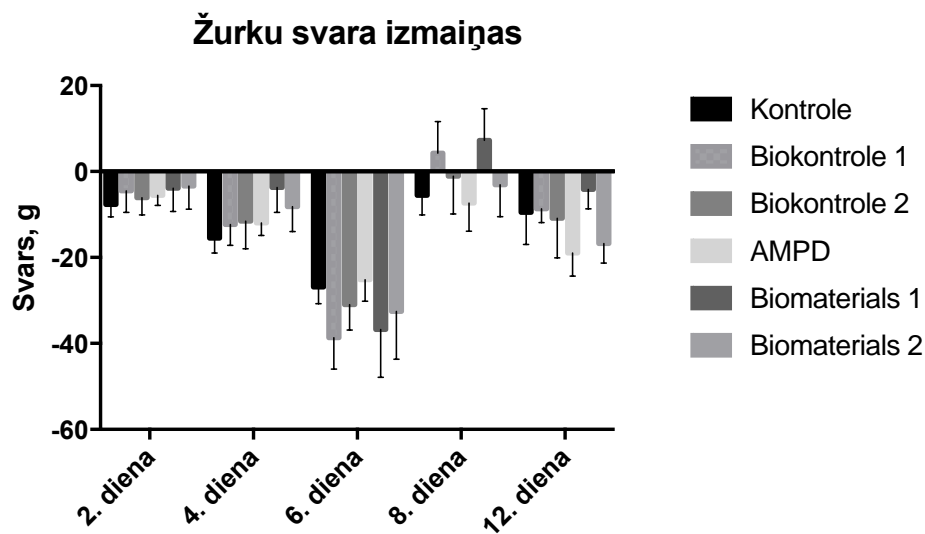
Brūču dzīšanas dinamika tika novērtēta gan pēc statistiskiem rādītājiem, gan pēc aprēķiniem. Taču svarīgi arī izvērtēt izveidoto brūču dzīšanas procesa vizuālo aspektu. Tādēļ no katras grupas - kontroles, biokontroles 1, biokontroles 2, AMPD, biomateriāla 1 un biomateriāla 2 tika atlasīta labākā bilde atbilstoši dienai: 0. diena, 2.diena, 4.diena, 6.diena, 8.diena un 12.diena (skat.3.1.1.2.attēls). Vislielākās vizuālās izmaiņas grupās ir redzamas 12.dienā. Vietās, kur tika aplicēta nekroslinkota vai kroslinkota un nekroslinkota HA, atsevišķi vai kopā ar AMPD, brūce labi sadzīja, taču tas nenotika ar kontroles grupu, kur uzklāja tikai PBS šķīdumu - brūce nesadzīja pilnībā.



3.1.1.2.attēls Brūču dzīšanas dinamika 12 dienu garumā

3.1.2. Žurku svara izmaiņas

Žurkas tika svērtas 2., 4., 6., 8. un 12.dienā. Svars strauji samazinājās pētījuma sākumā un šī tendence saglabājās līdz eksperimenta 8.dienai, kad svars dažām grupām (biokontrole 1 un biomateriāls 2) palielinājās. Tomēr 12.dienā svars atkal samazinājās. Šīs izmaiņas ir skaidrojamas ar to, ka starp eksperimenta dienām, it īpaši no 0.dienas līdz 8.dienai, bija mazs laika posms, lai žurkas atgūtos no atkārtotas anestēzijas. Svarīgi piebilst, ka diabēts žurkās tiks inducēts ar streptozotocīna injekciju, kas arī veicina svara zudumu.



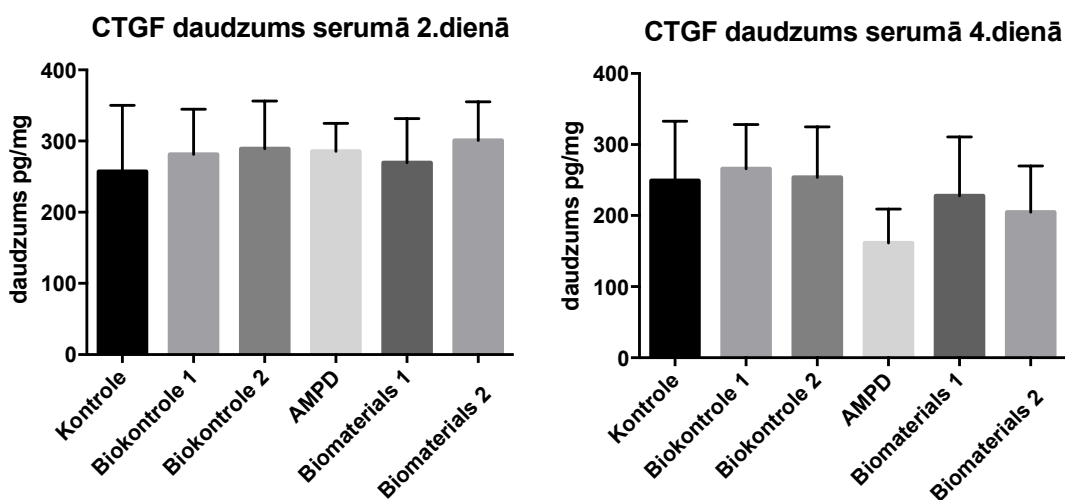
3.1.2.1.attēls **Žurku svara izmaiņas eksperimenta gaitā** Standartnovirzes apzīmētas ar kļūdu stabiņiem. Nav statistiskas atšķirības starp grupām.

3.1.3. Augšanas faktora CTGF sekrēcija diabētisko brūču eksudātos

Ar ELISA metodi tika noteikta augšanas faktora CTGF sekrēcija diabētisko brūču eksudātos dzīšanas 2. un 4. dienā

Saistaudu augšanas faktors (CTGF) stimulē fibroblastu proliferāciju un diferenciaciju brūču vietās, tostarp arī ādā, tādējādi uzlabojot ECM produkciju (Daniels *et al.*, 2009). CTGF spēj veicināt šūnu adhēziju un ir hemotaksisks iekaisuma šūnām, it īpaši makrofāgiem, tas piedalās arī šūnu diferenciacijā (Yosimichi *et al.*, 2001; Bradham *et al.*, 1991).

Balstoties uz iegūtiem grafikiem (skat. 3.1.3.1.attēls), var redzēt, ka 2.dienā visās grupās ir novērojams neliels CTGF daudzuma pieaugums, taču tas tik un tā ir tuvs kontroles līmenim. 4.dienā biokontrolē 1 un biokontrolē 2 joprojām saglabājas CTGF pieaugums, bet, salīdzinot ar kontroles grupu, samazinās AMPD, biomateriālam 1 un biomateriālam 2. No tā var secināt, ka AMPD un divu atšķirīgu biomateriālu uzklāšana veicina ātrāku brūču dzīšanu.



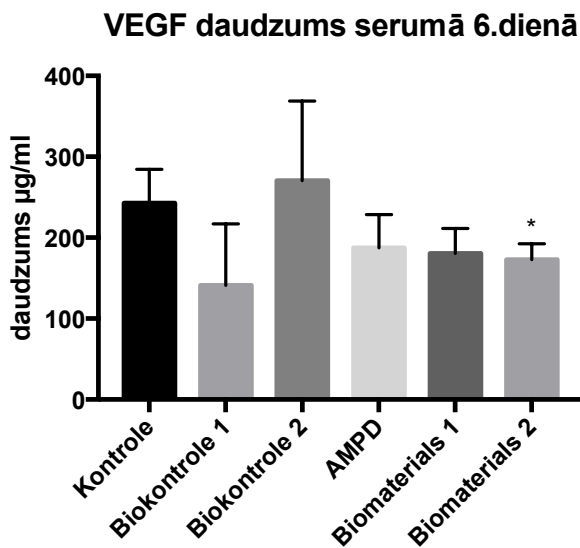
3.1.3.1.attēls CTGF daudzums serumā 2.dienā un 4.dienā. Standartnovirzes apzīmētas ar kļūdu stabiņiem. Nav statistiskas atšķirības starp grupām.

3.1.4. Proteīnu sekrēcijas analīžu izvērtējums žurku plazmā

Žurku asinis tika analizētas, izmantojot Multiplex metodi un tika dektēti G-CSF un VEGF. Paraugi tika ņemti 6. un 12.dienā.

Pilna ādas biezuma brūču dzīšana ir atšķirīga diabēta dzīvniekiem. Diabētiskās čūlas var sadziedēt caur šūnu infiltrāciju, granulācijas audu nogulsnešanos un reepitalizāciju, nevis ar kontrakcijām, kā tas notiek ar normālu dzīvnieku brūcēm (Albertson *et al.*, 1993). VEGF jeb vaskulārā endotēlija aušanas faktors pastiprina dzīšanu, veicinot hemotaksi un angiogēzi. Jaunie eksperimentālie dati liecina, ka VEGF stimulē epitelizāciju un kolagēna produkciju (Stojadinovic *et al.*, 2007).

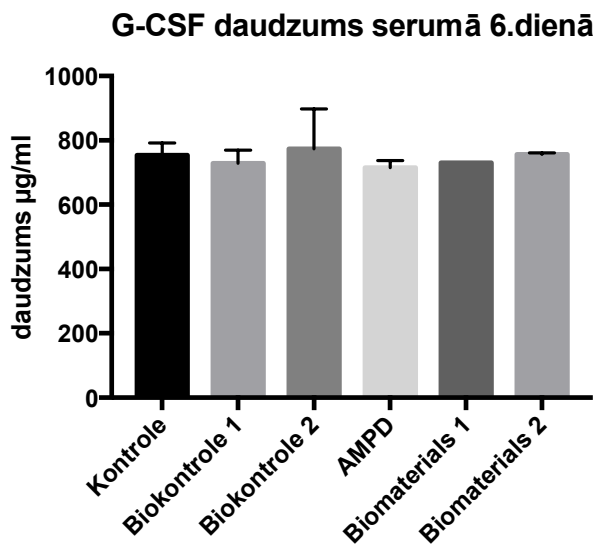
VEGF daudzums 6.dienā samazinājās gandrīz visas grupās, izņemot biokontroles 2 grupā (skat. 3.1.4.1.attēls), kas iespējams liecina, ka uzklātās vielas veicināja ātrāku asinsvadu un audu izveidotā brūcē.



3.1.4.1.attēls VEGF sekrēcijas izmaiņas žurku asinīs. Standartnovirzes apzīmētas ar kļūdu stabiņiem. Statistiski būtiskas atšķirības starp grupām noteica ar t-testu.. Atšķirības attiecībā pret kontroli pie būtiskuma līmeņa $p < 0,05$ apzīmētas ar (*).

Granulocītu koloniju stimulējošais faktors (G-CSF) ir nozīmīgs citokīns, kura uzdevums ir kontrolēt neitrofilo leikocītu producēšanu. To izmantošana intensīvā ķīmijterapijā, lai ārstētu iegūtu un iedzimtu neitropēniju mobilizētu hematopoētiskās cilmes šūnas pirms cilmes šūnu pārstādīšanas no vesela donora (Dale, 2007; Touw *et al.*, 2007).

Abās divās paraugu ievākšanas dienās, proti, 6. un 12.dienā, G-SCF daudzums ir saglabājas kontroles līmeni (skat. 3.1.4.1.attēls).



3.1.4.1.attēls **G-CSF** sekrēcijas izmaiņas žurku asinīs. Standartnovirzes apzīmētas ar kļūdu stabiņiem. Nav statistiskas atšķirības starp grupām.

3.2. Aktīvās vielas akūtas devas metožu analīze ICR pelēm

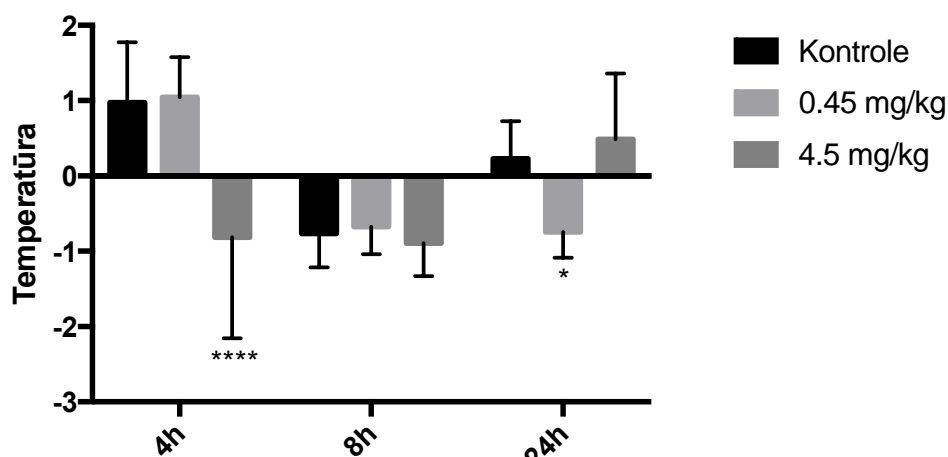
3.2.1. Rektālās temperatūras un ķermeņa svara izmaiņas pēc i.v. aktīvās vielas akūtas devas ievadīšanas

Kā jau tika aprakstīts materiālu un metodes daļā, peles tika atlasītas trīs grupās:

- Kontroles grupa, kurai ievadīja PBS;
- AMPD grupa, kurai ievadīja devā 0,45 mg/kg aktīvās vielas
- AMPD grupa, kurai ievadīja devā 4,5 mg/kg aktīvās vielas

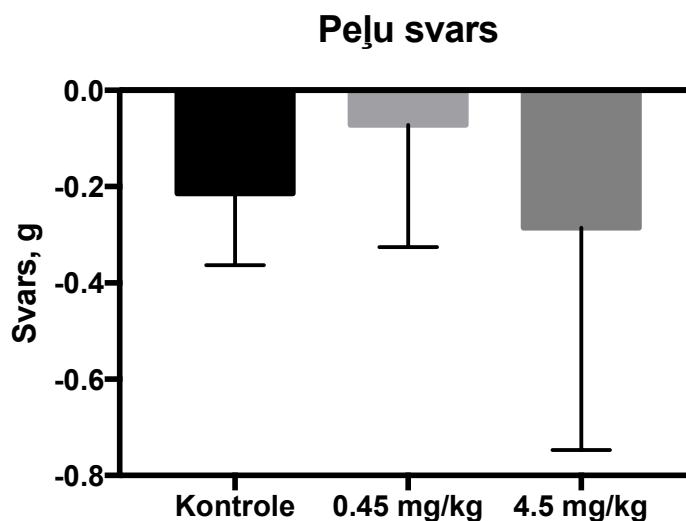
Pirms aktīvās vielas ievadīšanas katrai peļu grupai tika izmērīta sākuma rektālā temperatūra. Turpmāk rektālās temperatūras mērīšana, atbilstoši izvēlētajam laika posmam, tika veikta pēc 2, 4, 8 un 24 stundām.

Pēc 4 stundām, salīdzinot ar kontroli, AMPD zemās devas grupā (0,45 mg/kg) ir novērojams temperatūras pieaugums (skat.3.2.1.1.attēls), bet AMPD augstās devas grupā (4,5 mg/kg) statistiskas atšķirības ($p=0,0001$) – samazinājums. Pretēji notika pēc 24 stundām – temperatūra AMPD zemās devas grupā (0,45 mg/kg) statistiski ticami samazinās ($p=0,0199$), bet AMPD augstās devas grupā (4,5 mg/kg) palielinās. Pēc 8 stundām visu trīs peļu temperatūras izlīdzinās.



3.2.1.1.attēls Rektālās temperatūras mērījums ICR pelēm. P vērtība: * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ un **** $p < 0,0001$.

Peles tika nosvērtas sākumā un turpmāk, atkarībā no izvēlētās grupas, pēc 2, 4, 8 un 24 stundām. Peles sverot pēc 24 stundām (skat. 3.2.1.2. attēls), AMPD grupai, kurai tika ievadīta 0,45 mg/kg aktīvās vielas, svars praktiski neizmainījās, salīdzinot ar sākuma svaru. Otrajā AMPD grupā, kurai ievadīja 4,5 mg/kg aktīvās vielas, un kontroles grupā peļu svars nedaudz nokritās, tomēr rezultātu tas neieteikmēja, tā kā izmaiņas bija minimālas.



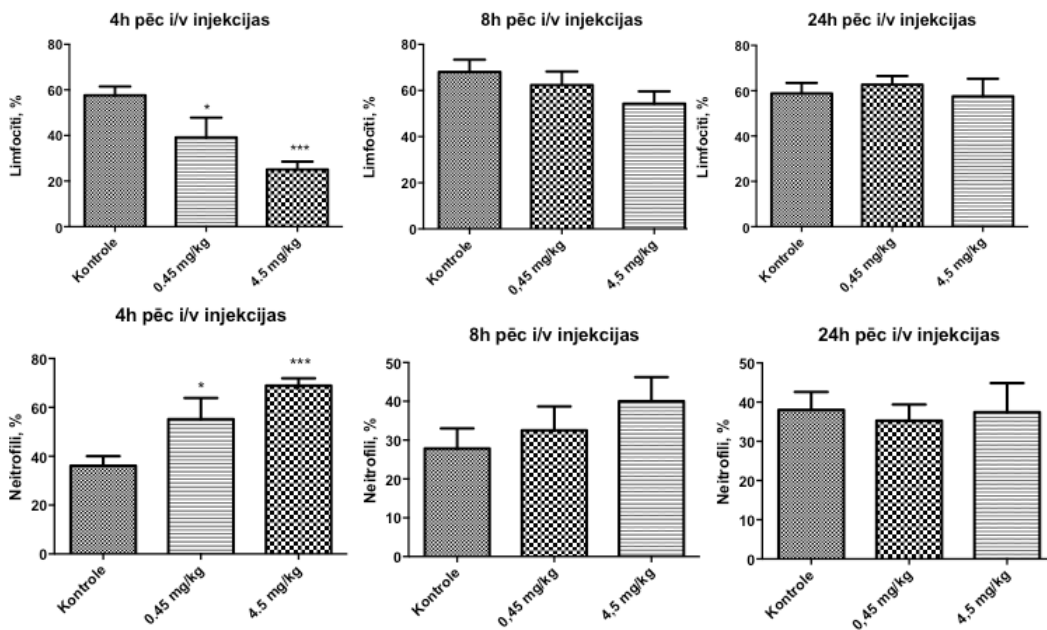
3.2.1.2.attēls Peļu svara izmaiņas 24 h laikā. Standartnovirzes apzīmētas ar kļūdu stabiņiem. Nav statistiskas atšķirības starp grupām.

3.2.2. Ietekme uz limfocītu un neitrofilu skaitu

AMPD izraisa strauju un spēcīgu imūnreakciju, kas ir regulēta ilgtermiņā. Četras stundas pēc i/v injekcijas, ievērojamas izmaiņas limfocītu un neitrofilu skaitā tika konstatētas (*skat. 3.2.2.1.attēls*). Salīdzinot ar kontroli, limfocītu skaits uz asins uztripes statistiski ticami samazinājās par 32,49 %, AMPD augstās devas (4,5 mg/kg) gadījumā ($p=0,0005$) un par 18,46% AMPD zemās devas (0,45 mg/kg) gadījumā ($p=0,0479$).

Pretēji notika ar neitrofilu skaitu, tas statistiski ticami palielinājās par 32,72% augstākā devā (4,5 mg/kg) ($p=0,0004$) un 19,04% zemākā devā (0,45 mg/kg) ($p=0,0429$).

Izmaiņas 8 stundas pēc injekcijas bija mazāk izteiktas salīdzinājumā ar atbildi pēc 4 stundām, tomēr neliela tendence uz devas atkarīgais limfocītu skaita samazinājums un neitrofilu skaita palielinājums tika noteikts. 24 h laikā limfocītu un neitrofilu skaits atgriezās kontroles līmenī.

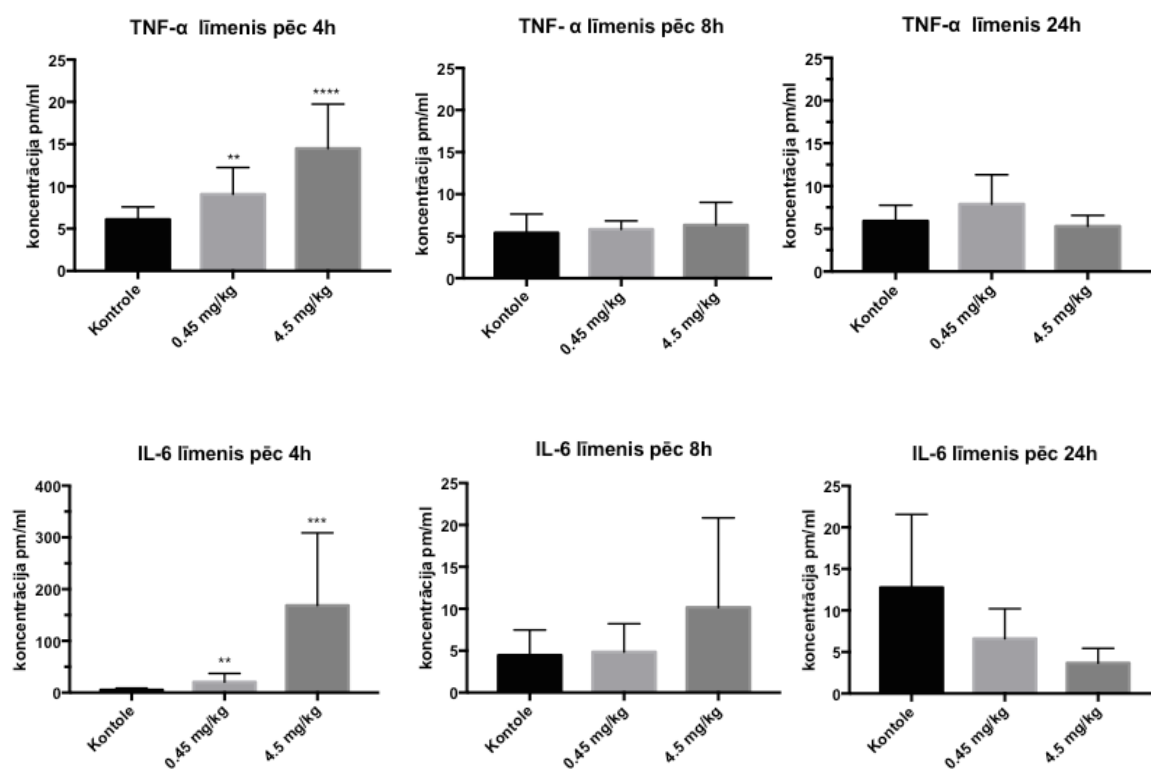


3.2.2.1.attēls Ietekme uz limfocītu un neitrofilu skaitu ICR pelēm pēc AMPD i.v ievadišanas. Standartnovirzes apzīmētas ar kļūdu stabiņiem. Dati analizēti ar t testu. Atšķirības attiecībā pret kontroli pie būtiskuma līmeņa $p < 0,05$ apzīmētas ar (*) un $p < 0,001$ ar (***)

3.2.3. Izmaiņas citokīnu līmenī peļu asins plazmā pēc 4h, 8h un 24h pēc AMPD i.v.

Citokīnu analīze peļu plazmā trijos dažādos laika posmos pēc i/v AMPD ievades -4h, 8h un 24h laikā atklāja, ka analizēto citokīnu, tas ir, IL-6 un TNF- α , sekrēcija ievērojami palielinājās četras stundas pēc injekcijas (skat. 3.2.3.1.attēls), kas ir saistīta ar izmaiņām neitrofilu un limfocītu skaitā.

IL-6 sekretē makrofāgi un T-limfocīti, lai stimulētu imūno atbildi, piemēram, infekcijas laikā un pēc traumas, īpaši apdeguma vai citu audu bojājumu rezultātā, kas veicina iekaisumu. IL-6 ir inhibējoša iedarbība uz TNF- α un IL-1, taču tas aktivizē IL-1ra un IL-10 (Lotz, 1995).



3.2.3.1.attēls IL-6 un TNF- α līmenī peļu asins plazmā pēc 4h, 8h un 24h pēc AMPD i.v.

Dati analizēti ar t testu. P vērtība: *p < 0,05, ***p < 0,001 un ****p < 0,0001.

Pēc 4 stundām TNF- α un IL-6 sekrēcija statistiski ticami palielinājās abu glikoproteīna devu grupās.

Pēc 8 stundām TNF- α sekrēcija saglabājas kontroles līmenī, bet IL-6 sekrēcija pieauga AMPD augstās devas gadījumā (4,5 mg/kg), bet glikoproteīna zemā devā -saglabājās kontroles līmenī.

Pēc 24 stundām TNF- α sekrēcija saglabājās kontroles līmenī, bet IL-6 gadījumā abu glikoproteīna devu grupās novērojams samazinājums.

SECINĀJUMI

1. Diabēta brūču modelī sākot ar 2.dienu AMPD, biomateriāls 1 (nekroslinkota HA + AMPD), biomateriāls 2 (kroslinkota un nekroslinkota HA + AMPD) parādīja brūču uzlabojumus un šī pozitīvā dzīšanas dinamika saglabājas līdz pētījuma beigām.
2. 6.dienā VEGF sekrēcijas līmeņi samazinājās visās grupās, izņemot biokontroli 2, bet G-CSF sekrēcijas līmeņi gan 6.dienā, gan 12.dienā saglabājās kontroles līmenī.
3. Analizētie CTGF līmeņi žurku eksudātos 2.dienās saglabājās kontroles līmenī, bet 4.dienā tie samazinājās sekojošās grupās:AMPD, biomateriāls 1 un biomateriāls 2.
4. Pēc AMPD aktīvās vielas divu atšķirīgu lielu devu akūta i.v. ievadīšanas *ICR* pelēm tika novērotas svara un temperatūras izmaiņas.
5. Citokīnu līmeņi peļu pēc akūtas toksicitātes noteikšanas asins plazmā palielinājās pēc 4h, bet pēc 8h un 24h analizēto citokīnu līmenis atgriezās kontroles līmenī.
6. Limfocītu un neitrofilu skaita izmaiņām peļu asins plazmā pēc 4h korelē ar citokīnu pieaugumu.
7. Dabīgais immunomodulators ir drošs un efektīvs diabētisko brūču dzīšanā, jo lokāli un sistēmiski neizraisa iekaisuma reakciju.

LITERATŪRAS AVOTI

1. **Acosta JB, Barco DG, Vera DC, Savigne W, Lopez-Saura P, Guillen Nieto G.** The pro-inflammatory environment in recalcitrant diabetic foot wounds. *International wound journal*. 2008;5:530-9.
2. **Albertson S, Hummel RP, Breeden M, Greenhalgh DG.** PDGF and FGF reverse the healing impairment in protein-malnourished diabetic mice. *Surgery*. 1993;114:368–72.
3. **Bosiers M, Peeters P, Elst FV, Vermassen F, Maleux G, Fourneau I, Massin H.** Excimer laser assisted angioplasty for critical limb ischemia: results of the LACI Belgium Study. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2005; 29(6):613-9.
4. **Blakytyn R, Jude EB.** Altered molecular mechanisms of diabetic foot ulcers. *Int J Low Extrem Wounds*. 2009;8:95-104.
5. **Bloomgarden ZT.** The diabetic foot. *Diabetes care*.2008;31:372-6.
6. **Bradham DM, Igarashi A, Potter RL, Grotendorst GR.** Connective tissue growth factor: a cysteine-rich mitogen secreted by human vascular endothelial cells is related to the SRC-induced immediate early gene product CEF-10. *Journal of Cell Biology*.1991; 114: 128–129.
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. **Brem H, Sheehan P, Rosenberg HJ, Schneider JS, Boulton AJ.** Evidence-based protocol for diabetic foot ulcers. *Plast Reconstr Surg*. 2006;117(7 Suppl):193S–209.
9. **Brem H, Tomic-Canic M.** Cellular and molecular basis of wound healing in diabetes. *The Journal of clinical investigation*. 2007;117:1219-22.
10. **Comerota AJ.** Intermittent pneumatic compression: physiologic and clinical basis to improve management of venous leg ulcers. *J Vasc Surg*. 2011;53(4):1121–9.
11. **Dale DC.** Colony-stimulating factors for the management of neutropenia in cancer patients. *Drugs*. 2002; 62(1): 1–15.
12. **Duinslaeger L, Verbeken G, Reper P, Delaey B, Vanhalle S, Vanderkelen A.** Lyophilized keratinocyte cell lysates contain multiple mitogenic activities and stimulate closure of meshed skin auto-graft-covered burn wounds with efficiency to that of fresh allogeneic keratinocyte cultures. *Plast Reconstr Surg*. 1994;98:110–7.

13. **Ehrenreich M, Ruszczak Z.** Update on tissue-engineered biological dressings. *Tissue Eng.* 2006;12:1–18.
14. **Enoch S, Leaper DJ.** Basic science of wound healing. *Surgery.* 2005;23,37–42.
15. **Enoch S, Leaper DJ.** Basic Science of wound healing. *Surgery.* 2008;26:31-7.
16. **Faglia E, Mantero M, Caminiti M, Caravaggi C, De Giglio R, Pritelli C, Clerici G, Fratino P, De Cata P, Dalla Paola L, Mariani G, Poli M, Settembrini P.G, Sciangula L, Morabito A, Graziani L.** Extensive use of peripheral angioplasty, particularly infrapopliteal, in the treatment of ischaemic diabetic foot ulcers: clinical results of a multicentric study of 221 consecutive diabetic subjects. *J Intern Med.* 2002; 252(3):225-32.
17. **Falanga V.** Wound healing and its impairment in the diabetic foot. *Lancet.* 2005;366:1736–43.
18. **Gill AL, Bell CN.** Hyperbaric oxygen: its uses, mechanisms of action and outcomes. *Q J Med.* 2004;97:385–95.
19. **Ip M, Lui SL, Poon VKM, Lung I, Burd A.** Antimicrobial activities of silver dressings: an in vitro comparison. *J Med Microbiol.* 2006;55:59–63.
20. **Liu Y, Min D, Bolton T, Nube V, Twigg SM, Yue DK.** Increased Matrix Metalloproteinase-9 predicts poor wound healing in diabetic foot ulcers. *Diabetes care.* 2009;32:137.
21. **Lacci KM, Dardik A.** Platelet-rich plasma: support for its use in wound healing. *Yale J Biol Med.* 2010;83(1):1–9.
22. **Li J, Mookerjee B, Wagner J, Flomenberg N.** In vitro methods for generating highly purified EBV associated tumor antigen-specific T cells by using solid phase T cell selection system for immuno- therapy. *J. Immunological Methods.* 2007;328:19–181.
23. **Límová M.** Active wound coverings: bioengineered skin and dermal substitutes. *Surg Clin North Am.* 2010;90(6):1237–55.
24. **Lobmann R, Zemlin C, Motzkau M, Reschke K, Lehnert H.** Expression of matrix metalloproteinases and growth factors in diabetic foot wounds treated with a protease absorbent dressing. *Journal of Diabetes and its Complications.* 2006;20:329-35.
25. **Moor AN, Vachon DJ, Gould LJ.** Proteolytic activity in woun fluids and tissues derived from chronic venous leg ulcers. *Wound Repair and Regeneration.* 2009,17: 832-839.
26. **Muller M, Trocme C, Lardy B, Morel F, Halimi S, Benhamou PY.** Matrix metalloproteinases and diabetic foot ulcers: the ratio of MMP-1 to TIMP-1 is a predictor

- of wound healing. *Diabetic medicine*. 2008;25:419–26.
27. **Nazimek-Siewniak B, Moczulski D, Grzeszczak W.** Risk of macrovascular and microvascular complications in Type 2 diabetes: results of longitudinal study design. *J Diabetes Complications*. 2002; 16(4):271-6.
 28. **Nikolajeva V, Eze D, Artjuha M, Mikažāns I, Petriņa Z, Antonoviča L, Babarikins D, Muiznieks 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.
 29. **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.
 30. **Nuccitelli R.** A role for endogenous electric fields in wound healing. *Curr Top Dev Biol*. 2003;58:1–26.
 31. **O’Neal L.** The Diabetic Foot. 7th ed. *Mosby: Maryland Heights*; 2008. p. 34. 190-192, 24, 31, 350-351, 405.
 32. **Pierce GF.** Role of platelet-derived growth factor in wound healing. *J Cell Biochem*. 1991;45(4):319–26.
 33. **Purna S, Babu M.** Collagen based dressings - A review. *Burns*. 2000;26:54–62.
 34. **Rathur HM, Bloulton AJM.** Recent advances in the diagnosis and management of diabetic neuropathy. *The Journal of Bone and Joint Surgery*. 2005;87:1605-10.
 35. **Rodero MP, Khosrotehrani K.** Skin wound healing modulation by macrophages. *Int J Clin Exp Pathol*. 2010; 25;3(7):643-53.
 36. **Saxena V, Hwang CW, Huang S.** Vacuum-assisted closure: microdeformations of wounds and cell proliferation. *Plast Reconstr Surg*. 2004;114(5):1086–96.
 37. **Schreml S, Szeimies R, Prantl L, Landthaler M, Babilas P.** Wound healing in 21st century. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2010;63:866-81.
 38. **Singer AJ, Clark RA.** Cutaneous wound healing. *The New England journal of medicine*. 1999;341:738-46.
 39. **Silva L, Carvalho E, Cruz MT.** Role of neuropeptides in skin inflammation and its involvement in diabetic wound healing. *Expert Opin Biol Ther*. 2010;10:1427-39.
 40. **Snyder BJ, Waldman BJ.** Venous thromboembolism prophylaxis and wound healing in patients undergoing major orthopedic surgery. *Advances in skin and wound care*. 2009;22:311-5.
 41. **Stratton IM, Adler AI, Neil HA, Matthews DR, Manley SE, Cull CA, Hadden D,**

- Turner RC, Holman RR.** Association of glycaemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 35): prospective observational study. *BMJ.* 2000; 12; 321(7258):405-12.
42. **Stojadinovic O, Brem H, Vouthounis C, Lee B, Fallon J, Stallcup M.** Molecular pathogenesis of chronic wounds: The role of beta-catenin and c-myc in the inhibition of epithelialization and wound healing. *Am J Pathol.* 2005;167:59–69.
43. **Stojadinovic OKA, Golinko M, Tomic-Canic M, Brem H.** A novel, non-angiogenic mechanism of VEGF: stimulation of keratinocyte and fibroblast migration. *Wound Repair and Regeneration.* 2007:30.
44. **Trocciola SM, Chaer R, Dayal R, Lin SC, Kumar N, Rhee J, Pierce M, Ryer EJ, McKinsey J, Morrissey NJ, Bush HL, Kent KC, Faries PL.** Comparison of results in endovascular interventions for infrainguinal lesions: claudication versus critical limb ischemia. *Am Surg.* 2005; 71(6):474-9.
45. **Tsirogianni AK, Moutsopoulos NM, Moutsopoulos HM.** Wound healing: Immunological aspects. *Injury.* 2006; 37:5-22.
46. **Wilgus TA.** Immune cells in the healing skin wound: Influential players at each stage of repair. *Pharmacological Research.* 2008; 58:112-116.
47. **Yosimichi G, Nakanishi T, Nishida T, Hattori T, Takano-Yamamoto T, Takigawa M.** Ctgf/hcs24 induces chondrocyte differentiation through a p38 mitogen-activated protein kinase (p38mapk), and proliferation through a p44/42 mapk/extracellular-signal regulated kinase (erk). *European Journal of Biochemistry.* 2001; 268, 658–665.
48. **Zhao M.** Electrical signals control wound healing through phosphatidylinositol-3-OH kinase- γ and PTEN. *Nature.* 2006;442:457–60.

PATEICĪBAS

Izsaku visdziļāko pateicību maģistra darba vadītājai asoc. prof. Dr. med. Baibai Jansonei par doto iespēju piedalīties šajā pētījumā, pretimnākošo attieksmi un lietderīgajiem ieteikumiem. Iespēja piedalīties šajā projektā ļāva man ieskatīties un labāk iepazīt zinātnes pasauli.

Liels paldies Latvijas Universitātes Bioloģijas fakultātes mikrobioloģijas un biotehnoloģijas katedras pētniecei Annai Ramatai-Stundai un pētniekam Mārtiņam Borodušķim par konsultācijām un palīdzību rezultātu analizēšanā.

Īpaši vēlos pateikties prof. Dr. habil. biol. Rutai Mucenieci par palīdzību, sapratni un sniegto atbalstu visu piecu studiju gadu garumā,

Pateicos visiem Latvijas Universitātes Medicīnas fakultātes docētājiem, kas studiju laikā pilnveidoja manas zināšanas farmācijas un citās ar to saistītās jomās. Atsevišķs liels paldies lietvedei Jutai Bārtulei par atsaucību un sapratni.

PIELIKUMI

ELISA metode

Metodi veica pēc reaģentu komplekta ražotāja (*Cloud-Clone Corp.*) rekomendācijām.

1. sagatavo 96-lauciņu ELISA plati un ar saistīšanās antivielu iepildīja 100 μL katrā no 96 – lauciņu plates. Plati pārklāja ar plēvi un inkubēja pa nakti istabas temperatūrā;
2. nākošā dienā plati mazgā trīs reizes mazgāja ar 200 μL mazgāšanas buferi (0,05% Tween 20/PBS);
3. katram lauciņam pievieno 300 μL bloķēšanas buferšķīdumu (1% BSA/PBS) un inkubē 1h istabas temperatūrā;
4. Plati mazgā 3 reizes ar 200 μL mazgāšanas buferi;
5. Katrā no plates lauciņiem (duplikātos) iepilda 100 μL parauga vai proteīnu standartus (2000 – 31,25 pg/mL), kas attiecīgi atšķaidīti ar 1% BSA/PBS, inkubē 2h istabas temperatūrā;
6. Plati mazgā 3 reizes ar 200 μL mazgāšanas buferi;
7. Katram lauciņam pievieno 100 μL detekcijas antivielu, kas ar 1% BSA/PBS atšķaidīta līdz koncentrācijai 200 ng/mL. Plati pārklāj ar adhezīvo plēvi un divas stundas inkubē istabas temperatūrā, pēc tam plati atkal mazgā;
8. Katram lauciņam pievieno 100 μL ar HRP saistītu streptavidīnu, kas attiecībā 1:200 atšķaidīts ar 1% BSA/PBS. Plati pārklāj ar adhezīvo plēvi un foliju un 20 min inkubē istabas temperatūrā. Pēc tam atkārti plates mazgāšanu;
9. Katram lauciņam pievieno 100 μL substrāta šķīduma (1:1, H_2O_2 : tetrametilbenzidīns), un plati 20 min inkubē istabas temperatūrā, pirms tam to pārklājot ar adhezīvo plēvi un foliju, pasargājot no gaismas;
10. Pēc inkubācijas krāsu reakciju apstādināja, katram lauciņam pievieno 50 μL 2N H_2SO_4
11. Nosaka proteīnu koncentrāciju, izmantojot mikroplašu spektrofotometru un nolasa katra lauciņa optisko blīvumu pie gaismas viļņu garuma 450 nm.

Multipleks metode

Šī metode tika veikta pēc ražotāja rekomendācijām, balstoties uz komerciāli pieejamā reaģentu komplekta *Milliplex MAP kit* (Millipore, Vācija) protokola:

1. Sagatavo metodei nepieciešamos 25µL standartšķīdumus, kvalitātes kontroles vai analizējamus paraugus ;
2. Centrifugē mērāmos paraugus pie 12000 apgr./min 15 minūtes;
3. Sagatavo 96 – lauciņu plati, kuru mazgā 10 minūtes istabas temperatūrā uz kratītāja ar mazgāšanas buferi.
4. Buferi izlej, atbilstoši sapilina standartus, kvalitātes kontroles un paraugus;
5. Pievieno vorteksētu magnētisko lodīšu – analītu maisījumu, noslēdz plati ar optisko plēvi un foliju un inkubē to uz kratītāja uz visu nakti +4°C.
6. Plati uzliek un pietur uz speciālā magnēta, veicot mazgāšanu (200 µL) divas reizes un pēc tam to noņem;
7. Pievieno 25µL detekcijas antivielas katram lauciņam, plati atkal noslēdz ar optisko plēvi un foliju un inkubē 1 h uz kratītāja istabas temperatūrā.
8. Nenolejot detekcijas antivielas, pievieno 25µL streptavidīna-fikoeritrīna maisījumu. plati noslēdz ar optisko plēvi un foliju un inkubē 30 min uz kratītāja istabas temperatūrā.
9. Pēc inkubācijas plati mazgā divas reizes ar buferšķīdumu 200 µL, uzliekot plati uz magnēta;
10. Pievieno 125µL lodīšu nesējbuferi visiem lauciņiem un inkubē 5 min uz aktīvā plašu kratītāja;
11. Datus nolasa izmantojot Luminex 200 programmu.

