



**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΑΘΗΝΩΝ**

**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΚΟΣΜΗΤΟΛΟΓΙΑ – ΔΕΡΜΑΤΟΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑ**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ



**Προνόμφες *Lucilia sericata*: Αποστείρωση και Συμβολή τους στην
Επούλωση Πληγών - Πιλοτική Μελέτη σε Μυς**

ΝΙΚΟΛΑΟΣ Δ. ΓΙΑΛΛΟΥΣΗΣ

**Επιβλέπων: Ράλλης Μιχαήλ, Επίκουρος Καθηγητής, Τομέας Φαρμακευτικής
Τεχνολογίας, Τμήμα Φαρμακευτικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Εθνικό και
Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών**

ΑΘΗΝΑ 2018

Στην ιερή μνήμη του παππού μου
με ευλάβεια

ΕΠΙΒΑΛΕΙΩΝ

Ράλλης Μιχαήλ

Επίκουρος Καθηγητής, Τομέας Φαρμακευτικής Τεχνολογίας, Τμήμα Φαρμακευτικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Ράλλης Μιχαήλ

Επίκουρος Καθηγητής, Τομέας Φαρμακευτικής Τεχνολογίας, Τμήμα Φαρμακευτικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Ρούσσης Βασίλειος

Καθηγητής, Τομέας Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων, Τμήμα Φαρμακευτικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Ιωάννου Ευσταθία

Επίκουρη Καθηγήτρια, Τομέας Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων, Τμήμα Φαρμακευτικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σύμφωνα με τα στοιχεία της Διεθνούς Ομοσπονδίας Διαβήτη (International Diabetes Federation) τα ποσοστά εκδήλωσης της ασθένειας σχεδόν θα διπλασιαστούν την επόμενη τριακονταετία. Το 15% των διαβητικών ασθενών εμφανίζει διαβητικό πόδι το οποίο θεωρείται μία από τις σημαντικότερες επιπλοκές της νόσου. Το 11% των ασθενών με διαβητικό πόδι υφίσταται ακρωτηριασμό. Σημαντικότερος λόγος δυσκολίας στην επούλωση του διαβητικού ποδιού είναι η μόλυνση των πληγών, η οποία σε ποσοστό υψηλότερο του 50% αποτελεί την κύρια αιτία ακρωτηριασμού του άκρου ποδός. Η ιατρική φροντίδα του διαβητικού ποδιού με τη χρήση αντιβιοτικών και σχετικών επιθεμάτων δε μπορεί να φέρει το επιθυμητό αποτέλεσμα δίχως την έγκαιρη αφαίρεση του νεκρωτικού και μολυσματικού ιστού.

Για την αφαίρεση του νεκρωτικού ιστού, την καταπολέμηση σε πολλές περιπτώσεις των μολύνσεων αλλά και τη διέγερση της επουλωτικής δραστηριότητας, από τις αρχές της δεκαετίας του 1990, ακολουθείται εκ νέου η μέθοδος εφαρμογής των προνυμφών της μύιας *Lucilia (Phaenicia) sericata* (Diptera: Calliphoridae) απευθείας σε πληγές. Η ανωτέρω μέθοδος θεωρείται ότι υπερέρχει του χειρουργικού καθαρισμού για την απομάκρυνση ιστικών ρακών και μικροβίων καθώς οι προνύμφες δρουν μικροχειρουργικά χωρίς να θίγουν τον υγιή ιστό με συνέπεια σημαντικό κέρδος στο χρόνο επούλωσης. Ακόμη, οι προνύμφες της *L. sericata* δε διεισδύουν στα εσωτερικά όργανα, αναπτύσσονται ταχέως, δεν εμφανίζουν εξειδίκευση στον ξενιστή, μπορούν εύκολα να εκτραφούν *in vitro* ενώ σημαντικό για τη χρήση τους είναι το ότι επιβιώνουν σε περιβάλλον στείρο μικροβίων.

Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκαν αλλά και ελέγχθηκαν αρχικά 3 δοκιμασίες αποστείρωσης με σκοπό την παραγωγή αποστειρωμένων προνυμφών ακολουθώντας διεθνές πρωτόκολλο. Στην 4^η και τελευταία δοκιμασία αποστείρωσης, ο έλεγχος της διαδικασίας πραγματοποιήθηκε με βάση τα πρότυπα της Ευρωπαϊκής Φαρμακοποιίας για τα στείρα προϊόντα. Ακολούθησε πρόκληση σακχαρώδους διαβήτη τύπου 1 σε 40 αρσενικούς μυς τύπου SKH-hr1 με τη χορήγηση στρεπτοζοτοκίνης (STZ). Σκοπός του πειράματος αυτού είναι η δημιουργία πειραματικού προτύπου διαβητικού μυός για την απευθείας εφαρμογή των προνυμφών της *L. sericata*.

Έπειτα από τη μη ανάπτυξη μικροοργανισμών και κατά τους 4 ελέγχους των δοκιμασιών αποστείρωσης, το πρωτόκολλο αποστείρωσης υιοθετήθηκε. Μετά από μια δεύτερη σειρά ενέσεων STZ, τα ζώα θεωρήθηκαν διαβητικά. Προδοκιμαστική εφαρμογή αποστειρωμένων προνυμφών της *L. sericata* σε 3 μη διαβητικούς μυς κατέδειξε τη σημασία του σχηματισμού του κίτρινου ινώδους ιστού στον πυθμένα του έλκους έτσι ώστε να διασφαλιστεί η βιωσιμότητά τους και να εκτιμηθεί καλύτερα η δράση τους στο συγκεκριμένο ζωικό πρότυπο.

ABSTRACT

According to the International Diabetes Federation, the prevalence of diabetes mellitus will double during the following 30 years. One of the most important complications of diabetes is the occurrence of diabetic foot ulcers, which appear on 15% of patients. Notably, 11% of patients with diabetic foot will undergo amputation. Microbial infection of ulcers is considered to significantly delay wound healing in diabetic patients. This may result in an amputation rate of 50%. To facilitate wound healing it is necessary to surgically remove necrotic tissue, since antibiotics and relevant dressings are insufficient to assist wound healing.

The application of *Lucilia (Phaenicia) sericata* (Diptera: Calliphoridae) larvae on wounds is an old method reemployed since the early 1990s. The maggots remove the necrotic tissue and they tend to increase wound healing and significantly decrease wound infection. This method is considered superior to surgical removal of necrotic tissue, as maggots clean the wound from tissue rags and microbes without affecting the healthy tissue. Consequently, the maggots' microsurgical efficiency increases wound healing. *L. sericata* larvae do not affect the host's inner organs, they can be easily bred, they do not have host selectivity and most importantly they can be bred in sterile environment which allows their therapeutic application on the wound bed.

In the present study, a sterilization process based on an international protocol was performed and assayed on 3 different occasions. The European Pharmacopoeia test for sterile preparations was also applied. Streptozotocin (STZ) was used to induce type 1 diabetes in 40 male SKH-hr1 mice in order to produce a diabetic mouse model treated with the larvae of *L. sericata*.

All 4 sterility tests turned negative and the sterilization protocol was adopted. After a second round of STZ injections, the mice were considered diabetic. A preliminary application of sterile *L. sericata* larvae on 3 non diabetic mice revealed the need of excessive sloughy tissue formation on the wound bed in order to guarantee the survival of the maggots and to be able to monitor their action on a murine model of wound healing.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η εργασία αυτή εκπονήθηκε στα εργαστήρια Φαρμακευτικής Τεχνολογίας του Τμήματος Φαρμακευτικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών. Στα πλαίσια αυτής της μελέτης νιώθω την ανάγκη να ευχαριστήσω πλήθος ανθρώπων δίχως τη συμβολή των οποίων το παρόν πόνημα δε θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί.

Θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στον Επίκουρο Καθηγητή Ράλλη Μιχαήλ του Τομέα Φαρμακευτικής Τεχνολογίας του Τμήματος Φαρμακευτικής, του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών για την ανάθεση της παρούσας μελέτης, την εμπιστοσύνη που μου έδειξε καθ' όλη τη διάρκειά της και για την υπομονετική καθοδήγηση και υποστήριξή του σε όλη την πορεία εκπόνησης της παρούσας εργασίας. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Ρούσση Βασίλειο και την Επίκουρη Καθηγήτρια Ιωάννου Ευσταθία του Τομέα Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων, του Τμήματος Φαρμακευτικής, του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών για τη συμμετοχή τους στην τριμελή επιτροπή για την ανάγνωση και αξιολόγηση της εργασίας. Στο σημείο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον κ. Ρούσση και τον συνεργάτη του Κλειδά Ιωάννη για την αρωγή τους σε πληθώρα ζητημάτων που προέκυψαν κατά τη διάρκεια των εργασιών και την ουσιαστική συμβολή τους στην υπερκέρταση εμποδίων που φάνταζαν ανυπέρβλητα.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή του Hebrew University of Jerusalem, Πρόεδρο της International Biotherapy Society και ειδικό σε θέματα MDT, Mumcuoglu Kosta Y.. Οι γνώσεις, οι συμβουλές και η προθυμία του αποτέλεσαν το πλέον ισχυρό κίνητρο για την ενασχόληση με το συγκεκριμένο αντικείμενο έρευνας.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στο μέλος Ε.ΔΙ.Π. του τμήματος Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών Τσαγκαράκη Αντώνιο για την παροχή των ωών της μυΐας *Lucilia sericata*. Ιδιαίτερα θέλω να ευχαριστήσω τη φοιτήτρια του ίδιου τμήματος και υπεύθυνη του Θερμοκηπίου Εντομολογίας του εργαστηρίου Γεωργικής Ζωολογίας και Εντομολογίας Αραποστάθη Ευαγγελία για την αγαστή συνεργασία, τις συμβουλές αλλά και την παροχή εκπαιδευτικού υλικού.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες στη Διευθύντρια Ερευνών Μυριαγκού Βιβή και στην Τεχνολόγο Ιατρικών Εργαστηρίων Σιατραβάνη Ειρήνη, του Εργαστηρίου Βακτηριολογίας του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ, καθώς επίσης και στον Αναπληρωτή Καθηγητή Μικροβιολογίας της Ιατρικής Σχολής Αθηνών Τζουβελέκη Λεωνίδα. Είναι σίγουρο ότι χωρίς τις συμβουλές, τις παραινέσεις, την παροχή τεχνογνωσίας αλλά την εκπαίδευση και τη φιλοξενία που προσέφεραν απλόχερα, η παρούσα εργασία δεν θα είχε καταστεί εφικτό να ξεκινήσει.

Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω τη βιοπαθολόγο ιατρό, Διευθύντρια του Μικροβιολογικού Εργαστηρίου του Γενικού Αντικαρκινικού-Ογκολογικού Νοσοκομείου Αθηνών «Άγιος Σάββας» Δρ Χήνου Ευφροσύνη για τις πολύτιμες συμβουλές.

Ιδιαιτέρως θα ήθελα να ευχαριστήσω τη μικροβιολόγο ιατρό Δρ Καραπατά-Σωφρονά Γεωργία για την παραχώρηση πολύτιμου εξοπλισμού στο εργαστήριο αποστείρωσης των προνυμφών.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στην εταιρεία Neocell Pharmaceuticals για τη δωρεά ιδιοσκευάσματος Καναμυκίνης 25% δείχνοντας έμπρακτα τη στήριξή της σε νέες ερευνητικές προσπάθειες.

Επίσης, ευχαριστώ θερμά τον υποψήφιο διδάκτορα Βίτσο Ανδρέα για την πολύτιμη βοήθειά του τόσο σε εκπαιδευτικό, υλικό όσο και σε ηθικό επίπεδο.

Ευχαριστώ επίσης τον Επίκουρο Καθηγητή Καραλή Ευάγγελο του Τομέα Φαρμακευτικής Τεχνολογίας του Τμήματος Φαρμακευτικής, του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών για την απαραίτητη βοήθειά του σε τεχνικά ζητήματα.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ακόμα τις μεταπτυχιακές φοιτήτριες του τμήματος Φαρμακευτικής Καραμάνη Χριστίνα και Σημηριώτη Ελευθερία όπως και όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Δερματοφαρμακολογίας-Κοσμητολογίας.

Σε αυτό το σημείο δε θα πρέπει να ξεχάσω να ευχαριστήσω τον Σαρδάνη Αλέξανδρο για τον ζήλο που επέδειξε και τη βοήθεια που προσέφερε κατά τη διάρκεια των εργασιών.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω πάνω από όλα στους κοντινούς μου ανθρώπους, στους φίλους και ιδιαίτερα στην οικογένειά μου για την ηθική υποστήριξη, την κατανόηση και την ανεκτικότητα που επέδειξαν όλο αυτό το χρονικό διάστημα.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	11
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1	12
1. Ανατομία και Φυσιολογία Δέρματος.....	12
1.1 Εισαγωγή.....	12
1.2 Επιδερμίδα.....	13
1.2.1 Βασική ή βλαστική στιβάδα (Stratum Basale).....	13
1.2.2 Ακανθώδης στιβάδα (Stratum Spinosum).....	13
1.2.3 Κοκκιώδης στιβάδα (Stratum Granulosum).....	13
1.2.4 Διαυγής στιβάδα (Stratum Lucidum)	14
1.2.5 Κεράτινη στιβάδα (Stratum Corneum).....	14
1.3 Επιδερμική Ανανέωση	14
1.4 Μη Κερατινοποιημένα Επιδερμικά Κύτταρα.....	14
1.5 Δερμίδα ή Χόριο.....	15
1.5.1 Θηλώδες Χόριο	15
1.5.2 Δικτυωτό Χόριο.....	15
1.5.3 Συστατικά του χορίου.....	16
1.6 Υπόδερμα ή Υποδόριος ιστός	17
1.7 Αγγείωση.....	17
1.8 Νεύρωση.....	18
1.9 Τα εξαρτήματα του δέρματος.....	18
1.9.1 Τρίχες	18
1.9.2 Σμηγματογόνοι Αδένες.....	18
1.9.3 Ιδρωτοποιοί Αδένες.....	19
1.9.4 Όνυχες	19
1.10 Το δέρμα ως φραγμός.....	19
1.10.1 Άδηλη Απώλεια Ύδατος	19
1.10.2 Ενυδάτωση	20
1.10.3 Ελαστικότητα	20
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2	21
2. Επούλωση.....	21
2.1 Φυσιολογία Επούλωσης	21
2.2 Τρόποι Επούλωσης.....	21

2.2.1 Επούλωση κατά πρώτο σκοπό (Wound healing by first intention)	21
2.2.2 Καθυστερημένη επούλωση κατά πρώτο σκοπό (Delayed primary healing) ή επούλωση κατά τρίτο σκοπό (Wound healing by tertiary intention).....	22
2.2.3 Επούλωση κατά δεύτερο σκοπό (Wound healing by second intention).....	22
2.2.4 Επούλωση των μερικού πάχους τραυμάτων (Wound healing of partial thickness wounds)	22
2.3 Φάσεις Επούλωσης.....	22
2.3.1 Φάση 1. Αιμόσταση.....	23
2.3.2 Φάση 2. Φλεγμονή	24
2.3.3 Φάση 3. Πολλαπλασιασμός.....	27
2.3.4 Φάση 4. Αναδιαμόρφωση.....	31
2.4 Παράγοντες που επηρεάζουν την επούλωση πληγών	32
2.4.1 Τοπικοί παράγοντες.....	32
2.4.2 Συστηματικοί παράγοντες	34
2.5 Κατηγορίες Ελκών	43
2.6 Σακχαρώδης Διαβήτης και Δέρμα.....	44
2.6.1 Σακχαρώδης Διαβήτης	44
2.6.2 Διαβητικό Δέρμα	46
2.6.3 Ο επιδερμικός φραγμός στο διαβητικό δέρμα.....	47
2.6.4 Ινσουλίνη και Δέρμα	48
2.6.5 Διαβητικό Πόδι.....	48
2.6.6 Πειραματική πρόκληση Σ.Δ. σε μυς με ένεση στρεπτοζοτοκίνης (STZ)	51
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3	53
3. Τοπικά χορηγούμενοι φαρμακευτικοί παράγοντες για την επουλωτική διαδικασία.....	53
3.1 Εισαγωγή.....	53
3.2 Αντιμικροβιακοί παράγοντες.....	53
3.2.1 Αντισηπτικοί παράγοντες.....	54
3.2.2 Αντιβιοτικοί παράγοντες	54
3.3 Αιμοστατικοί παράγοντες.....	55
3.4 Αυξητικοί παράγοντες.....	55
3.5 Ένζυμα.....	56
3.5.1 Παπαΐνη – Ουρία.....	56
3.5.2 Κολλαγενάση.....	56
3.6 Μέθοδοι Debridement	57
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4.....	58
4. Καθαρισμός νεκρωτικού ιστού με τη χρήση προνυμών	58

4.1 Εισαγωγή.....	58
4.2 Ιστορική Αναδρομή.....	58
4.3 Η Βιολογία της Μυΐας <i>Lucilia sericata</i>	59
4.4 Προνύμφες και Ιατροδικαστική Εντομολογία.....	61
4.5 Προνύμφες και Επούλωση.....	61
4.5.1 Αποδοχή και Ενδείξεις.....	61
4.5.2 Ευνοϊκές ιδιότητες των προνυμφών της <i>L. sericata</i>	62
4.5.3 Μηχανισμοί Δράσης των Προνυμφών στην Πληγή.....	63
4.5.4 Τεχνικές Εφαρμογής.....	66
4.5.5 Δοσολογία.....	69
4.5.6 Δοσολογικό Σχήμα.....	70
4.5.7 Αντενδείξεις και Επιπλοκές.....	70
4.5.8 Κλινική Εφαρμογή.....	71
4.5.9 Η σημασία της αποστείρωσης των προνυμφών.....	72
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	77
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	78
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5.....	80
5. Υλικά και Μέθοδοι.....	80
5.1 Προετοιμασία Υλικών για Δοκιμασίες Αποστείρωσης.....	80
5.1.1 Παρασκευή διαλύματος NaClO 0,05% (IBS Newsletter #6, 2002).....	80
5.1.2 Παρασκευή διαλύματος CH ₂ O 5% (IBS Newsletter #6, 2002).....	80
5.1.3 Παρασκευή διαλύματος θειικής Πολυμυξίνης Β (IBS Newsletter #6, 2002).....	80
5.1.4 Παρασκευή διαλύματος θειικής Καναμυκίνης (IBS Newsletter #6, 2002).....	81
5.1.5 Παρασκευή αποστειρωμένου θρεπτικού μέσου για προνύμφες (IBS Newsletter #6, 2002).....	82
5.2 Διαδικασίες για την παραγωγή αποστειρωμένων προνυμφών.....	83
5.2.1 Πρωτόκολλο λήψης ωών της μυΐας <i>L. sericata</i>	83
5.2.2 Πρωτόκολλο αποστείρωσης των ωών (IBS Newsletter #6, 2002).....	84
5.3 1 ^η , 2 ^η και 3 ^η δοκιμασία αποστείρωσης.....	84
5.3.1 Αιματούχο Άγαρ.....	85
5.3.2 Σοκολατόχρωμο Άγαρ.....	86
5.3.3 Θειογλυκολικός Ζωμός.....	87
5.4 4 ^η δοκιμασία αποστείρωσης.....	88
5.4.1 Πρωτόκολλο συλλογής των προνυμφών από το θρεπτικό μέσο.....	88
5.4.2 Προδοκιμαστικός έλεγχος στειρότητας προνυμφών που συλλέχθηκαν από το μέσο.....	88

5.4.3 Δοκιμασία ελέγχου στειρότητας προνυμφών που συλλέχθηκαν από το μέσο κατά τα πρότυπα της Ευρωπαϊκής Φαρμακοποιίας (Ph. Eur. Sterility., 2005)	89
5.5 Διαδικασία παραλαβής των εκκρίσεων/απεκκρίσεων (E/A) των προνυμφών (Kahl et al., 2015).....	90
5.6 Πείραμα Αξιολόγησης Επουλωτικής Δράσεως των Προνυμφών της Μυΐας <i>Lucilia sericata</i> σε Πληγές Διαβητικών Μυών	91
5.6.1 Πειραματόζωα	91
5.6.2 Πρωτόκολλο πρόκλησης σακχαρώδους διαβήτη τύπου 1	91
5.6.3 Πρωτόκολλο μέτρησης επιπέδων γλυκόζης στο αίμα.....	92
5.7 Προδοκιμαστική εφαρμογή προνυμφών της μυΐας <i>L. sericata</i> σε μυς.....	93
5.7.1 Πειραματόζωα	93
5.7.2 Πρωτόκολλο πρόκλησης πληγών	93
5.7.3 Δοκιμασία δημιουργίας επιθέματος και εφαρμογής προνυμφών	93
5.7.4 Εκτίμηση των επιθεμάτων και της δράσης των προνυμφών	95
5.8 Φωτογραφικό Υλικό.....	95
5.9 Στατιστική επεξεργασία	95
5.10 Πίνακας εικόνων ωών και προνυμφών.....	96
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6	97
6. Αποτελέσματα	97
6.1 Επικύρωση μεθόδου χρήσεως δοχείου κεριού	97
6.2 Έλεγχος 1 ^{ης} δοκιμασίας αποστείρωσης (20 h) μετά την εκκόλαψη	98
6.2.1 Αιματούχο Άγαρ.....	98
6.2.2 Σοκολατόχρωμο Άγαρ.....	99
6.2.3 Θειογλυκολικός Ζωμός	100
6.3 Έλεγχος 2 ^{ης} δοκιμασίας αποστείρωσης (8 h) μετά την εκκόλαψη	101
6.3.1 Αιματούχο Άγαρ.....	101
6.3.2 Σοκολατόχρωμο Άγαρ.....	102
6.3.3 Θειογλυκολικός Ζωμός	103
6.4 Έλεγχος 3 ^{ης} δοκιμασίας αποστείρωσης (4 h) μετά την εκκόλαψη	104
6.4.1 Αιματούχο Άγαρ.....	104
6.4.2 Σοκολατόχρωμο Άγαρ.....	105
6.4.3 Θειογλυκολικός Ζωμός	106
6.5 Έλεγχος 4 ^{ης} δοκιμασίας αποστείρωσης (4 h) μετά την εκκόλαψη	107
6.5.1 Προδοκιμαστικός έλεγχος στειρότητας προνυμφών που συλλέχθηκαν από το μέσο	107
6.5.2 Έλεγχος στειρότητας προνυμφών που συλλέχθηκαν από το μέσο κατά τα πρότυπα της Ευρωπαϊκής Φαρμακοποιίας.....	108

6.6 Μετρήσεις των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα των μυών μετά τις ενέσεις στρεπτοζοτοκίνης (STZ)	110
6.6.1 Τιμές μετρήσεων επιπέδων γλυκόζης σε 40 μυς	110
6.7 Προδοκιμαστική εφαρμογή προνυμφών της μυΐας <i>L. sericata</i> σε μυς.....	113
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7	114
7. Συζήτηση	114
7.1 Επικύρωση μεθόδου χρήσεως δοχείου κεριού	114
7.2 Έλεγχος 1 ^{ης} δοκιμασίας αποστείρωσης (20 h) μετά την εκκόλαψη	114
7.2.1 Αιματούχο Άγαρ.....	114
7.2.2 Σοκολατόχρωμο Άγαρ.....	114
7.2.3 Θειογλυκολικός Ζωμός	115
7.3 Έλεγχος 2 ^{ης} δοκιμασίας αποστείρωσης (8 h) μετά την εκκόλαψη	115
7.4 Έλεγχος 3 ^{ης} δοκιμασίας αποστείρωσης (4 h) μετά την εκκόλαψη	115
7.5 Έλεγχος 4 ^{ης} δοκιμασίας αποστείρωσης (4 h) μετά την εκκόλαψη	116
7.5.1 Προδοκιμαστικός έλεγχος στεριότητας προνυμφών που συλλέχθηκαν από το μέσο	116
7.5.2 Έλεγχος στεριότητας προνυμφών που συλλέχθηκαν από το μέσο κατά τα πρότυπα της Ευρωπαϊκής Φαρμακοποιίας.....	116
7.6 Μετρήσεις των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα των μυών μετά τις ενέσεις στρεπτοζοτοκίνης (STZ)	117
7.7 Προδοκιμαστική εφαρμογή προνυμφών της μυΐας <i>L. sericata</i> σε μυς.....	118
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	119
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	121

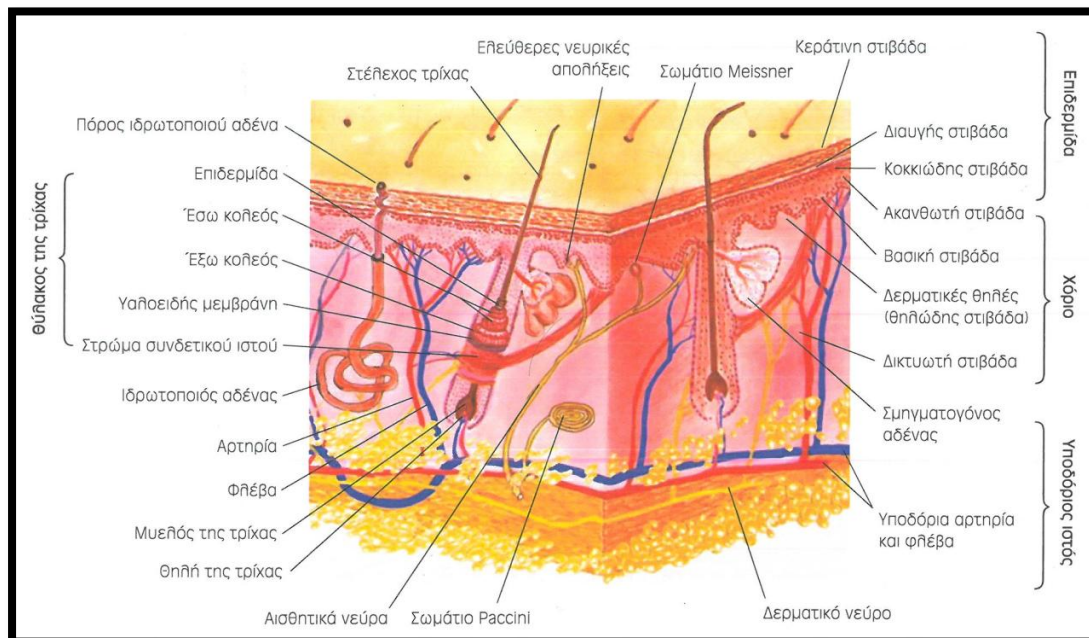
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

1. Ανατομία και Φυσιολογία Δέρματος

1.1 Εισαγωγή

Το δέρμα αποτελεί ένα εκτεταμένο όργανο που επενδύει την εξωτερική επιφάνεια του σώματος. Η δομή του διαφέρει από θέση σε θέση, ανάλογα με τις εξειδικευμένες λειτουργίες που επιτελεί (Stevens και Lowe, 2005). Η πλέον σημαντική του λειτουργία είναι ότι αποτελεί έναν σημαντικό φραγμό που παρεμβάλλεται ενεργά μεταξύ του οργανισμού και του περιβάλλοντος (Παπαϊωάννου, 2006). Προστατεύει από μηχανικές πιέσεις και την υπεριώδη ακτινοβολία. Εμποδίζει επίσης την είσοδο των μικροοργανισμών και αποτρέπει την αφυδάτωση μειώνοντας την απώλεια νερού από το σώμα. Έχει αισθητικούς υποδοχείς που μπορούν να ανιχνεύουν τη θερμότητα, το κρύο, την αφή, την πίεση και τον πόνο (Seeley et al., 2008). Η θερμοκρασία του σώματος ρυθμίζεται μέσω του ελέγχου της ροής του αίματος, μέσω του δέρματος και της δραστηριότητας των ιδρωτοποιών αδένων. Διαδραματίζει ακόμη, σημαντικό ρόλο στην παραγωγή βιταμίνης D (Seeley et al., 2008). Μικρές ποσότητες απεκκριτικών προϊόντων διατίθενται στην επιφάνεια του δέρματος μέσω των εκκρίσεων των αδένων (Seeley et al., 2008). Αποτελείται από 3 στιβάδες: την επιδερμίδα, το χόριο και τον υποδόριο ιστό (Stevens και Lowe, 2005).



Εικόνα: δομή και εξαρτήματα του δέρματος (Αντωνίου και Κατσάμπας, 2015)

1.2 Επιδερμίδα

Η επιδερμίδα αποτελεί την κύρια προστατευτική στιβάδα του δέρματος που βρίσκεται σε επαφή με το εξωτερικό περιβάλλον. Η επιδερμίδα δεν περιέχει αγγειακό ιστό και έχει πάχος που ποικίλει ανάμεσα σε 60-800μm, ανάλογα με το ανατομικό μέρος. Περιλαμβάνει 4 κύριες στιβάδες που στο μεγαλύτερο ποσοστό τους (95%) οι περισσότερες αποτελούνται από κερατινοκύτταρα. Στο παχύ δέρμα που χαρακτηρίζει τα πέλματα των ποδιών και στις παλάμες μπορούν να διακριθούν 5 στιβάδες αλλά στο υπόλοιπο σώμα που αποτελείται από λεπτό δέρμα διακρίνονται μόνο 4 στιβάδες (Martini et al., 1998).

1.2.1 Βασική ή βλαστική στιβάδα (Stratum Basale)

Η στιβάδα αυτή που λέγεται και στιβάδα αναπτύξεως (stratum germinativum) αποτελεί τη βαθύτερη στιβάδα της επιδερμίδας από την οποία προέρχονται όλα τα κερατινοκύτταρα. Τα περισσότερα από αυτά ωριμάζουν προοδευτικά για να σχηματίσουν τις υπόλοιπες 3 στιβάδες της επιδερμίδας. Ανάμεσα στα κύτταρα της βασικής στιβάδας βρίσκονται και διάσπαρτα μη κερατινοκύτταρα όπως μελανοκύτταρα και κύτταρα Merkel (Stevens και Lowe, 2005).

1.2.2 Ακανθώδης στιβάδα (Stratum Spinosum)

Καλείται έτσι γιατί τα κύτταρά της έχουν ακανθώδη εμφάνιση (Παπαϊωάννου, 2006). Αποτελείται από 8-10 σειρές κυττάρων (Seeley et al., 2008). Μαζί με τη βασική στιβάδα ονομάζονται μαλπιγιανή στιβάδα (Παπαϊωάννου, 2006). Τα κύτταρα της επιπολής στιβάδας των ακανθωτών κυττάρων είναι πιο αποπλατυσμένα από τα πολυεδρικά κύτταρα των εν τω βάθει στιβάδων. Τα στενά διάκενα μεταξύ των ακανθωτών κυττάρων καταλαμβάνονται από τις προεκβολές των μελανοκυττάρων και των κυττάρων του Langerhans (Stevens και Lowe, 2005).

1.2.3 Κοκκιώδης στιβάδα (Stratum Granulosum)

Την ακανθωτή στιβάδα διαδέχεται η ενδιάμεση κοκκιώδης. Αποτελείται από 2 έως 5 σειρές που περιέχουν πλατειά πολυγωνικά κύτταρα, με βασεόφιλα κοκκία που περιέχουν κερατοϋαλίνη, πρωτεΐνη πλούσια σε ιστιδίνη (Παπαϊωάννου, 2006; Seeley et al., 2008). Τα κερατινοσώματα παράγουν ένα σύμπλοκο υδροφοβικού φωσφολιπιδίου, το οποίο απελευθερώνεται κατά τη νέκρωση των επιφανειακών κοκκιωδών κερατινοκυττάρων. Το υλικό αυτό δρα πιθανώς ως συγκολλητική ουσία των φολιδών της κερατίνης. Το φωσφολιπίδιο αυτό καθιστά επίσης την επιφάνεια του δέρματος σχετικά αδιαπέραστη στο νερό (Παπαϊωάννου, 2006).

1.2.4 Διαυγής στιβάδα (Stratum Lucidum)

Στο παχύ δέρμα στις παλάμες και τα πέλματα, μια υαλώδης, διαυγής στιβάδα καλύπτει την κοκκιώδη στιβάδα. Αποτελείται από 3-5 σειρές νεκρών κυττάρων (Seeley et al., 2008). Τα κύτταρα αυτά είναι διάφανα, πεπλατυσμένα, πυκνά και είναι γεμισμένα με κερατίνη (Martini et al., 1998).

1.2.5 Κεράτινη στιβάδα (Stratum Corneum)

Η κεράτινη στιβάδα είναι επιφανειακή, σε άμεση επαφή με το εξωτερικό περιβάλλον. Αποτελείται από 25 και πλέον σειρές από νεκρά πεπλατυσμένα κύτταρα (Seeley et al., 2008). Στη στιβάδα αυτή τα κύτταρα έχουν χάσει τους πυρήνες τους και σχεδόν όλα τα κυτταροπλασματικά όργανα και στοιχεία, ακόμη και τα κοκκία κερατοϋαλίνης. Τα κύτταρα είναι επίπεδα και γεμάτα με κερατίνη, με τη μορφή δεσμίδων από ίνες (Παπαϊωάννου, 2006).

Αν και η κεράτινη στιβάδα είναι ανθεκτική στο νερό, παρ' όλα αυτά δεν είναι αδιάβροχη. Το νερό από τα διάμεσα κενά διεισδύει σιγά σιγά προς την επιφάνεια και εξατμίζεται στον περιβάλλοντα αέρα. Βλάβη στην επιδερμίδα και ιδιαίτερα στην κεράτινη στιβάδα μπορεί να αυξήσει το ρυθμό της κίνησης-εξάτμισης του νερού (Martini et al., 1998). Υπερβολική απώλεια νερού είναι επικίνδυνη και συνδέεται με ξηρότητα του δέρματος (Martini et al., 1998). Η κεράτινη στιβάδα έχει αναγνωρισθεί ως η κύρια περιοχή για την προστασία του δέρματος (Zhai και Maibach, 2002).

1.3 Επιδερμική Ανανέωση

Η κεράτινη στιβάδα στην επιφάνεια του δέρματος αποπίπτει συνεχώς. Αυτό οφείλεται στη φυσιολογική φθορά του δέρματος, λόγω εφαρμογής δυνάμεων τριβής και πίεσης στην επιφάνειά του (Stevens και Lowe, 2005). Γι' αυτό η κεράτινη στιβάδα αναπληρώνεται ανελλιπώς από την κοκκιώδη, η οποία με τη σειρά της επανακατοικείται αδιάκοπα από κύτταρα της ακανθωτής στιβάδας. Τα ακανθοκύτταρα παράγονται από τα πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα της βασικής στιβάδας (Stevens και Lowe, 2005). Η ανανέωση της επιδερμίδας καθώς και το πάχος της ποικίλει ανάλογα με την περιοχή. Ο χρόνος αποκατάστασης των κυττάρων για όλη την επιδερμίδα είναι 15-30 ημέρες, ανάλογα με την περιοχή του σώματος, την ηλικία και άλλους παράγοντες (Παπαϊωάννου, 2006).

1.4 Μη Κερατινοποιημένα Επιδερμικά Κύτταρα

Τα μελανοκύτταρα εντοπίζονται στη βασική στιβάδα και εφάπτονται με τη βασική μεμβράνη. Κύρια λειτουργία τους αποτελεί η παραγωγή μελανίνης, η οποία είναι υπεύθυνη για το χρώμα του δέρματος και ελαχιστοποιεί την ιστική καταστροφή από την υπεριώδη ακτινοβολία (Stevens και Lowe, 2005). Το χρώμα του δέρματος επιπλέον εξαρτάται από την έκταση των τριχοειδών αγγείων, τα ποσοστά της οξειδωμένης ή ανηγμένης αιμοσφαιρίνης σε αυτά και από την παρουσία

καροτενοειδών στα τοιχώματα των αιμοφόρων αγγείων και των περιβαλλόντων ιστών.

Τα κύτταρα του Langerhans βρίσκονται σε όλες τις στιβάδες της επιδερμίδας αλλά είναι εμφανέστερα στην ακανθωτή στιβάδα. Τα κύτταρα αυτά αναγνωρίζουν τα αντιγόνα αποτελώντας ένα σημαντικό στοιχείο ανοσολογικού συστήματος (Stevens και Lowe, 2005). Τα κύτταρα του Langerhans βρίσκονται σε μικρό αριθμό στο υγιές δέρμα αλλά σε πολλά χρόνια φλεγμονώδη νοσήματα αυξάνουν σε αριθμό, έκταση και πολυπλοκότητα όσον αφορά τις δενδριτικές τους αποφυάδες (Stevens και Lowe, 2005). Τα κύτταρα Merkel είναι σπάνια, βρίσκονται στη βασική στιβάδα και ανιχνεύονται δύσκολα στο φυσιολογικό δέρμα. Μπορούν να αναπτυχθούν μεμονωμένα ή σε αθροίσματα, σχηματίζοντας τους υποδοχείς της αφής (Stevens και Lowe, 2005).

1.5 Δερμίδα ή Χόριο

Το χόριο αποτελεί τον στηρικτικό ιστό της επιδερμίδας, μέσα στον οποίο βρίσκονται τα εξαρτήματα του δέρματος, τα αιμοφόρα και λεμφικά αγγεία και τα νεύρα. Αποτελείται από ινοβλάστες, ινοκύτταρα και τα εξωκυττάρια προϊόντα τους, κολλαγόνες και δικτυωτές ίνες, εξωκυττάρια θεμέλια ουσία (ECM) με γλυκοζαμινογλυκάνες, αιμοφόρα αγγεία και μικρό αριθμό μακροφάγων, λεμφοκυττάρων και σιτευτικών κυττάρων (Stevens και Lowe, 2005). Η εξωτερική επιφάνεια του χορίου έχει πολλές προεκβολές που ακολουθούν τις αναδιπλώσεις της επιδερμίδας και είναι περισσότερες σε δέρμα που βρίσκεται σε συχνή πίεση (Παπαϊωάννου, 2006). Το χόριο διακρίνεται σε θηλώδες και δικτυωτό.

1.5.1 Θηλώδες Χόριο

Το θηλώδες χόριο εντοπίζεται κοντά στην δερμοεπιδερμική συμβολή, είναι λεπτό και αποτελείται από χαλαρό συνδετικό ιστό (Παπαϊωάννου, 2006; Stevens και Lowe, 2005). Περιέχει λιγότερο ελαστίνη και κολλαγόνο αλλά περισσότερη θεμέλια ουσία σε σχέση με το δικτυωτό (Stevens και Lowe, 2005).

1.5.2 Δικτυωτό Χόριο

Το δικτυωτό χόριο αποτελεί το μεγαλύτερο μέρος του χορίου. Αποτελείται από πυκνό συνδετικό ιστό και ειδικότερα από εμφανείς πυκνές δεσμίδες κολλαγόνων ινών με παρεμβαλλόμενες επιμήκεις ελαστικές ίνες (Stevens και Lowe, 2005).

1.5.3 Συστατικά του χορίου

- **Κολλαγόνο (collagen)**

Το κολλαγόνο του δέρματος περιέχει μεγάλη ποσότητα γλυκίνης, προλίνης και υδροξυπρολίνης (Παπαϊωάννου, 2006).

- **Ελαστίνη (Elastin)**

Ίνες λεπτές και ευθείες που διακλαδίζονται ελεύθερα και μπορούν να επιμηκυνθούν κατά 100% ή και περισσότερο, αλλά επανέρχονται στο αρχικό τους μήκος όταν απομακρυνθεί το αίτιο που προκάλεσε την επιμήκυνση (Παπαϊωάννου, 2006).

- **Ρετικουλίνη (Reticulin)**

Λεπτές διακλαδισμένες ίνες, που αποτελούν το 0,4% του ξηρού βάρους του χορίου (Παπαϊωάννου, 2006).

- **Θεμέλια ουσία (Ground substance)**

Άμορφη ουσία μέσα στην οποία βρίσκονται οι ίνες και τα κύτταρα και αποτελείται από ποικιλία υδατανθράκων και πρωτεϊνών που ονομάζονται γλυκοπρωτεΐνες και όξινους πολυσακχαρίτες, κυριότεροι από τους οποίους είναι το υαλουρονικό οξύ και η θεική δερματίνη (θεική χονδροϊστίνη Β) (Παπαϊωάννου, 2006).

- **Ινοβλάστες (Fibroblasts)**

Προέρχονται από το μεσέγχυμα και είναι κύτταρα υπεύθυνα για τη σύνθεση της θεμέλιας ουσίας (συνθέτουν όξινους πολυσακχαρίτες και κολλαγόνο) (Παπαϊωάννου, 2006).

- **Ιστοκύτταρα (Mast cells)**

Περιέχουν και έχουν την ικανότητα να αποδεσμεύουν ηπαρίνη και ισταμίνη. Σε πολλές περιπτώσεις καταστροφής του δέρματος, παρατηρείται ρήξη των κυττάρων αυτών με απελευθέρωση των περιεχομένων κοκκίων και ισταμίνης, που είναι υπεύθυνη για φλεγμονές, ερεθισμούς και άλλες δερματικές διαταραχές (Παπαϊωάννου, 2006).

Οι ελαστικές ίνες διαθέτουν ικανότητα έκτασης και επαναφοράς στο αρχικό τους μήκος (Martini et al., 1998). Το δέρμα είναι ευέλικτο αλλά οι ίνες κολλαγόνου σταματούν το τέντωμα ώστε να μην προκύψει βλάβη στον ιστό (Martini et al., 1997). Η αφυδάτωση προκαλεί μια προσωρινή μείωση στην ελαστικότητα του δέρματος (Martini et al., 1998). Η γήρανση, οι ορμόνες και η υπερϊώδης ακτινοβολία μπορούν να επιφέρουν μόνιμη μείωση του ποσού της ελαστίνης στο χόριο, παραγωγή ρυτίδων και χαλάρωση του δέρματος (Martini et al., 1998).

1.6 Υπόδερμα ή Υποδόριος ιστός

Στον υποδόριο ιστό επεκτείνονται συνήθως διάφορα εξαρτήματα του δέρματος όπως τα κατώτερα τμήματα των επιμηκυμένων τριχοθυλακίων στο τριχωτό της κεφαλής, εκκρινείς και αποκρινείς αδένες (Stevens και Lowe, 2005). Ο υποδόριος ιστός αποτελείται στο μεγαλύτερο μέρος του από λιποκύτταρα που χωρίζονται από ινοκολλαγόνωδη διαφράγματα και περιέχει τα κύρια αιμοφόρα αγγεία και νεύρα, με τα οποία εφοδιάζεται η υπερκείμενη δερμίδα. Αυτός ο ιστός λειτουργεί ως θερμομονωτικό υλικό, ως διαμέρισμα αποθήκευσης θρεπτικών ουσιών και ως υλικό απορρόφησης των δονήσεων (Stevens και Lowe, 2005).

1.7 Αγγείωση

Η κυριότερη παροχή αίματος στο δέρμα βρίσκεται στη δερμίδα, προερχόμενη από τα μεγαλύτερα αγγεία του υποδόριου ιστού. Αναγνωρίζονται δύο χαρακτηριστικά πλέγματα: ένα βαθύ αγγειακό πλέγμα, στην κατώτερη δικτυωτή δερμίδα, κοντά στο όριο μεταξύ αυτής και του υποδόριου ιστού και ένα επιφανειακό αγγειακό πλέγμα, στο άνω δικτυωτό χόριο κοντά στη συμβολή με το θηλώδες. Αγκύλες μικρών αγγείων από το επιφανειακό αγγειακό πλέγμα κατευθύνονται προς την θηλώδη δερμίδα με μικρά τριχοειδικά αγγεία τοποθετημένα κοντά στη βασική μεμβράνη της επιδερμίδας. Τα αγγεία δε διαπερνούν την επιδερμίδα. Το χόριο περιέχει πολλές αρτηριοφλεβώδεις αναστομώσεις που περιλαμβάνουν πολύπλοκες εξειδικευμένες δομές, τα σπειροειδή σωμάτια (glomus bodies), τα οποία βρίσκονται κυρίως στα άκρα των δακτύλων. Η μεταβλητότητα της ροής του αίματος στη δερμίδα είναι σημαντική, όσον αφορά τη λειτουργία του δέρματος ως θερμορυθμιστικού οργάνου (Stevens και Lowe, 2005). Τα εξαρτήματα του δέρματος αιματώνονται από κλάδους των αγγείων, οι οποίοι συνδέουν τα βαθύτερα με τα επιφανειακότερα αγγειακά πλέγματα (Stevens και Lowe, 2005).

1.8 Νεύρωση

Το νευρικό δίκτυο του δέρματος βρίσκεται στη δερμίδα και αποτελείται από ένα πλούσιο αμύελο δίκτυο, προερχόμενο από το συμπαθητικό αυτόνομο νευρικό σύστημα, που περιλαμβάνει τους υποδοχείς της δερματικής αίσθησης. Η δερματική αίσθηση οφείλεται σε ένα αριθμό εξειδικευμένων και μη νευρικών απολήξεων. Οι ελεύθερες νευρικές απολήξεις είναι άφθονες και αποτελούν τους υποδοχείς του πόνου και της θερμότητας. Τα σωματίδια Pacini αποτελούνται από νευρικές απολήξεις που περιβάλλονται από κάψα, έχουν μια χαρακτηριστική δομή και αποτελούν υποδοχείς της πίεσης και, πιθανόν της δόνησης. Είναι τοποθετημένα συνήθως βαθιά στη δερμίδα ή στο υποδόριο λίπος των παλαμών και των πελμάτων. Τα σωματίδια Meissner είναι νευρικές απολήξεις με χαρακτηριστική δομή, που βρίσκονται στη θηλώδη δερμίδα. Είναι πιο άφθονα στα πόδια και στα χέρια και αποτελούν υποδοχείς της αφής. Τα κύτταρα Merkel και οι νευρικές τους συνδέσεις αποτελούν υποδοχείς, οι οποίοι μετατρέπουν το αισθητικό ερέθισμα της αφής (Stevens και Lowe, 2005).

1.9 Τα εξαρτήματα του δέρματος

Τα εξαρτήματα του δέρματος είναι τα νύχια, οι τρίχες και οι αδένες. Για την ακρίβεια πρόκειται για εξαρτήματα της επιδερμίδας, επειδή είναι επιθηλιακές δομές που προέρχονται εμβρυολογικά από την επιδερμίδα, ωστόσο βρίσκονται στο χόριο (εκτός από τα νύχια) ή ακόμη και μέσα στον υποδόριο ιστό σε ορισμένες ανατομικές περιοχές, όπως το πρόσωπο (Αντωνίου και Κατσάμπας, 2015).

1.9.1 Τρίχες

Οι τρίχες είναι επιμήκεις, κερατινοποιημένες δομές που προβάλλουν στην επιφάνεια του δέρματος. Απαντώνται σε όλη την επιφάνεια του δέρματος εκτός από τα πέλματα, τις παλάμες, την πύση και την ονυχοφόρο φάλαγγα των δακτύλων. Η μορφολογία και η κατανομή τους διαφέρει από άτομο σε άτομο και ανάλογα με το φύλο, την ηλικία και την ανατομική περιοχή του σώματος (Αντωνίου και Κατσάμπας, 2015; Burns et al., 2013; Prost-Squarcioni, 2006).

1.9.2 Σμηγματογόνοι Αδένες

Οι σμηγματογόνοι αδένες βρίσκονται στο χόριο και απαντώνται στο μεγαλύτερο μέρος του σώματος εκτός από τις παλάμες και τα πέλματα. Η συγκέντρωσή τους ανέρχεται σε $100/\text{cm}^2$, αλλά σε ορισμένες ανατομικές περιοχές μπορεί και να φθάσει τους $400-900/\text{cm}^2$. Αποτελούν μέρος της τριχοσμηγματογόνου μονάδας. Είναι ολοκρινείς αδένες που αποτελούνται από το αδενικό σώμα και τον εκφορητικό πόρο. Ο πόρος είναι βραχύς και ευρύς και συνήθως καταλήγει στην άνω μοίρα ενός τριχοθυλακίου. Οι σμηγματογόνοι αδένες αποτελούνται από επιθηλιακά κύτταρα τα οποία, καθώς πολλαπλασιάζονται, υφίστανται λιπώδη εκφύλιση. Στο τέλος τα κύτταρα αυτά διαρρηγνύονται και το προϊόν της διεργασίας αυτής είναι το σμήγμα

(έκκριμα των σμηγματογόνων αδένων). Ο ρόλος του σμήγματος είναι η λίπανση των τριχών, ώστε να διατηρείται η ελαστικότητά τους, η λίπανση του δέρματος για να προστατεύεται από τη τριβή καθώς και η αδιαβροχοποίησή του (Αντωνίου και Κατσάμπας, 2015; Burns et al., 2013; James et al., 2006).

1.9.3 Ιδρωτοποιοί Αδένες

Το δέρμα διαθέτει δύο τύπους ιδρωτοποιών αδένων, τους εκκρινείς και τους αποκρινείς. Ο αριθμός τους υπολογίζεται σε πάνω από 2 εκατομμύρια. Ανευρίσκονται σχεδόν σε όλη την επιφάνεια του δέρματος και σε μεγαλύτερη συγκέντρωση βρίσκονται σε μασχάλες, παλάμες, πέλματα και μέτωπο. Η νεύρωσή τους γίνεται από το συμπαθητικό νευρικό σύστημα, και συγκεκριμένα από χολινεργικές νευρικές ίνες. Η φυσιολογική λειτουργία των ιδρωτοποιών αδένων έγκειται στην παραγωγή του ιδρώτα που ελαττώνει τη θερμοκρασία του σώματος, μέσω της εξάτμισης (Αντωνίου και Κατσάμπας, 2015).

1.9.4 Όνυχες

Τα νύχια είναι αποπλατυσμένες, ελαφρώς κυρτές, κερατινοποιημένες πλάκες που καλύπτουν το μεγαλύτερο τμήμα της ραχιαίας επιφάνειας της τελικής φάλαγγας των δακτύλων και των ποδιών. Ο ρόλος των νυχιών έγκειται στην προστασία των ευαίσθητων και πολύ σημαντικών άκρων των δακτύλων, ενώ παίζουν ρόλο και στην αίσθηση της αφής (Αντωνίου και Κατσάμπας, 2015).

1.10 Το δέρμα ως φραγμός

Το δέρμα λειτουργεί ως φραγμός ενάντια στην απώλεια υγρών του σώματος, της διείσδυσης ουσιών ή λοιμοδών παραγόντων (Plessis et al., 2013). Η κεράτινη στιβάδα έχει αναγνωριστεί ως η κύρια περιοχή για την προστασία του δέρματος (Zhai και Maibach, 2002). Αφαίρεση τμημάτων της κεράτινης στιβάδας με τη χρήση κολλητικής ταινίας (tape stripping) μπορεί να αυξήσει τη διαπερατότητα της επιδερμίδας σε νερό και άλλα συστατικά περίπου κατά 1000 φορές (Walters και Roberts, 2002). Η άδηλη απώλεια νερού και η ενυδάτωση της επιδερμίδας έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως ως δείκτες στην αξιολόγηση της λειτουργίας του δέρματος ως φραγμού (Rogiers, 2001; Levin και Meibach, 2005; Serup et al, 2006; Darlenski et al., 2009; Kottner et al., 2013).

1.10.1 Άδηλη Απώλεια Ύδατος

Ως διαδερμική απώλεια ύδατος ή από του δέρματος άδηλη απώλεια νερού (Transepidermal Water Loss, TEWL) ορίζεται η μη συνειδητή και αντιληπτή αποβολή νερού από την επιδερμίδα προς το περιβάλλον με διαδικασίες διάχυσης μέσω της κεράτινης στιβάδας σε θερμοκρασία χαμηλότερη από αυτή της έναρξης της

ενεργητικής εφίδρωσης. Η κερατίνη στιβάδα λαμβάνει νερό μέσω διάχυσης από τους παρακείμενους ιστούς αλλά και μέσω των ιδρωτοποιών αδένων ενώ συνεχώς εξατμίζεται νερό στο περιβάλλον. Το νερό που συνεχώς χάνεται, αναπληρώνεται μέσω παθητικής διάχυσης από τα ενδότερα στρώματα με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση νερού προς την εξωτερική επιφάνεια όπου η συγκέντρωση του νερού είναι μικρότερη (Endo et al., 2007).

Έχει δειχθεί ότι όταν η ακεραιότητα του δερματικού φραγμού έχει υποστεί ζημιά τότε η άδηλη απώλεια νερού αυξάνεται (Endo et al., 2007; Farahmand et al., 2009). Η άδηλη απώλεια νερού θεωρείται δείκτης των μακροσκοπικών αλλαγών της κερατίνης στιβάδας ως φραγμού (Imhof et al., 2009).

1.10.2 Ενυδάτωση

Ο φυσικοί παράγοντες ενυδάτωσης που εντοπίζονται στην κερατίνη στιβάδα είναι αμινοξέα, πυρρολιδινο-καρβοξυλικό οξύ, ουρία, παράγωγα του γαλακτικού οξέος, αμμωνία, ουρικό οξύ, ανόργανα ιόντα, οργανικά οξέα, σάκχαρα κ.ά. και έχουν υγροσκοπικές ιδιότητες μεταφέροντας υγρασία από το περιβάλλον στο δέρμα. Η ενυδάτωση της κερατίνης στιβάδας επηρεάζει α) την ελαστικότητα και β) τη διαπερατότητα της κερατίνης από τις ουσίες που εφαρμόζονται τοπικά (Endo et al., 2007).

1.10.3 Ελαστικότητα

Οι συνολικές μηχανικές ιδιότητες του δέρματος εξαρτώνται κυρίως από τη φύση και την οργάνωση του χορίου, του δικτύου των κολλαγόνων και ελαστικών ινών, των πρωτεογλυκανών, του ποσοστού υγρασίας, την οργάνωση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας με επιπλέον κάποια συμβολή της σύστασης της επιδερμίδας και ιδιαίτερα της κερατίνης στιβάδας (Naylor et al., 2011; Bhushan et al, 2010). Αποτελούν σημαντικό χαρακτηριστικό της αντοχής του δέρματος σε βλάβη και δείκτη παθολογικών καταστάσεων (Bhushan et al, 2010).

Ως ελαστικότητα ορίζεται γενικά η ικανότητα ενός υλικού, όταν εφαρμόζεται δύναμη που μπορεί να αλλάξει είτε το μήκος, είτε τον όγκο, είτε το σχήμα του, να ανακτήσει την αρχική του μορφή όταν πάψει η εφαρμογή αυτής της δύναμης (Everett και Sommers, 2013). Ως ελαστικότητα δέρματος (SE) ορίζεται η ικανότητα του δέρματος να ανακτήσει το σχήμα του αφότου τεντωθεί ή παραμορφωθεί (Clancy et al., 2010).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

2. Επούλωση

2.1 Φυσιολογία Επούλωσης

Τραύμα είναι η λύση της συνεχείας της επιφάνειας του δέρματος και μπορεί να συνοδεύεται από διαταραχή στη φυσιολογική ανατομία και λειτουργία του επιθηλίου ή/και των υποκείμενων φυσιολογικών ιστών (EPOCH και Leaper, 2007).

Οξεία ή Φυσιολογική Επούλωση τραύματος συμβαίνει όταν η επούλωση του τραυματισμένου ιστού «προχωρά κανονικά, ομαλά και έγκαιρα και η διαδικασία της επιδιόρθωσης οδηγεί στην αποκατάσταση της ανατομικής και λειτουργικής ακεραιότητας (Lazarus et al., 1994).

Χρόνια επούλωση τραυμάτων υπάρχει όταν η επούλωση του τραυματισμένου ιστού αδυνατεί να προχωρήσει ομαλά και έγκαιρα και η διαδικασία της αποκατάστασης της ανατομικής και λειτουργικής ακεραιότητας δεν έχει σταθερό και ανατομικά λειτουργικό αποτέλεσμα (Lazarus et al., 1994).

Η διάρκεια και οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των παραγόντων που συμμετέχουν στη διαδικασία της επούλωσης του τραύματος διαφέρουν για τα οξέα και χρόνια τραύματα, παρ' όλα αυτά οι βασικές φάσεις παραμένουν ίδιες (Diegelmann, 2004; Glat και Longaker, 1997; Robson et al., 2001).

2.2 Τρόποι Επούλωσης

Ανάλογα με τη μορφολογία των τραυμάτων η επούλωση της πληγής γίνεται με τους ακόλουθους τρόπους:

2.2.1 Επούλωση κατά πρώτο σκοπό (Wound healing by first intention)

Συμβαίνει όταν η πληγή έχει κλείσει κατά την διάρκεια των πρώτων 12-24 ωρών από την πρόκλησή της (π.χ. χειρουργική τομή). Η προσέγγιση των χειλέων του τραύματος μπορούν να γίνουν με χρήση ραμμάτων, κόλλας, ταινίας ή μηχανικής συσκευής. Η τομή προκαλεί μόνο επιφανειακή διακοπή της συνεχείας της επιθηλιακής βασικής μεμβράνης, και θάνατο σχετικά λίγων επιθηλιακών και υποκείμενων κυττάρων του συνδετικού ιστού (EPOCH και Leaper, 2007).

2.2.2 Καθυστερημένη επούλωση κατά πρώτο σκοπό (Delayed primary healing) ή επούλωση κατά τρίτο σκοπό (Wound healing by tertiary intention)

Συμβαίνει σε μία μολυσμένη ή με ανώμαλα χείλη πληγή που κλείνει μετά από λίγες μέρες έχοντας μείνει ανοιχτή με σκοπό οποιαδήποτε μόλυνση ή λοίμωξη ή νεκρός ιστός να απομακρυνθεί (π.χ. δήγματα). Τα χείλη του τραύματος τότε προσεγγίζονται και η επούλωση πλέον γίνεται κατά πρώτο σκοπό (Epoch και Leaper, 2007; Beldon, 2010).

2.2.3 Επούλωση κατά δεύτερο σκοπό (Wound healing by second intention)

Συμβαίνει σε πληγές όπου τα άκρα της πληγής δεν μπορούν να προσεγγιστούν, όπως σε μεγάλα τραύματα, σοβαρά εγκαύματα και κάποιες χειρουργικές επεμβάσεις. Η αναγέννηση των επιθηλιακών κυττάρων από μόνη της δεν αρκεί ώστε να αποκαταστήσει την αρχική δομή του δέρματος, έτσι απαιτείται η ανάπτυξη του κοκκιώδους ιστού από τα χείλη του τραύματος, και του συνδετικού ιστού του εξωκυττάριου υποστρώματος (extracellular matrix). Αυτές οι ολικού πάχους πληγές, κλείνουν μέσω της επιθηλιοποίησης και της ταυτόχρονης συστολής του τραύματος (Epoch και Leaper, 2007; Beldon, 2010).

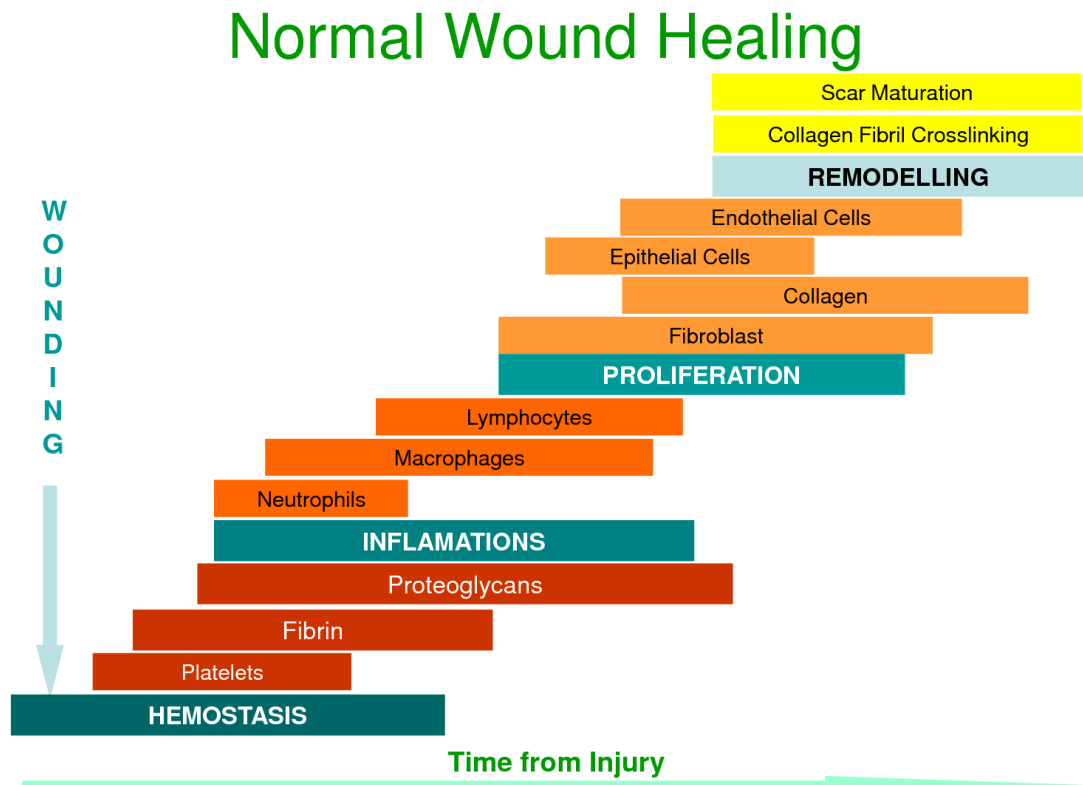
2.2.4 Επούλωση των μερικού πάχους τραυμάτων (Wound healing of partial thickness wounds)

Συμβαίνει σε τραυματισμούς, όπως επιφανειακά εγκαύματα ή εκδορές όπου η βλάβη εντοπίζεται στο επιθήλιο και το επιφανειακό (θηλώδες) μέρος του χορίου. Η βασική στιβάδα παραμένει ατραυμάτιστη ενώ επιθηλιακά κύτταρα σε συνδυασμό με τα δερματικά εξαρτήματα όπως τους θύλακες των τριχών και των σμηγματογόνων αδένων πολλαπλασιάζονται ώστε να καλύψουν το εκτεθειμένο χόριο. Η επούλωση συμβαίνει μέσω επιθηλιοποίησης ενώ η ανατομική και η φυσιολογική αποκατάσταση της βλάβης είναι σχεδόν πλήρης (Epoch και Leaper, 2007).

2.3 Φάσεις Επούλωσης

Η επούλωση του τραύματος κατά την Wound Healing Society (WHS) είναι μια πολύπλοκη, δυναμική διεργασία που έχει ως αποτέλεσμα την αποκατάσταση της ανατομικής συνέχειας και λειτουργίας (Lazarus et al., 1994). Αποτελεί μια διαδικασία αλληλεπικαλυπτόμενων διεργασιών οι οποίες απαιτούν τον συντονισμό μιας ποικιλίας κυτταρικών δραστηριοτήτων, όπως η φαγοκυττάρωση, η χημειοταξία, η μιτωτική διέγερση και η σύνθεση των συστατικών του εξωκυττάριου υποστρώματος (Epoch και Leaper, 2007). Η φάση της αιμόστασης (i) αρχίζει αμέσως μετά τον τραυματισμό και ακολουθείται από τη φάση της φλεγμονής (ii) που ολοκληρώνεται συνήθως σε 24-72 ώρες αλλά μπορεί να διαρκέσει και ως 5-7 ημέρες. Η φάση του πολλαπλασιασμού (iii) διαρκεί 1-3 εβδομάδες μετά τον τραυματισμό. Η τελευταία

φάση είναι η αναδιαμόρφωση (iv) της ουλής που σχηματίζεται και μπορεί να διαρκέσει από 1 έτος και άνω (Velnar et al., 2009).



Σχήμα: οι φάσεις και τα γεγονότα που συμβαίνουν κατά την επουλωτική διαδικασία (Menke και Diegelmann, 2006)

2.3.1 Φάση 1. Αιμόσταση

Κατά τη στιγμή της πρόκλησης του τραύματος συνήθως προκαλείται αιμορραγία. Ο ρόλος της αιμορραγίας δεν είναι μόνο το ξέπλυμα της πληγής από μικροοργανισμούς και αντιγόνα και η ενεργοποίηση της αιμόστασης. Μέσα σε δευτερόλεπτα από τον τραυματισμό του δέρματος, προκαλείται αγγειοσυστολή για μείωση της απώλειας αίματος (Beldon, 2010). Καθώς το αίμα διαρρέει από την περιοχή του τραύματος, τα αιμοπετάλια έρχονται σε επαφή και προσκολλώνται με το τοίχωμα των αιμοφόρων αγγείων και το εκτεθειμένο κολλαγόνο στην εξωκυττάρια μήτρα (Beldon, 2010). Αυτό ενεργοποιεί τα αιμοπετάλια να απελευθερώσουν κυτταροκίνες, αυξητικούς παράγοντες και πολλούς προφλεγμονώδεις μεσολαβητές που προκύπτουν από τη συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων με την πρόκληση του καταρράκτη της πήξης που οδηγεί στο σχηματισμό του ινώδους (Beldon, 2010). Τα αιμοπετάλια εγκλωβίζονται στον ινώδη θρόμβο αυξάνοντας τον όγκο του, σχηματίζοντας μια μεμβράνη στην οποία τα ανενεργά ένζυμα πήξεως ενεργοποιούνται και προωθείται περαιτέρω ο καταρράκτης πήξης (Menke και Diegelmann, 2006).

Η διαδικασία της αιμόστασης είναι υπεύθυνη για την προώθηση του επόμενου σταδίου της επούλωσης του τραύματος μέσω των παραγόντων ανάπτυξης που απελευθερώνονται από τα άλφα κοκκία των αιμοπεταλίων (Menke και Diegelmann, 2006). Τα ουδετερόφιλα και τα μονοκύτταρα ενεργοποιούνται από τους παράγοντες PDGF (αιμοπεταλιακό αυξητικό παράγοντα) και TGF-β (Transforming Growth Factor beta) (Menke και Diegelmann, 2006). Ο αυξητικός παράγοντας TGF-β προσελκύει μακροφάγα στην περιοχή του τραύματος και τα διεγείρει για να παράγουν επιπρόσθετες κυτταροκίνες, συμπεριλαμβανομένων των FGF (αυξητικός παράγοντας ινοβλαστών), PDGF, TNFα (Tumor Necrosis Factor alpha) και IL-1 (Ιντερλευκίνη 1) (Beldon, 2010). Τα ενδοθηλιακά κύτταρα ενεργοποιούνται από τον αγγειακό ενδοθηλιακό αυξητικό παράγοντα (VEGF), τον τροποποιημένο αυξητικό παράγοντα άλφα TGF-α και τον βασικό αυξητικό παράγοντα ινοβλαστών (bFGF) (Menke και Diegelmann, 2006). Οι ινοβλάστες ενεργοποιούνται από τον PDGF ώστε να αρχίσει η μετανάστευση προς την περιοχή του τραύματος και παράγουν κολλαγόνο και γλυκοζαμινογλυκάνες, διευκολύνοντας έτσι την κυτταρική μετανάστευση και τις αλληλεπιδράσεις με το κυτταρικό υπόστρωμα, παρέχοντας ένα πλαίσιο υποστήριξης (Menke και Diegelmann, 2006). Εκτός από τους παράγοντες που απελευθερώνονται από τα αιμοπετάλια, απελευθερώνονται και πρωτεΐνες του συμπληρώματος όπως το C5a και το f-Met-Leu-Phe, τα οποία είναι βακτηριακά υπολείμματα που αποτελούν σήματα για αύξηση της συγκέντρωσης των ουδετερόφιλων στην περιοχή του τραύματος (Menke και Diegelmann, 2006).

2.3.2 Φάση 2. Φλεγμονή

Η φλεγμονώδης φάση της επούλωσης ενεργοποιείται σταδιακά κατά τη διάρκεια της αιμόστασης και της θρόμβωσης και μπορεί να διαιρεθεί σε μια πρώιμη φάση που συμμετέχουν τα ουδετερόφιλα και σε μια καθυστερημένη φάση με την εμφάνιση και τον μετασχηματισμό των μονοκυττάρων (Reinke και Sorg, 2012). Κοινές τοπικές εκδηλώσεις της φλεγμονής αποτελούν η ερυθρότητα, το οίδημα, η αύξηση της θερμοκρασίας και ο πόνος (Boron και Boulpaer, 2005).

Όπως αναφέρθηκε, αμέσως μετά τον τραυματισμό, ποικιλία χημικών μεσολαβητών προκαλεί αγγειοδιαστολή στα περισσότερα από τα αγγεία της μικροκυκλοφορίας στην περιοχή που έχει υποστεί βλάβη (Boron και Boulpaer, 2005). Οι μεσολαβητές αυτοί, προκαλούν επίσης αύξηση της διαπερατότητας των τοπικών τριχοειδών και φλεβιδίων, διευρύνοντας τις διακυτταρικές σχισμές ή πόρους δια των οποίων μπορούν να μετακινηθούν οι πρωτεΐνες (Boron και Boulpaer, 2005). Η προσαρμοστική αξία αυτών των αγγειακών αλλαγών έχει 2 όψεις: (Α) η αυξημένη αιματική ροή στη φλεγμαίνουσα περιοχή (η οποία ευθύνεται για την ερυθρότητα και την αύξηση της θερμοκρασίας) προάγει τη μεταφορά πρωτεϊνών και λευκοκυττάρων και (Β) η αυξημένη διαπερατότητα των τριχοειδών και των φλεβιδίων για τις πρωτεΐνες εξασφαλίζει τη μεταφορά πρωτεϊνών από το πλάσμα στο μεσοκυττάριο υγρό, όπου αυτές συμμετέχουν στη φλεγμονή. Η αγγειοδιαστολή και η αύξηση της διαπερατότητας των τριχοειδών και των φλεβιδίων προκαλούν διήθηση του

πλάσματος προς το μεσοκυττάριο υγρό και σχηματισμό οιδήματος (Boron και Boulraep, 2005).

- **Πρωτογενής Φλεγμονώδης Φάση**

Η πρωτογενής φλεγμονώδης αντίδραση ξεκινά κατά τη διάρκεια της πήξης και έχει ποικίλες λειτουργίες. Με την ενεργοποίηση του καταρράκτη του συμπληρώματος, εκκινούν μοριακά μονοπάτια, που οδηγούν σε διείσδυση της περιοχής του τραύματος από τα ουδετερόφιλα, των οποίων κύρια λειτουργία αποτελεί η αποτροπή της μόλυνσης (Broughton et al., 2006). Τα ουδετερόφιλα αρχίζουν με το κρίσιμο έργο της φαγοκυττάρωσης, ώστε να καταστρέψουν και να απομακρύνουν τυχόν βακτηρίδια, ξένα σωματίδια και κατεστραμμένους ιστούς. Η φαγοκυτταρική δραστηριότητα είναι ζωτικής σημασίας για τη μετέπειτα πορεία των διαδικασιών, δεδομένου ότι πληγές που έχουν βακτηριακή μόλυνση δεν επουλώνονται (Robson, 1997; Hart, 2002).

Με την έναρξη της φλεγμονής, τα κυκλοφορούντα ουδετερόφιλα αρχίζουν να μετακινούνται έξω από τα αιμοφόρα αγγεία προς τον προσβεβλημένο ιστό, διασχίζοντας το ενδοθήλιο με τη διεργασία της διαπίδυσης (Boron και Boulraep, 2005). Η διέλευσή τους από τα αιμοφόρα αγγεία προς τον ιστό διαμεσολαβείται από τα μόρια προσκόλλησης τόσο των ενδοθηλιακών κυττάρων, όσο και των ουδετερόφιλων (Boron και Boulraep, 2005). Η μετακίνηση αυτή εξαρτάται από το δυναμικό της συγκέντρωσης διαφόρων χημειοτακτικών παραγόντων που παράγονται στην περιοχή που έχει υποστεί βλάβη από μικρόβια (Boron και Boulraep, 2005; Robson et al., 2001). Μέσω μεταβολών στη ρύθμιση των μορίων προσκόλλησης στην επιφάνεια, τα ουδετερόφιλα γίνονται κολλώδη και μέσω μιας διαδικασίας που λέγεται οριοποίηση (margination) αρχίζουν να προσκολλώνται χαλαρά στα ενδοθηλιακά κύτταρα των τριχοειδών και των φλεβιδίων (Lawrence, 1998; Hart, 2002) με αποτέλεσμα τη μετάθεση των ουδετερόφιλων κατά μήκος της επιφάνειας του αγγείου που προκαλείται μέσω ώθησης από τη ροή του αίματος (Boron και Boulraep, 2005; Velnar et al., 2009). Χημειοκίνες που εκκρίνονται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα ενεργοποιούν ταχύτατα ένα ισχυρότερο σύστημα προσκόλλησης που αποτελείται από τις ιντεγκρίνες (Skover, 1991; Flanagan, 2000) με αποτέλεσμα τη στενή σύνδεση ενδοθηλιακών και ουδετερόφιλων κυττάρων (Boron και Boulraep, 2005). Τα ενεργοποιημένα λευκοκύτταρα μεταναστεύουν από τα ενδοθηλιακά κύτταρα και κινούνται στην περιοχή του τραυματισμένου ιστού μέσω των υποδοχέων ιντεγκρίνης που συνδέονται με τα συστατικά του εξωκυττάρου υποστρώματος (ECM) (Menke και Diegelmann, 2006). Σε εκείνο το σημείο, τα φλεγμονώδη κύτταρα εκκρίνουν ελασάση και κολλαγενάση προκειμένου να μετακινηθούν διαμέσου της βασικής μεμβράνης των ενδοθηλιακών κυττάρων και εντός της (ECM) (Menke και Diegelmann, 2006). Στη συνέχεια, μια στενή προβολή του κυτταροπλάσματος του ουδετερόφιλου εισέρχεται στο διάστημα μεταξύ δύο ενδοθηλιακών κυττάρων και ολόκληρο το ουδετερόφιλο μετακινείται μέσω του τοιχώματος του τριχοειδούς αγγείου προς το μεσοκυττάριο υγρό (διαδικασία της διαπίδυσης). Κατά τον τρόπο

αυτόν, μεγάλοι αριθμοί ουδετερόφιλων μεταναστεύουν προς τη φλεγμαίνουσα περιοχή και κινούνται προς τα μικρόβια (Boron και Boulpaep, 2005). Η κίνηση των λευκοκυττάρων από το αίμα προς την περιοχή που έχει υποστεί βλάβη δεν περιορίζεται στα ουδετερόφιλα (Boron και Boulpaep, 2005).

Τα μονοκύτταρα ακολουθούν, και όταν ο ιστός έχει υποστεί ανατομικές και λειτουργικές αλλαγές, μετατρέπονται σε μακροφάγα (Boron και Boulpaep, 2005). Στην περιοχή του τραύματος, τα ουδετερόφιλα φαγοκυτταρώνουν ξένο υλικό και βακτηρίδια, καταστρέφοντάς τα με την απελευθέρωση πρωτεολυτικών ενζύμων και οξυγόνου προερχομένου από ελεύθερες ρίζες (Skover, 1991; Flanagan, 2000; Richardson, 2004; Broughton et al., 2006). Η δραστηριότητα των ουδετερόφιλων αλλάζει σταδιακά μέσα σε λίγες ημέρες από τον τραυματισμό, όταν όλα τα μολυσματικά βακτήρια έχουν καταστραφεί (Hart, 2002; Skover, 1991). Μετά την ολοκλήρωση του έργου τους, τα ουδετερόφιλα πρέπει να απομακρυνθούν από την πληγή πριν από τη μετάβαση στην επόμενη φάση της επούλωσης. Απορρίπτονται με εξώθηση στην επιφάνεια του τραύματος και απόπτωση, επιτρέποντας την εξάλειψη του συνόλου του πληθυσμού των ουδετερόφιλων χωρίς την πρόκληση βλάβης στον ιστό ή κλιμάκωση της φλεγμονώδους ανταπόκρισης (Hart, 2002; Hunt et al., 2000). Τα ουδετερόφιλα, επίσης, παράγουν και απελευθερώνουν φλεγμονώδεις μεσολαβητές, όπως TNF- α και IL-1, οι οποίοι ενεργοποιούν περισσότερα ουδετερόφιλα καθώς και ινοβλάστες αλλά και επιθηλιακά κύτταρα (Menke και Diegelmann, 2006). Μετά από 2-3 ημέρες, τα ουδετερόφιλα δεν είναι πλέον ο κυρίαρχος κυτταρικός τύπος, καθώς καταναλώνονται με απόπτωση, επιτρέποντας στα μονοκύτταρα να κυριαρχήσουν (Menke και Diegelmann, 2006). Τα φλεγμονώδη κύτταρα απελευθερώνουν επίσης κυτταροκίνες (συμπεριλαμβανομένων ιντερλευκινών 1,6,8 και TNF- α) και αυξητικούς παράγοντες που χρησιμεύουν στη συνέχιση της φλεγμονώδους φάσης καθώς και στη φάση του πολλαπλασιασμού όπου προσελκύονται οι ινοβλάστες και τα επιθηλιακά κύτταρα (Menke και Diegelmann, 2006).

• Δευτερογενής Φλεγμονώδης Φάση

Ως μέρος της καθυστερημένης φλεγμονώδους φάσης, 48-72 ώρες μετά τον τραυματισμό, τα μακροφάγα εμφανίζονται στην περιοχή της πληγής ώστε να ξεκινήσει η διαδικασία της φαγοκυττάρωσης (Hart, 2002; Hunt et al., 2000; Sieggreen, 1987; Ennis και Meneses, 2000; Hess, 2000; Witte et al., 2002; Samuels και Tan, 1999). Έχουν μεγαλύτερη διάρκεια ζωής σε σχέση με τα ουδετερόφιλα και συνεχίζουν να δραστηριοποιούνται σε χαμηλότερο pH (Ramasastry, 2005; Pierce et al., 1991). Αυτά τα κύτταρα είναι θεμελιώδους σημασίας για τα τελευταία στάδια της φλεγμονής, ενεργώντας ως κύρια ρυθμιστικά κέντρα και παρέχοντας πλήθος ισχυρών παραγόντων ανάπτυξης ιστών, ιδιαίτερα TGF- β , καθώς και άλλους μεσολαβητές [TGF- α , ηπαρινικό δεσμευτικό επιδερμικό αυξητικό παράγοντα, αυξητικό παράγοντα ινοβλαστών (FGF), κολλαγενάση]. Ακόμη, ενεργοποιούν κερατινοκύτταρα, ινοβλάστες και ενδοθηλιακά κύτταρα (Broughton et al., 2006; Hunt et al., 2000; Glat

και Longaker, 1997; Diegelmann, 2004; Witte et al, 2002; Samuels και Tan, 1999; Ramasastry, 2005). Είναι σαφές ότι η εξάντληση των μονοκυττάρων και των μακροφάγων από το τραύμα προκαλεί σοβαρές διαταραχές της επούλωσης που οφείλονται στον κακό χειρουργικό καθαρισμό του τραύματος, με αποτέλεσμα την καθυστέρηση του πολλαπλασιασμού, της ωρίμανσης των ινοβλαστών και της αγγειογένεσης, προκαλώντας ανεπαρκή σχηματισμό συνδετικού ιστού και ατελή επούλωση (Skover, 1991; Ennis και Meneses, 2000; Hess, 2000; Witte et al., 2002). Τα τελευταία κύτταρα που εισέρχονται στην περιοχή του τραύματος στην καθυστερημένη φλεγμονώδη φάση, είναι τα λεμφοκύτταρα, που προσελκύονται 72 ώρες μετά τον τραυματισμό με τη δράση της IL-1, συστατικών του συμπληρώματος και IgG από προϊόντα διάσπασης (Hart, 2002; Broughton et al., 2006; Hunt et al., 2000). Η IL-1 διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της κολλαγενάσης, που απαιτείται μεταγενέστερα για την ανάπλαση του κολλαγόνου, την παραγωγή των συστατικών του ECM και την αποικοδόμησή τους (Hart, 2002; Hunt et al., 2000). Μετά τις πρώτες 24 ώρες, τα ενεργοποιημένα μονοκύτταρα (μακροφάγα) είναι οι πολυάριθμοι φλεγμονώδεις κυτταρικοί τύποι που παρουσιάζονται στην περιοχή του τραύματος (Menke και Diegelmann, 2006). Τα μακροφάγα δεν είναι μόνο ενεργά στην επούλωση του τραύματος αλλά και στη ρύθμιση και την εξέλιξη της διαδικασίας της επούλωσης (Menke και Diegelmann, 2006). Διαδραματίζουν παρόμοιο ρόλο με τα ουδετερόφιλα καθώς είναι υπεύθυνα για τη θανάτωση των βακτηρίων και τον καθαρισμό του τραύματος μέσω των δράσεων των μεταλλοπρωτεϊνών (MMPs) και της έκκρισης της ελαστάσης (Menke και Diegelmann, 2006). Ακόμη, διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στη ρύθμιση της φλεγμονώδους απόκρισης, με τη ρύθμιση της πρωτεολυτικής καταστροφής του ιστού του τραύματος και την έναρξη της μετάβασης από τη φλεγμονώδη προς την πολλαπλασιαστική φάση (Menke και Diegelmann, 2006). Τα μακροφάγα απελευθερώνουν μεγάλη ποικιλία αυξητικών παραγόντων και κυτταροκινών, συμπεριλαμβανομένων των PDGF, TGF-β, TGF-α, FGF, IGF-1, TNF-α, IL-1 και IL-6 που χρησιμεύουν στην προσέλκυση και ενεργοποίηση των ινοβλαστών και προάγουν την αγγειογένεση. Επιπλέον, οι ινοβλάστες συνθέτουν, αποθηκεύουν και οργανώνουν το προσωρινό ECM που σε συνδυασμό με την ικανότητα να μειώνουν τα πρωτεολυτικά κατάλοιπα, οδηγούν στην έναρξη της πολλαπλασιαστικής φάσης. Καθώς ο αριθμός των μακροφάγων μειώνεται, ο αριθμός των ινοβλαστών αυξάνει και η επουλωτική διαδικασία αρχίζει να βγαίνει από τη φλεγμονώδη φάση και να εισέρχεται στην φάση του πολλαπλασιασμού (Menke και Diegelmann, 2006).

2.3.3 Φάση 3. Πολλαπλασιασμός

Η πολλαπλασιαστική φάση ξεκινά από την τρίτη ημέρα μετά τον τραυματισμό και διαρκεί περίπου 2 εβδομάδες. Χαρακτηρίζεται από μετανάστευση των ινοβλαστών και εναπόθεση της νέας εξωκυττάριας μήτρας (ECM), αντικαθιστώντας το προσωρινό δίκτυο που είχε δημιουργηθεί από ινώδες και ινονεκτίνη. Βασικά στάδια αυτής της φάσης είναι η μετανάστευση των ινοβλαστών, η σύνθεση του κολλαγόνου, η αγγειογένεση και ο σχηματισμός του κοκκιώδους ιστού, η εξώθηση, η

προσκόλληση, η έλξη των παρακειμένων ιστών και η επιθηλιοποίηση (Velnar et al., 2009).

- **Μετανάστευση των ινοβλαστών**

Μετά από τραυματισμό, οι ινοβλάστες και οι μυοϊνοβλάστες στους περιβάλλοντες ιστούς από την περιοχή του τραύματος διεγείρονται για να πολλαπλασιαστούν τις πρώτες 3 ημέρες (Witte et al., 2002). Οι ινοβλάστες εμφανίζονται για πρώτη φορά στην πληγή την τρίτη ημέρα από τον τραυματισμό και η συσσώρευσή τους απαιτεί φαινοτυπικές διαφοροποιήσεις. Μόλις φτάσουν στην περιοχή του τραύματος, πολλαπλασιάζονται συνέχεια και παράγουν υαλουρονικό πρωτεϊνικό υπόστρωμα, ινονεκτίνη, πρωτεογλυκάνες και τύπου I και III προκολλαγόνο (Robson et al., 2001; Witte et al., 2002; Ramasastry, 2005). Μέχρι το τέλος της πρώτης εβδομάδας, παράγεται άφθονο εξωκυττάριο υπόστρωμα, το οποίο υποστηρίζει περαιτέρω τη μετανάστευση των κυττάρων και είναι απαραίτητο για την επιδιορθωτική διαδικασία (Sieggreen, 1987; Ramasastry, 2005). Στη συνέχεια, οι ινοβλάστες μετατρέπονται φαινοτυπικά σε μυοϊνοβλάστες (Ramasastry, 2005). Η συστολή του τραύματος αποτελεί σημαντικό γεγονός στη διορθωτική διαδικασία που βοηθά στην προσέγγιση των άκρων της πληγής. Όταν ολοκληρωθεί αυτή η διαδικασία οι περιττοί ινοβλάστες αποβάλλονται με απόπτωση (Servold, 1991; Baum και Arpey, 2005; Greenhalgh, 2005).

- **Σύνθεση του Κολλαγόνου**

Η σύνθεση του κολλαγόνου είναι ιδιαίτερα σημαντική διαδικασία σε όλες τις φάσεις της επούλωσης του τραύματος. Το κολλαγόνο συντίθεται μέσω ινοβλαστών, προσδίδει ακεραιότητα και αντοχή σε όλους τους ιστούς και διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο ειδικά στην πολλαπλασιαστική φάση αλλά και στη φάση της αναδιαμόρφωσης (Greenhalgh, 2005; Clark, 1993). Το κολλαγόνο λειτουργεί ως πηγή για τη δημιουργία του εξωκυττάριου υποστρώματος μεταξύ των κυττάρων της πληγής. Η μη τραυματισμένη δερμίδα περιέχει περίπου 80% τύπου I και 20% τύπου III κολλαγόνο, ενώ ο κοκκιώδης ιστός σε πληγή παρουσιάζει 40% κολλαγόνο τύπου III (Robson, 2001).

- **Αγγειογένεση και Σχηματισμός του Κοκκιώδους Ιστού**

Η διαμόρφωση και η δημιουργία νέων αιμοφόρων αγγείων είναι κρίσιμη στην επούλωση τραυμάτων και συμβαίνει σε όλες τις φάσεις της επιδιορθωτικής διαδικασίας. Εκτός από την προσέλκυση ουδετερόφιλων και μακροφάγων, πολυάριθμοι αγγειογόνοι παράγοντες που εκκρίνονται κατά τη διάρκεια της αιμόστασης προάγουν την αγγειογένεση (Servold, 1991; Pierce et al., 1991; Takeshita

et al., 1994). Το πρώτο βήμα για το σχηματισμό νέων αγγείων είναι η σύνδεση των αυξητικών παραγόντων με υποδοχείς επί των ενδοθηλιακών κυττάρων των υφισταμένων αιμοφόρων αγγείων, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση ενδοκυττάρου καταρράκτη σηματοδότησης. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα απελευθερώνουν μεγαλοπρωτεΐνες της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας προκαλώντας λύση του περιβάλλοντος ιστού ώστε να είναι εφικτός ο συνεχής πολλαπλασιασμός του ενδοθηλίου (Reinke και Sorg, 2012). Στη συνέχεια, τα νέα αγγεία διαφοροποιούνται σε αρτηρίες και φλεβίδια και ωριμάζουν μέσω περαιτέρω σταθεροποίησης του αγγειακού τοιχώματος από κινητοποίηση περικυττάρων και λείων μυϊκών κυττάρων (Reinke και Sorg, 2012). Τέλος, η αρχική ροή του αίματος ολοκληρώνει την αγγειογενετική διαδικασία. Στα πλήρους πάχους δερματικά τραύματα, η διαδικασία της αγγειογένεσης ακολουθεί ένα καθορισμένο πρόγραμμα από άποψη χρόνου και τρόπου σχηματισμού (Reinke και Sorg, 2012).

- **Εξώθηση**

Με τρεις τύπους διασυνδεδεμένων νημάτων, ο κυτταρικός σκελετός αγκιστρώνεται μεταξύ των κυττάρων και μεταξύ κυττάρων-εξωκυττάρου υποστρώματος, παρέχοντας μηχανική υποστήριξη για τα κύτταρα (Li et al., 2005). Το δίκτυο ακτίνης είναι γνωστό για τη δυναμική αναδιοργάνωση και είναι σημαντικό για το συντονισμό της κυτταρικής μετανάστευσης. Η διεύθυνση της κίνησης του κυττάρου διατηρείται μέσω της δράσης κυκλικής συναρμολότητας και αποσυναρμολότητας των νηματιών ακτίνης (Wolgemuth, 2005; Giannone et al., 2004). Πολύπλοκες οδοί σηματοδότησης και ρυθμιστικές πρωτεΐνες ελέγχουν τη δυναμική της ακτίνης και τις αλλαγές της κυτταρικής μορφολογίας (Li et al., 2005; Giannone et al., 2004).

- **Προσκόλληση**

Η προσκόλληση στο στερεό υπόστρωμα είναι ένα ιδιαίτερα σημαντικό βήμα στην κυτταρική μετανάστευση (Lawrence, 1998). Η προσκόλληση και η μετανάστευση είναι αντιστρόφως ανάλογες ρυθμιστικές διαδικασίες. Ο βέλτιστος ρυθμός της μετανάστευσης επιτυγχάνεται με την αύξηση της πρόσφυσης, αλλά η κινητικότητα μειώνεται με περαιτέρω πρόσφυση (Holly et al., 2000). Τα ενδοθηλιακά κύτταρα μεταναστεύουν ταχύτερα αμέσως μετά τον τραυματισμό, ενώ αργότερα αποκτούν βραδύτερο ρυθμό που διατηρείται κατά τη διάρκεια της επούλωσης (Lawrence, 1998).

- **Έλξη των παρακειμένων ιστών**

Συσταλτικές δυνάμεις, που διαβιβάζονται μέσω συνδέσεων ιντεγκρίνης-κυτταροσκελετού, επιτρέπουν στα κύτταρα να τραβήξουν το κυτταρόπλασμα προς τα εμπρός δημιουργώντας έλξη από το υπόστρωμα (Li et al., 2005). Ο βαθμός της αντοχής της σύζευξης ιντεγκρίνης-κυτταροσκελετού επηρεάζεται από την ακαμψία του υποστρώματος. Με ισχυρότερες συζεύξεις στην επιφάνεια, οι δυνάμεις μπορούν να μεταδίδονται στα κύτταρα που μεταναστεύουν περισσότερο αποτελεσματικά. Τα μακροφάγα, οι πολλαπλασιαζόμενοι ινοβλάστες και τα αναπτυσσόμενα αιμοφόρα αγγεία, σε συνδυασμό με το υπόστρωμα κολλαγόνου, το ινωδογόνο, την ινονεκτίνη και το υαλουρονικό οξύ, αποτελούν τον κοκκιώδη ιστό που αντικαθιστά το προσωρινό υπόστρωμα θρόμβου που είχε δημιουργηθεί (Witte et al., 2002; Baum και Agrøy, 2005). Με την συσσώρευση κολλαγόνου, η πυκνότητα των αιμοφόρων αγγείων μειώνεται και ο κοκκιώδης ιστός ωριμάζει για τον σχηματισμό ουλής (Ganz, 1993).

- **Επιθηλιοποίηση**

Η μετανάστευση των επιθηλιακών κυττάρων ξεκινά από τα άκρα του τραύματος μέσα σε λίγες ώρες από τον τραυματισμό. Μια μονή ζώνη κυττάρων αρχικά διαμορφώνεται επάνω από τη βλάβη και συνοδεύεται από μια σημαντική αύξηση της μιτωτικής δραστηριότητας των επιθηλιακών κυττάρων γύρω από τα χείλη του τραύματος. Η διαδικασία της επανεπιθηλιοποίησης πραγματοποιείται από τα κερατινοκύτταρα τοπικά στα χείλη του τραύματος και από επιθηλιακά βλαστικά κύτταρα από θυλάκια τριχών ή ιδρωτοποιών αδένων (Martin, 1997; Lau et al., 2009, Miller et al., 1998, Roh και Lyle, 2006). Η διαδικασία αυτή ενεργοποιείται μέσω οδών σηματοδότησης από τα επιθηλιακά και μη επιθηλιακά κύτταρα στα χείλη του τραύματος, τα οποία απελευθερώνουν ένα πλήθος διαφορετικών κυτταροκινών και αυξητικών παραγόντων (Werner και Grose, 2003). Με την ενζυματική χαλάρωση των μεσοκυττάρων δεσμοσωμάτων μέσω της κολλαγενάσης και της ελαστάσης, τα ενεργοποιημένα κερατινοκύτταρα μεταναστεύουν κατά μήκος του προσχηματισμένου ινώδους θρόμβου του αίματος στα υψηλότερα στρώματα του κοκκιώδους ιστού. Αυτή η διαδικασία ονομάζεται αναδιάταξη των κερατινοκυττάρων (Jacinto et al., 2001). Όταν τα προωθημένα επιθηλιακά κύτταρα συναντηθούν και γεμίσει το ιστικό χάσμα που είχε προκληθεί λόγω του χάσματος, η μετανάστευση σταματά και η βασική μεμβράνη αρχίζει να διαμορφώνεται (Roh και Lyle, 2006; Clark, 1993; Rowlatt, 1979). Η ένωση των απέναντι επιθηλίων πραγματοποιείται μέσω αποικοδόμησης των ινών ακτίνης οι οποίες αντικαθιστούν τις μεσοκυττάρια επαφές ώστε να κλείσει η πληγή σαν φερμουάρ κερατινοκυττάρων (Jacinto et al., 2001).

2.3.4 Φάση 4. Αναδιαμόρφωση

Η αναδιαμορφωτική φάση αποτελεί την τελική φάση της επούλωσης και είναι υπεύθυνη για την ανάπτυξη του νέου επιθηλίου και του τελικού σχηματισμού της ουλής. Η σύνθεση του εξωκυττάριου υποστρώματος στην πολλαπλασιαστική και αναδιαμορφωτική φάση γίνεται ταυτόχρονα με τη δημιουργία του κοκκιώδους ιστού. Αυτή η φάση μπορεί να διαρκέσει μέχρι και 1-2 χρόνια, ή μερικές φορές και ακόμη περισσότερο (Witte et al., 2002; Samuels και Tan, 1999). Η αναδιαμόρφωση της πληγής είναι αυστηρά ελεγχόμενη από ρυθμιστικούς μηχανισμούς, με σκοπό τη διατήρηση ισορροπίας μεταξύ της καταστροφής και της σύνθεσης, στοχεύοντας στη φυσιολογική επούλωση. Ιδιαίτερα, εξαρτάται από την ενδοκυτταρική ωρίμανση του υποστρώματος, την αύξηση της διαμέτρου των δεσμών κολλαγόνου και την καταστροφή του υαλουρονικού οξέος και της φιμπρονεκτίνης (Hunt et al., 2000; Baum και Arpey, 2005). Η μηχανική αντοχή του τραύματος αυξάνει προοδευτικά με την εναπόθεση κολλαγόνου (Baum και Arpey, 2005; Clark, 1993). Οι ίνες κολλαγόνου μπορούν να ανακτήσουν περίπου το 80% της αρχικής αντοχής σε σύγκριση με μη τραυματισμένο ιστό (Robson et al., 1991). Η σύνθεση του κολλαγόνου όπως και η αναδιαμόρφωση του εξωκυττάριου υποστρώματος τείνουν να σταθεροποιηθούν περίπου 3 εβδομάδες μετά τον τραυματισμό (Ennis και Meneses, 2000; Szycher και Lee, 1992). Παρά το γεγονός ότι η αρχική εναπόθεση των δεσμών κολλαγόνου είναι εξαιρετικά αποδιοργανωμένη, η διαμόρφωση του νέου κολλαγόνου του υποστρώματος γίνεται όλο και πιο προσανατολισμένη και διασταυρούμενη με την πάροδο του χρόνου (Velnar et al., 2009). Το κολλαγόνο τύπου III, το οποίο είχε παραχθεί στην πολλαπλασιαστική φάση, έχει πλέον αντικατασταθεί από το ισχυρότερο κολλαγόνο τύπου I (Gurtner και Evans, 2000). Σε επόμενο στάδιο, οι μυοϊνοβλάστες προκαλούν συσπάσεις στην πληγή και πολλαπλές προσκολλήσεις στο κολλαγόνο, με αποτέλεσμα την μείωση της επιφάνειας της ουλής (Tziotzios et al., 2012; Profyris et al., 2012; Gurtner και Evans, 2000). Δεδομένου ότι η πληγή επουλώνεται, η πυκνότητα των ινοβλαστών και των μακροφάγων μειώνεται σταδιακά ακόμη περισσότερο μέσω απόπτωσης (Greenhalgh, 2005; Ganz, 1993). Με την πάροδο του χρόνου, η ανάπτυξη των τριχοειδών σταματά, η ροή του αίματος στην περιοχή μειώνεται και η μεταβολική δραστηριότητα στην περιοχή της προϋπάρχουσας πληγής ελαττώνεται (Baum και Arpey, 2005; Clark, 1993; Falanga, 1998). Το τελικό αποτέλεσμα είναι μια πλήρως ωριμασμένη ουλή με μειωμένο αριθμό κυττάρων και αυξημένη αντοχή (Reinke και Sorg, 2012). Σε αντίθεση με την επούλωση των τραυμάτων στα έμβρυα, υπάρχουν ορισμένα δερματικά εξαρτήματα που δεν θα ανακάμψουν ποτέ πλήρως μετά το κλείσιμο της πληγής. Τριχοθυλάκια ή ιδρωτοποιοί αδένες που βρίσκονται υποδερμικά, δεν έχουν καμία δυνατότητα να θεραπευτούν ή να αναπτυχθούν ξανά μετά από σοβαρό τραυματισμό. Η επιδερμίδα της προκύπτουσας ουλής, μετά την επούλωση της πληγής παρουσιάζει διαφορές σε σχέση με τη φυσιολογική, γεγονός που οφείλεται κυρίως στην έλλειψη προεξοχών που συνδέονται με τον υποκείμενο συνδετικό ιστό και είναι απαραίτητες για την σφικτή σύνδεση της επιδερμίδας με το χόριο (Robson et al., 2001).

2.4 Παράγοντες που επηρεάζουν την επούλωση πληγών

Η επούλωση πληγών ως φυσιολογική διαδικασία στο ανθρώπινο σώμα, επιτυγχάνεται μέσω τεσσάρων σαφώς καθορισμένων φάσεων: της ομοιόστασης, της φλεγμονής, της φάσης του πολλαπλασιασμού και της αναδιαμόρφωσης, όπως έχει αναφερθεί αναλυτικότερα παραπάνω. Οι τέσσερις αυτές φάσεις θα πρέπει να πραγματοποιηθούν με τη σωστή αλληλουχία και στο σωστό χρονικό πλαίσιο. Πολλοί παράγοντες επεμβαίνουν σε μία ή περισσότερες φάσεις της διαδικασίας προκαλώντας ακατάλληλη ή εξασθενημένη επούλωση. Η κατανόηση της επιρροής αυτών των παραγόντων στην επουλωτική διαδικασία μπορεί να οδηγήσει σε θεραπείες οι οποίες θα τη βελτιώσουν και θα λύσουν το πρόβλημα της εξασθενημένης επούλωσης. Οι παράγοντες αυτοί χωρίζονται σε τοπικούς και συστηματικούς. Τοπικοί ονομάζονται οι παράγοντες που επηρεάζουν άμεσα την πληγή, ενώ συστηματικοί αυτοί που επιδρούν στην υγεία του ατόμου σε ευρύτερο πεδίο καθώς και σε ασθένειες του ατόμου που έχουν επιπτώσεις στην ικανότητα του να ιαθεί (Guo, Di Pietro, 2010).

2.4.1 Τοπικοί παράγοντες

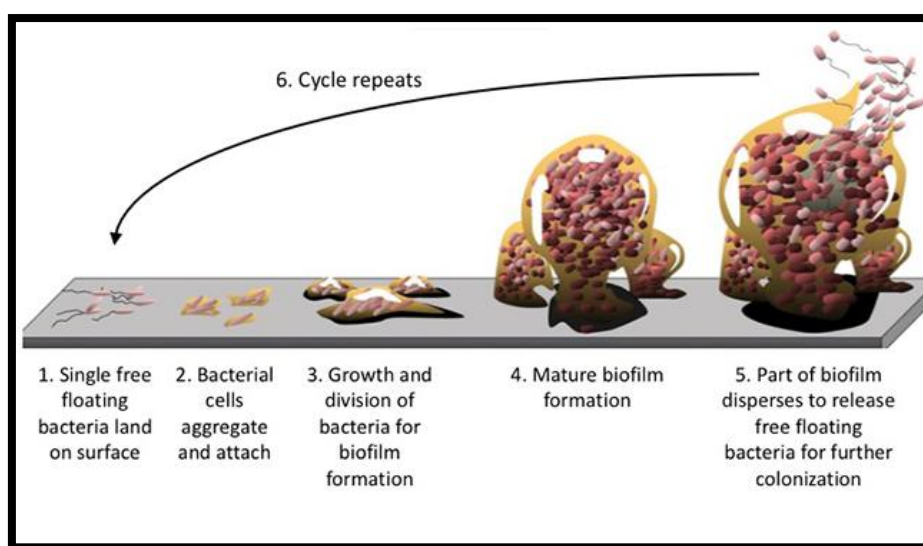
2.4.1.1 Λοίμωξη

Μόλις τραυματιστεί το δέρμα, οι μικροοργανισμοί που συνήθως εντοπίζονται στην επιφάνεια του δέρματος αποκτούν πρόσβαση στους υποκείμενους ιστούς. Η κατάσταση της λοίμωξης και του πολλαπλασιασμού των μικροοργανισμών καθορίζει εάν το τραύμα θα ταξινομηθεί ως έχον μόλυνση, αποικισμό, τοπική λοίμωξη ή κρίσιμο αποικισμό και διεισδυτική λοίμωξη. Η μόλυνση είναι η παρουσία μη πολλαπλασιαζόμενων μικροοργανισμών σε ένα τραύμα, ενώ ο αποικισμός ορίζεται ως η παρουσία πολλαπλασιαζόμενων μικροοργανισμών, δίχως όμως την πρόκληση βλάβης του ιστού. Η τοπική μόλυνση ή ο κρίσιμος αποικισμός είναι ένα ενδιάμεσο στάδιο, με πολλαπλασιασμό μικροοργανισμών και έναρξη τοπικής απόκρισης του ιστού. Η διεισδυτική λοίμωξη ορίζεται ως η παρουσία πολλαπλασιαζόμενων μικροοργανισμών στο έλκος με επακόλουθη πρόκλησης βλάβης του ξενιστή (Harding και Edwards, 2004).

Η φλεγμονή αποτελεί ένα φυσιολογικό στάδιο της διαδικασίας επούλωσης και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο για την απομάκρυνση των μολυσματικών μικροοργανισμών. Ωστόσο, ελλείψει αποτελεσματικής αντισηψίας, η φλεγμονή μπορεί να παραταθεί, καθώς η μικροβιακή κάθαρση είναι ελλιπής. Τόσο τα βακτηρίδια, όσο και οι ενδοτοξίνες μπορούν να οδηγήσουν στην παρατεταμένη αύξηση των προφλεγμονωδών κυτταροκινών όπως της IL-1 και του TNF- α και να επιμηκύνουν τη φλεγμονώδη φάση. Εάν αυτό συνεχιστεί, η πληγή μπορεί να εισέλθει σε χρόνια κατάσταση και να μην προχωρήσει η επουλωτική διαδικασία. Αυτή η παρατεταμένη φλεγμονή οδηγεί επίσης σε αυξημένο επίπεδο μεταλλοπρωτεϊνών της εξωκυττάριας μήτρας (MMPs). Σε συνδυασμό με την αυξημένη περιεκτικότητα σε πρωτεάσες παρατηρείται μειωμένη εντόπιση των αναστολέων πρωτεϊνών, με αποτέλεσμα να προκαλείται ανισορροπία. Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε ταχεία

αλλοίωση των αυξητικών παραγόντων που εμφανίζονται σε χρόνιες πληγές (Harding και Edwards, 2004; Menke et al., 2007).

Τα βακτήρια σε μολυσμένα έλκη έχουν την ικανότητα να εμφανίζονται και με τη μορφή βιοϋμενίου (biofilm). Το βιοϋμένιο αποτελεί μια σύνθετη κοινότητα συσσωματωμένων βακτηρίων που είναι ενσωματωμένα σε μια αυτοεκκρινόμενη μήτρα εξωκυττάρου πολυσακχαρίτη (extracellular polysaccharide matrix) (Harding και Edwards, 2004). Τα ώριμα βιοϋμένια αναπτύσσουν ένα καλά προστατευμένο μικροπεριβάλλον και χαρακτηρίζονται από ισχυρή αντοχή έναντι στη συμβατική θεραπεία με αντιβιοτικά. Τα *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* και β-αιμολυτικός στρεπτόκοκκος αποτελούν τα πιο κοινά βακτηρίδια σε μολυσμένα και κλινικά μη μολυσμένα έλκη (Harding και Edwards, 2004, Davis et al., 2008).



Εικόνα: κυκλικός τρόπος ανάπτυξης βιοϋμενίου (Bay Area Lyme Foundation, 2015)

Τα *S. aureus* και *P. aeruginosa* φαίνεται ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στη βακτηριακή μόλυνση στις πληγές. Πολλά χρόνια έλκη δυσκολεύονται να επουλωθούν λόγω της παρουσίας βιοϋμενίου που παρουσιάζει η *P. aeruginosa*, προστατευόμενη έτσι από τη φαγοκυτταρική δραστηριότητα των πολυμορφοπύρηνων ουδετερόφιλων (PMNs). Αυτός ο μηχανισμός μπορεί να εξηγήσει πολλές φορές την αποτυχία των αντιβιοτικών κατά την χορήγηση σε χρόνια έλκη (Bjarnsholt et al., 2008).

2.4.1.2 Οξυγόνωση

Το οξυγόνο παίζει καθοριστικό ρόλο στον μεταβολισμό των κυττάρων (παραγωγή ενέργειας μέσω του ATP) και είναι σημαντικό για όλες σχεδόν τις διεργασίες επούλωσης των ελκών. Προλαμβάνει τη μόλυνση των πληγών, προκαλεί αγγειογένεση, αυξάνει τη διαφοροποίηση και μετανάστευση των κερατινοκυττάρων, και συντελεί στην επιθηλιοποίηση, ενισχύει τον πολλαπλασιασμό των ινοβλαστών και τη σύνθεση κολλαγόνου και προάγει τη συστολή του τραύματος (Bishop, 2008; Rodríguez et al., 2008). Λόγω αγγειακής διαταραχής και υψηλής κατανάλωσης

οξυγόνου από μεταβολικά ενεργά κύτταρα, το μικροπεριβάλλον της πρώιμης πληγής εξαντλείται από οξυγόνο και είναι με αποτέλεσμα να καθίσταται υποξικό. Αρκετές συστηματικές καταστάσεις, συμπεριλαμβανομένης της προχωρημένης ηλικίας και του διαβήτη, μπορούν να δημιουργήσουν βλάβη της αγγειακής ροής, προκαλώντας κακή οξυγόνωση των ιστών. Τα χρόνια έλκη είναι ιδιαίτερα υποξικά. Οι τάσεις οξυγόνου που έχουν μετρηθεί διαδερμικά σε χρόνιες πληγές κυμαίνονται στα 5-20 mm Hg, σε αντίθεση με τις φυσιολογικές τιμές που κυμαίνονται στα 30-50 mm Hg (Tandara και Mustoe, 2004).

Σε πληγές όπου η οξυγόνωση δεν αποκαθίσταται, η επούλωση εξασθενεί. Η προσωρινή υποξία μετά από τραυματισμό βοηθά στην επούλωση, αλλά η παρατεταμένη ή η χρόνια υποξία καθυστερεί την επούλωση των πληγών (Bishop, 2008; Rodriguez et al., 2008). Στις οξείες πληγές, η υποξία χρησιμεύει ως ένα σήμα που διεγείρει πολλές πτυχές της επουλωτικής διαδικασίας, αφού μπορεί να προκαλέσει την παραγωγή κυτταροκινών και αυξητικών παραγόντων από μακροφάγα, κερατινοκύτταρα και ινοβλάστες. Οι κυτταροκίνες που παράγονται ως απόκριση στην υποξία περιλαμβάνουν PDGF, TGF-β, VEGF, τον παράγοντα νέκρωσης όγκων-α (TNF-α) και προάγουν σημαντικά τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη χημειοταξία και την αγγειογένεση κατά την επούλωση πληγών (Rodriguez et al., 2008).

Κατά τη φυσιολογική διαδικασία της επούλωσης, οι ενεργές μορφές οξυγόνου (ROS), όπως το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H₂O₂) και το ανιόν υπεροξειδίου ($\cdot\text{O}^{2-}$), θεωρείται ότι δρουν ως κυτταρικοί αγγελιοφόροι διεγείροντας τις βασικές διεργασίες που σχετίζονται με την επούλωση, συμπεριλαμβανομένης της κινητικότητας των κυττάρων, της δράσης των κυτταροκινών αλλά και της αγγειογένεσης. Τόσο η υποξία όσο και η υπεροξία αυξάνουν την παραγωγή ROS, αλλά ένα ιδιαίτερα αυξημένο επίπεδο αυτών ξεπερνά το ευεργετικό αποτέλεσμα και προκαλεί επιπρόσθετη βλάβη των ιστών (Rodriguez et al., 2008).

Συνοπτικά, η επίτευξη επιθυμητών επιπέδων οξυγόνου είναι ζωτικής σημασίας για τη βέλτιστη επούλωση πληγών. Η υποξία διεγείρει την επούλωση μέσω διεργασιών όπως η απελευθέρωση αυξητικών παραγόντων και η αγγειογένεση, αλλά το οξυγόνο αποτελεί απαραίτητο παράγοντα για τη διατήρηση της επουλωτικής διαδικασίας (Bishop, 2008).

2.4.2 Συστηματικοί παράγοντες

2.4.2.1 Ηλικία

Ο πληθυσμός ηλικιωμένων (άτομα άνω των 60 ετών) αναπτύσσεται ταχύτερα από οποιαδήποτε άλλη ηλικιακή ομάδα (Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (World Health Organization, 2018) και η αυξημένη ηλικία αποτελεί μείζονα παράγοντα κινδύνου για την καθυστέρηση της επούλωσης των πληγών. Πολλές κλινικές και προκλινικές μελέτες τόσο σε κυτταρικό όσο και σε μοριακό επίπεδο έχουν εξετάσει τον συσχετισμό μεταξύ ηλικίας και καθυστέρησης επούλωσης. Σε υγιείς ηλικιωμένους συνήθως παρατηρείται ότι η γήρανση προκαλεί μια χρονική καθυστέρηση στην επούλωση πληγών, αλλά χωρίς να επηρεάζεται η ποιότητα της επούλωσης (Gosain

και DiPietro, 2004; Keylock et al., 2008). Η καθυστερημένη επούλωση τραυμάτων στους ηλικιωμένους σχετίζεται με μια αλλοιωμένη φλεγμονώδη απόκριση, όπως η καθυστερημένη διήθηση των T-κυττάρων στην περιοχή του τραύματος με αλλοιώσεις στην παραγωγή χημειοκινών και μειωμένη φαγοκυτταρική ικανότητα των μακροφάγων (Swift et al., 1999). Η καθυστέρηση στην επιθηλιοποίηση, στη σύνθεση κολλαγόνου και στην αγγειογένεση έχουν παρατηρηθεί επίσης σε ηλικιωμένους μυς σε σύγκριση με νεαρούς (Swift et al., 1999). Γενικά, οι διαφορές στην διαδικασία της επούλωσης μεταξύ νέων και ηλικιωμένων ατόμων είναι σημαντικές. Οι αλλαγές στην επουλωτική διαδικασία που σχετίζονται με την ηλικία εντοπίζονται σε κάθε φάση της επούλωσης όπως για παράδειγμα αυξημένη συσσωμάτωση αιμοπεταλίων, αυξημένη έκκριση φλεγμονωδών μεσολαβητών, καθυστερημένη διήθηση μακροφάγων και λεμφοκυττάρων, μειωμένη λειτουργία μακροφάγων, μειωμένη έκκριση αυξητικών παραγόντων, καθυστερημένη επανεπιθηλιοποίηση, καθυστερημένη αγγειογένεση και εναπόθεση κολλαγόνου και μειωμένη αντοχή πληγής (Gosain και DiPietro, 2004).

Έχουν μελετηθεί αρκετές θεραπείες για τη μείωση της εξαρτώμενης με την ηλικία καθυστέρησης της επούλωσης. Ενδιαφέρον παρουσιάζει ότι η άσκηση βελτιώνει την επούλωση δερματικών πληγών σε ηλικιωμένους και η βελτίωση αυτή σχετίζεται με μειωμένα επίπεδα προφλεγμονωδών κυτταροκινών στην περιοχή του τραύματος. (Emery et al., 2005; Keylock et al., 2008).

2.4.2.2 Ορμόνες φύλου

Οι ορμόνες φύλου παίζουν ρόλο στην επούλωση των ελκών που σχετίζονται με την ηλικία. Σε σύγκριση με ηλικιωμένες γυναίκες, στους ηλικιωμένους άνδρες έχει παρατηρηθεί μεγαλύτερη καθυστέρηση στην επούλωση μιας οξείας πληγής. Μια εξήγηση για το φαινόμενο αυτό μπορεί να αποτελεί ότι τα οιστρογόνα (οιστρονή και 17β-οιστραδιόλη), τα ανδρογόνα (τεστοστερόνη και 5α-διυδροτεστοστερόνη, DHT), αλλά και το πρόδρομο μόριο αυτών, η δεϋδροεπιανδροστερόνη (DHEA) έχουν σημαντικές επιδράσεις στη διαδικασία επούλωσης (Gilliver et al., 2007). Πρόσφατα διαπιστώθηκε ότι οι διαφορές στην γονιδιακή έκφραση κατά την επούλωση μεταξύ ηλικιωμένων ανδρών και νεαρών ατόμων είναι σχεδόν αποκλειστικά ρυθμιζόμενη από τα οιστρογόνα (Hardman και Ashcroft, 2008). Τα οιστρογόνα επηρεάζουν την επουλωτική διαδικασία ρυθμίζοντας αρκετά γονίδια που σχετίζονται με την αναγέννηση, την αναστολή πρωτεασών, την επιδερμική λειτουργία και κυρίως με τη φλεγμονή (Hardman και Ashcroft, 2008). Μελέτες υποδεικνύουν ότι τα οιστρογόνα μπορούν να βελτιώσουν την εξασθένηση της επούλωσης που σχετίζεται με την ηλικία τόσο στους άνδρες όσο και στις γυναίκες, ενώ τα ανδρογόνα συντελούν αρνητικά στην δερματική επούλωση ελκών (Gilliver et al., 2007).

2.4.2.3 Φαρμακευτική Αγωγή

Πολλά φάρμακα, όπως αυτά που παρεμποδίζουν τον σχηματισμό θρόμβων ή τη λειτουργία των αιμοπεταλίων ή τις φλεγμονώδεις αποκρίσεις και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, έχουν την ικανότητα να επηρεάζουν την επούλωση

του τραύματος. Παρακάτω θα αναφερθούν μόνο τα συνήθως χρησιμοποιούμενα φάρμακα που έχουν σημαντικό αντίκτυπο στην επούλωση, συμπεριλαμβανομένων των γλυκοκορτικοειδών, των μη στεροειδών αντιφλεγμονωδών φαρμάκων (ΜΣΑΦ) και των χημειοθεραπευτικών φαρμάκων.

Γλυκοκορτικοειδή

Τα συστηματικά γλυκοκορτικοειδή, τα οποία χρησιμοποιούνται συχνά ως αντιφλεγμονώδη, είναι γνωστό ότι αναστέλλουν την επιδιόρθωση του τραύματος μέσω των εκτενών αντιφλεγμονωδών δράσεών τους και της καταστολής των κυτταρικών αποκρίσεων σε πληγές, συμπεριλαμβανομένου του πολλαπλασιασμού των ινοβλαστών και της σύνθεσης κολλαγόνου. Τα συστηματικά στεροειδή μπορεί να προκαλέσουν επούλωση με ελλιπή κοκκιωματώδη ιστό και μειωμένη συρρίκνωση του τραύματος (Franz et al., 2007). Τα γλυκοκορτικοειδή αναστέλλουν επίσης την παραγωγή του από υποξία επαγόμενου παράγοντα-1 (HIF-1), ενός βασικού μεταγραφικού παράγοντα στην επούλωση τραυμάτων (Wagner et al., 2008). Πέρα από τις επιπτώσεις στις φάσεις της επούλωσης, τα συστηματικά κορτικοστεροειδή μπορεί να αυξήσουν τον κίνδυνο μόλυνσης των ελκών. Ενώ τα συστηματικά κορτικοστεροειδή αναστέλλουν την επιδιόρθωση του τραύματος, η τοπική εφαρμογή παράγει αρκετά διαφορετικά αποτελέσματα.

Η τοπική χορήγηση χαμηλής δόσης κορτικοστεροειδών σε χρόνια έλκη έχει βρεθεί ότι επιταχύνει την επούλωση, μειώνει τον πόνο και το παραγόμενο εξίδρωμα και καταστέλλει το σχηματισμό υπερκοκκιωματώδους ιστού στο 79% των περιπτώσεων. Μπορεί αυτά τα θετικά αποτελέσματα να είναι εντυπωσιακά, αλλά απαιτείται ιδιαίτερα προσεκτική παρακολούθηση για να αποφευχθεί ο αυξημένος κίνδυνος μόλυνσης μετά από παρατεταμένη χρήση (Hofman et al., 2007).

Μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα

Τα μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα (NSAIDs) όπως η ιβουπροφαίνη χρησιμοποιούνται ευρέως για τη θεραπεία της φλεγμονής και για τη διαχείριση του πόνου. Η χαμηλή δόση ασπιρίνης, λόγω της αντιαιμοπεταλιακής λειτουργίας της, χρησιμοποιείται συνήθως ως προληπτικό θεραπευτικό μέσο για καρδιαγγειακή νόσο και όχι ως αντιφλεγμονώδες φάρμακο (Pieringer et al., 2007). Υπάρχουν λίγα δεδομένα που υποδεικνύουν ότι τα η βραχεία χρήση ΜΣΑΦ έχει αρνητικό αντίκτυπο στην επούλωση. Ωστόσο, το ζήτημα του κατά πόσο τα μακράς χρήσης ΜΣΑΦ παρεμβαίνουν στην επούλωση τραυμάτων παραμένει ανοιχτό. Σε πειραματόζωα, η συστηματική χρήση ιβουπροφαίνης κατέδειξε διακοπή πολλαπλασιασμού των κυττάρων, με αποτέλεσμα τον μειωμένο αριθμό ινοβλαστών, εξασθενημένη αντοχή σε θραύση, μειωμένη συρρίκνωση του τραύματος, καθυστερημένη επιθηλιοποίηση (Dong et al., 1993; Dvivedi et al., 1997; Krischak et al., 2007) και μειωμένη αγγειογένεση (Jones et al., 1999). Όσον αφορά την τοπική εφαρμογή των ΜΣΑΦ

στην τραυματική περιοχή χρόνιων ελκών, η χρήση του αφρού ιβουπροφαίνης παρέχει την επιθυμητή υγρή επούλωση των πληγών, μειώνοντας τόσο τον προσωρινό όσο και τον επίμονο πόνο του τραύματος και ωφελεί ιδιαίτερα τα χρόνια έλκη λόγω φλεβικής ανεπάρκειας (Price et al., 2007).

Χημειοθεραπευτικά φάρμακα

Τα περισσότερα χημειοθεραπευτικά φάρμακα έχουν σχεδιαστεί για να αναστέλλουν τον κυτταρικό μεταβολισμό, την ταχεία κυτταρική διαίρεση και την αγγειογένεση και έτσι να αναστέλλουν πολλά από τα μονοπάτια που είναι κρίσιμα για την κατάλληλη επιδιόρθωση του τραύματος. (Waldron και Zimmerman-Pope, 2003; Franz et al., 2007). Τα φάρμακα αυτά καθυστερούν την κυτταρική μετανάστευση στο τραύμα, μειώνουν την παραγωγή κολλαγόνου, τον πολλαπλασιασμό των ινοβλαστών και εμποδίζουν τη συρρίκνωση των τραυμάτων (Franz et al., 2007). Επιπλέον, αυτοί οι παράγοντες αποδυναμώνουν τις ανοσολογικές λειτουργίες των ασθενών και έτσι παρεμποδίζουν τη φλεγμονώδη φάση της επούλωσης και αυξάνουν τον κίνδυνο μόλυνσης. Η χημειοθεραπεία προκαλεί ουδετεροπενία, αναιμία και θρομβοκυτταροπενία, αφήνοντας έτσι τα τραύματα ευάλωτα σε λοίμωξη, μειώνοντας την παροχή οξυγόνου στο τραύμα και αυξάνοντας τον κίνδυνο υπερβολικής αιμορραγίας στο σημείο της πληγής. (Lawrence et al., 1986).

2.4.2.4 Κάπνισμα

Είναι γνωστό ότι το κάπνισμα αυξάνει τον κίνδυνο καρδιακής και αγγειακής νόσου, εγκεφαλικού επεισοδίου, χρόνιας ασθένειας των πνευμόνων και πολλών ειδών καρκίνου. Επιπλέον, οι αρνητικές επιδράσεις του καπνίσματος επί της επούλωσης είναι εδώ και καιρό γνωστές (Siana et al., 1989; Jensen et al., 1991; Ahn et al., 2008). Πάνω από 4000 ουσίες στον καπνό του τσιγάρου έχουν εντοπιστεί και μερικές από αυτές έχει αποδειχθεί ότι έχουν αρνητικό αντίκτυπο στην επούλωση (Ahn et al., 2008). Οι περισσότερες μελέτες επικεντρώθηκαν στις επιδράσεις της νικοτίνης, του μονοξειδίου του άνθρακα και του υδροκυανίου που εντοπίζονται στον καπνό. Η νικοτίνη παρεμβαίνει στην παροχή οξυγόνου προκαλώντας ισχαιμία του ιστού, αφού μπορεί να προκαλέσει μειωμένη ροή αίματος μέσω των αγγειοσυσπαστικών επιδράσεων (Ahn et al., 2008; Sørensen et al., 2009). Επίσης, διεγείρει τη συμπαθητική νευρική δραστηριότητα, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση επινεφρίνης, η οποία προκαλεί περιφερική αγγειοσυστολή και μειωμένη αιμάτωση ιστού. Η νικοτίνη αυξάνει το ιξώδες του αίματος λόγω μείωσης της ινωδολυτικής δράσης και αύξησης της συγκολλητικότητας των αιμοπεταλίων. Εκτός από τις επιδράσεις της νικοτίνης, το μονοξείδιο του άνθρακα στον καπνό του τσιγάρου προκαλεί επίσης υποξία, αφού συνδέεται με την αιμοσφαιρίνη με συγγένεια 200 φορές μεγαλύτερη από αυτή του οξυγόνου, με αποτέλεσμα να προκύπτει μειωμένο κλάσμα οξυγονωμένης αιμοσφαιρίνης στην κυκλοφορία του αίματος. Το υδροκυάνιο, ένα άλλο καλά μελετημένο συστατικό του καπνού, αλλοιώνει τον κυτταρικό μεταβολισμό

του οξυγόνου, οδηγώντας σε μειωμένη κατανάλωση οξυγόνου στους ιστούς. Πέρα από αυτές τις άμεσες επιδράσεις στο ιστό, το κάπνισμα αυξάνει τον κίνδυνο για αθηροσκλήρωση και χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια, δύο καταστάσεις που μπορεί επίσης να μειώσουν τη συγκέντρωση του οξυγόνου στον ιστό (Siana et al., 1989; Jensen et al., 1991; Ahn et al., 2008).

Αρκετοί κυτταρικοί τύποι και διεργασίες που είναι σημαντικές για την επούλωση έχει αποδειχθεί ότι επηρεάζονται δυσμενώς από τον καπνό του τσιγάρου. Στη φλεγμονώδη φάση, το κάπνισμα προκαλεί διαταραχή στη μετανάστευση των λευκών αιμοσφαιρίων, με αποτέλεσμα μικρότερους αριθμούς μονοκυττάρων και μακροφάγων στην περιοχή του τραύματος καθώς και μείωση της βακτηριοκτόνου δράσης των ουδετερόφιλων. Η λειτουργία των λεμφοκυττάρων, η κυτταροτοξικότητα των NK κυττάρων και η παραγωγή της IL-1 είναι χαμηλές. (Ahn et al., 2008; McMaster et al., 2008). Αυτές οι επιδράσεις οδηγούν σε κακή επούλωση τραυμάτων και σε αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης λοίμωξης της πληγής. Κατά τη διάρκεια της φάσης σχηματισμού του ιστού, η έκθεση σε καπνό προκαλεί μειωμένη μετανάστευση και πολλαπλασιασμό των ινοβλαστών, μειωμένη συρρίκνωση του τραύματος, παρεμπόδιση της επιθηλιακής αναγέννησης, μειωμένη παραγωγή εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας και διαταραχή στην ισορροπία των πρωτεασών (Ahn et al., 2008).

Τέλος, έχει αποδειχθεί ότι η διακοπή του καπνίσματος οδηγεί σε βελτιωμένη αποκατάσταση και περιορίζει τη μόλυνση του τραύματος (Sorensen et al., 2009; Lauerman, 2008). Παρά τις γενικά αρνητικές συνέπειες του καπνίσματος, πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι χαμηλές δόσεις νικοτίνης ενισχύουν την αγγειογένεση και στην πραγματικότητα βελτιώνουν την επούλωση (Jacobi et al., 2002; Morimoto et al., 2008).

2.4.2.5 Διατροφή

Για περισσότερα από 100 χρόνια, η διατροφή έχει αναγνωριστεί ως ένας πολύ σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει την επούλωση πληγών. Ο υποσιτισμός ή η ανεπαρκής πρόσληψη συγκεκριμένων θρεπτικών ουσιών μπορεί να έχουν σημαντικό αντίκτυπο στην επούλωση ελκών (Arnold and Barbul, 2006).

Υδατάνθρακες, πρωτεΐνες και αμινοξέα

Μαζί με τα λίπη, οι υδατάνθρακες αποτελούν την κύρια πηγή ενέργειας στην διαδικασία της επούλωσης. Η γλυκόζη είναι η κύρια πηγή καυσίμου που χρησιμοποιείται για τη δημιουργία του κυτταρικού ATP που παρέχει ενέργεια για την αγγειογένεση και την εναπόθεση των νέων ιστών (Shepherd, 2003). Η χρήση της

γλυκόζης ως πηγής για τη σύνθεση της ATP είναι απαραίτητη για την πρόληψη της εξάντλησης αμινοξέων και πρωτεϊνών (Arnold και Barbul, 2006).

Οι πρωτεΐνες αποτελούν έναν από τους σημαντικότερους θρεπτικούς παράγοντες που επηρεάζουν την επούλωση των πληγών. Ανεπάρκεια πρωτεϊνών μπορεί να επηρεάσει το σχηματισμό τριχοειδών, τον πολλαπλασιασμό των ινοβλαστών, τη σύνθεση πρωτεογλυκάνης και κολλαγόνου αλλά και την αναδιαμόρφωση του τραύματος. Επίσης, μπορεί να επηρεάσει το ανοσοποιητικό σύστημα, με αποτέλεσμα τη μειωμένη φαγοκυττάρωση των λευκοκυττάρων και την αυξημένη ευαισθησία σε λοίμωξη (Gogia, 1995). Το κολλαγόνο είναι το κύριο πρωτεϊνικό συστατικό του συνδετικού ιστού και αποτελείται κυρίως από γλυκίνη, προλίνη και υδροξυπρολίνη. Η σύνθεση κολλαγόνου απαιτεί υδροξυλίωση της λυσίνης και της προλίνης και συναπάρχοντες όπως ο σιδηρούχος σίδηρος και η βιταμίνη C. Η καθυστερημένη επούλωση ελκών μπορεί να οφείλεται σε ανεπάρκεια οποιουδήποτε από αυτούς τους συμπαράγοντες (Campos et al., 2008).

Η αργινίνη είναι ένα ημιαπαραίτητο αμινοξύ που απαιτείται κατά τη διάρκεια περιόδων μέγιστης ανάπτυξης, έντονης καταπόνησης και τραυματισμού. Έχει πολλές επιδράσεις στο σώμα, συμπεριλαμβανομένης της διαμόρφωσης της ανοσολογικής λειτουργίας, της επούλωσης πληγών, της έκκρισης ορμονών, του αγγειακού τόνου και της ενδοθηλιακής λειτουργίας. Η αργινίνη είναι επίσης πρόδρομος της προλίνης και ως εκ τούτου απαιτούνται επαρκή επίπεδα για την υποστήριξη της απόθεσης κολλαγόνου, της αγγειογένεσης και της συρρίκνωσης των πληγών (Shepherd, 2003, Campos et al., 2008). Η αργινίνη βελτιώνει την ανοσολογική λειτουργία και διεγείρει την επούλωση πληγών σε υγιή και σε ασθενή άτομα (Tong and Barbul, 2004). Κάτω από καταστάσεις ψυχολογικού άγχους, η μεταβολική ζήτηση της αργινίνης αυξάνεται και η συμπλήρωσή της έχει αποδειχθεί ότι είναι μια αποτελεσματική επικουρική θεραπεία στην επούλωση πληγών (Campos et al., 2008).

Η γλουταμίνη είναι το πιο άφθονο αμινοξύ στο πλάσμα και αποτελεί κύρια πηγή μεταβολικής ενέργειας για τα ταχέως πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα όπως ινοβλάστες, λεμφοκύτταρα, επιθηλιακά κύτταρα και μακροφάγα (Arnold and Barbul, 2006, Campos et al., 2008). Η γλουταμίνη διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στη διέγερση της φλεγμονώδους ανοσολογικής απάντησης που εμφανίζεται στην επούλωση πληγών (Arnold and Barbul, 2006). Η από του στόματος λήψη γλουταμίνης έχει αποδειχθεί ότι βελτιώνει την ποιότητα της επούλωσης και αυξάνει τα επίπεδα του ώριμου κολλαγόνου (Da Costa et al., 2003).

Λιπαρά οξέα

Τα λιπίδια πολύ συχνά χρησιμοποιούνται ως διατροφική υποστήριξη μετεγχειρητικά ή σε ασθενείς σε κρίσιμη κατάσταση για να βοηθήσουν στην κάλυψη των ενεργειακών αναγκών και να παρέχουν ουσιαστικές δομικές μονάδες για την επούλωση πληγών και την αποκατάσταση ιστών. Τα οφέλη για την υγεία των ω-3

λιπαρών οξέων όπως το εικοσαπεντανοϊκό οξύ (EPA) και το εικοσιδιαεξανοϊκό οξύ (DHA) έχουν ερευνηθεί διεξοδικά. Τα ω-3 λιπαρά οξέα επηρεάζουν την παραγωγή προφλεγμονωδών κυτταροκινών, το μεταβολισμό των κυττάρων, την έκφραση γονιδίων αλλά και την αγγειογένεση στις περιοχές τραυμάτων (McDaniel et al., 2008; Shingel et al., 2008). Το πραγματικό όφελος όμως των ω-3 λιπαρών οξέων έγκειται στην ικανότητά τους να βελτιώνουν τη συστηματική ανοσολογική λειτουργία του ξενιστή, μειώνοντας έτσι τις μολυσματικές επιπλοκές και βελτιώνοντας την ποιότητα ζωής (Arnold and Barbul, 2006).

Βιταμίνες και μικροθρεπτικά συστατικά

Οι βιταμίνες C (L-ασκορβικό οξύ), A (ρετινόλη) και E (τοκοφερόλη) παρουσιάζουν ισχυρά αντιοξειδωτικά και αντιφλεγμονώδη αποτελέσματα. Η βιταμίνη C διαδραματίζει αρκετούς ρόλους στην επούλωση και η ανεπάρκειά της προκαλεί πολλαπλά προβλήματα. Σε περιπτώσεις ανεπάρκειας βιταμίνης C εμφανίζεται καθυστέρηση στην επούλωση λόγω μείωσης σύνθεσης κολλαγόνου, πολλαπλασιασμού ινοβλαστών, αγγειογένεσης αλλά και λόγω αύξησης της αστάθειας των τριχοειδών αγγείων. Επίσης, η ανεπάρκεια βιταμίνης C οδηγεί σε εξασθενημένη ανοσοαπόκριση με αποτέλεσμα αυξημένη ευαισθησία σε λοιμώξεις (Arnold and Barbul, 2006; Campos et al., 2008). Ομοίως, η έλλειψη βιταμίνης A οδηγεί σε καθυστέρηση της επουλωτικής διαδικασίας. Οι βιολογικές ιδιότητες της βιταμίνης A περιλαμβάνουν αντιοξειδωτική δράση, αύξηση πολλαπλασιασμού των ινοβλαστών, ρύθμιση της κυτταρικής διαφοροποίησης και πολλαπλασιασμού, αύξηση σύνθεσης κολλαγόνου και υαλουρονικού οξέος και μείωση της αποικοδόμησης της εξωκυττάριας μήτρας από τις μεταλλοπρωτεϊνάσες (Burgess, 2008). Η βιταμίνη E, ως αντιοξειδωτικό, διατηρεί και σταθεροποιεί την ακεραιότητα της κυτταρικής μεμβράνης παρέχοντας προστασία από την καταστροφή λόγω οξειδωσης. Η βιταμίνη E έχει επίσης αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες και διαδραματίζει ρόλο στη μείωση του σχηματισμού ουλής σε χρόνια έλκη. Προκλινικές μελέτες έδειξαν ότι η χορήγηση βιταμίνης E είναι ευεργετική για την επούλωση τραυμάτων (Arnold and Barbul, 2006; Burgess, 2008) και τοπικά έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως ως παράγοντας κατά του σχηματισμού ουλής. Ωστόσο, οι κλινικές μελέτες δεν έχουν ακόμη αποδείξει αν η τοπική χορήγηση βιταμίνης E βελτιώνει τα θεραπευτικά αποτελέσματα (Khoosal και Goldman, 2006).

Πολλά μικροθρεπτικά συστατικά έχει αποδειχθεί ότι είναι σημαντικά για την επούλωση. Το μαγνήσιο λειτουργεί ως συμπάροντας για πολλά ένζυμα που εμπλέκονται στη σύνθεση πρωτεϊνών και κολλαγόνου, ενώ ο χαλκός είναι απαραίτητος συμπάροντας για την κυτοχρωμική οξειδάση, και για την καλύτερη διασταυρούμενη σύνδεση (cross-linking) του κολλαγόνου. Ο ψευδάργυρος είναι συμπάροντας για την RNA και DNA πολυμεράση, ενώ ανεπάρκεια ψευδαργύρου προκαλεί σημαντική αδυναμία στην επούλωση πληγών. Ο σίδηρος απαιτείται για την υδροξυλίωση της προλίνης και της λυσίνης και, ως αποτέλεσμα, σοβαρή έλλειψη

σιδήρου μπορεί να οδηγήσει σε καταστάσεις μειωμένης παραγωγής κολλαγόνου (Shepherd, 2003; Arnold and Barbul, 2006; Campos et al., 2008).

Οι διατροφικές ανάγκες σε τραυματικές καταστάσεις είναι πολύπλοκες και μια σύνθετη διατροφική υποστήριξη θα ωφελήσει τόσο την οξεία όσο και τη χρόνια επούλωση. Πρόσφατη κλινική έρευνα εξέτασε τα αποτελέσματα ενός συμπληρώματος πλούσιο σε πρωτεΐνες που περιείχε αργινίνη, βιταμίνη C, βιταμίνη E και ψευδάργυρο σε ασθενείς με έλκος κατακλίσεως και έδειξε ότι αυτό το συμπλήρωμα με υψηλή θρεπτική αξία βελτίωσε τη συνολική επούλωση των ασθενών (Heyman et al., 2008).

2.4.2.6 Παχυσαρκία

Η παχυσαρκία είναι γνωστό ότι αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης πολλών ασθενειών και προβλημάτων υγείας, όπως στεφανιαία νόσο, διαβήτη τύπου 2, καρκίνο, υπέρταση, δυσλιπιδαιμία, εγκεφαλικό επεισόδιο, αναπνευστικά προβλήματα και εξασθενημένη επούλωση πληγών. Τα παχύσαρκα άτομα αντιμετωπίζουν συχνά επιπλοκές που σχετίζονται με την εμφάνιση ελκών, όπως λοίμωξη του δέρματος, κατακλίσεις και φλεβικά έλκη (Wilson και Clark, 2004).

Επιπλέον, η δυσκολία ή η ανικανότητα μετακίνησης των παχύσαρκων ατόμων αυξάνει τον κίνδυνο τραυματισμών που σχετίζονται με την πίεση (κατακλίσεις). Οι πτυχές του δέρματος φιλοξενούν μικροοργανισμούς που ευδοκιμούν σε υγρές περιοχές και συμβάλλουν στη μόλυνση και στην λύση των ιστών. Η τριβή που προκαλείται από την επαφή του δέρματος με το δέρμα προκαλεί εξέλκωση. Όλοι αυτοί οι παράγοντες προδιαθέτουν τα παχύσαρκα άτομα στην ανάπτυξη και στη δυσκολία αντιμετώπισης των ελκών (Wilson και Clark, 2004; Anaya και Dellinger, 2006; Greco et al., 2008).

Εκτός από τις τοπικές συνθήκες, οι συστηματικοί παράγοντες παίζουν επίσης σημαντικό ρόλο στην εξασθένηση της επούλωσης των πληγών και των επιπλοκών των τραυμάτων σε παχύσαρκους ασθενείς. Η παχυσαρκία μπορεί να συνδεθεί με το άγχος και την κατάθλιψη, δηλαδή καταστάσεις που μπορούν να προκαλέσουν μια εξασθενημένη ανοσοαπόκριση (Wilson και Clark, 2004). Ο λιπώδης ιστός θεωρήθηκε κυρίως ως αποθήκη θερμίδων. Ωστόσο, πρόσφατα ευρήματα έχουν τεκμηριώσει ότι ο λιπώδης ιστός εκκρίνει μια μεγάλη ποικιλία βιοδραστικών ουσιών που ονομάζονται συλλογικά λιποκίνες. Τόσο τα ίδια τα λιποκύτταρα όσο και τα μακροφάγα μέσα στον λιπώδη ιστό είναι γνωστό ότι παράγουν βιοδραστικά μόρια που περιλαμβάνουν κυτταροκίνες, χημειοκίνες και παράγοντες που μοιάζουν με ορμόνες όπως η λεπτίνη, η λιπονεκτίνη και η ρεζιστίνη. Οι λιποκίνες έχουν βαθιά επίδραση στην ανοσολογική και φλεγμονώδη απόκριση (Juge-Aubry et al., 2005; Calabro και Yeh, 2007; Wozniak et al., 2009). Η αρνητική επίδραση των λιποκινών στη συστηματική ανοσολογική αντίδραση φαίνεται να επηρεάζει τη διαδικασία επούλωσης, αν και δεν υπάρχει άμεση συσχέτιση. Η μειωμένη λειτουργία των μονοπύρηνων κυττάρων του περιφερικού αίματος, ο μειωμένος πολλαπλασιασμός λεμφοκυττάρων και τα διαφοροποιημένα περιφερικά επίπεδα κυτταροκινών έχουν

αναφερθεί στην παχυσαρκία. Είναι σημαντικό, ωστόσο, ότι πολλές από τις αλλαγές που σχετίζονται με την παχυσαρκία στην περιφερική ανοσολογική λειτουργία βελτιώνονται με την απώλεια βάρους (Nieman et al., 1999; Fontana et al., 2007; de Mello et al., 2008).

2.4.2.7 Άγχος - Ψυχικό στρες

Το άγχος έχει μεγάλο αντίκτυπο στην ανθρώπινη υγεία και την κοινωνική συμπεριφορά. Πολλές ασθένειες, όπως οι καρδιαγγειακές παθήσεις, ο καρκίνος, τα άτονα έλκη και ο διαβήτης, σχετίζονται με το άγχος. Πολλές μελέτες επιβεβαίωσαν ότι η από άγχος επαγόμενη διάσπαση της νευροενδοκρινικής ανοσολογικής ισορροπίας επηρεάζει την κατάσταση της υγείας (Glaser και Kiecolt-Glaser, 2005).

Μελέτες τόσο σε ανθρώπους όσο και σε ζώα έχουν δείξει ότι το ψυχολογικό στρες προκαλεί σημαντική καθυστέρηση στην επούλωση πληγών. Οι φροντιστές των ατόμων με Αλτσχάιμερ και οι μαθητές που υποβάλλονταν σε ακαδημαϊκό άγχος κατά τη διάρκεια των εξετάσεων κατέδειξαν καθυστερημένη επούλωση πληγών (Kiecolt-Glaser et al., 1995; Marucha et. al., 1998). Ο άξονας υποθάλαμος-υπόφυση-επινεφρίδια και ο άξονας συμπαθητικό-επινεφρίδια ρυθμίζουν την απελευθέρωση των ορμονών της υπόφυσης και των επινεφριδίων. Αυτές οι ορμόνες περιλαμβάνουν τις αδρενοκορτικοτρόπες ορμόνες, την κορτιζόλη και την προλακτίνη και τις κατεχολαμίνες (επινεφρίνη και νορεπινεφρίνη). Το άγχος ρυθμίζει την παραγωγή γλυκοκορτικοειδών και μειώνει τα επίπεδα των προφλεγμονωδών κυτταροκινών IL-1β, IL-6 και TNF-α στη θέση του τραύματος. Το στρες μειώνει επίσης την έκφραση της IL-1α και της IL-8 στις περιοχές τραύματος, τους δύο χημειοτακτικούς παράγοντες που είναι απαραίτητοι για την αρχική φλεγμονώδη φάση της επούλωσης πληγών (Godbout και Glaser, 2006; Boyapati και Wang, 2007). Επιπλέον, τα γλυκοκορτικοειδή επηρεάζουν τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, καταστέλλοντας τη διαφοροποίηση και τον πολλαπλασιασμό, ρυθμίζοντας τη μεταγραφή γονιδίων και μειώνοντας την έκφραση των μορίων κυτταρικής προσκόλλησης (Sternberg, 2006). Η κορτιζόλη λειτουργεί ως αντιφλεγμονώδης παράγοντας και ρυθμίζει τις ανοσολογικές αποκρίσεις με τη μεσολάβηση Th1 λεμφοκυττάρων, που είναι απαραίτητες για την αρχική φάση της επούλωσης. Έτσι, το ψυχολογικό στρες εμποδίζει την κανονική ανοσία που προκαλείται από τα κύτταρα στην περιοχή του τραύματος, προκαλώντας σημαντική καθυστέρηση στη διαδικασία επούλωσης (Godbout και Glaser, 2006).

Οι αγχογόνοι παράγοντες μπορεί να οδηγήσουν σε αρνητικές συναισθηματικές καταστάσεις, όπως ανησυχία και κατάθλιψη, οι οποίες μπορεί με τη σειρά τους να έχουν αντίκτυπο στις φυσιολογικές διεργασίες ή / και στη συμπεριφορά του ατόμου με αποτέλεσμα να επηρεάζεται η κατάσταση της υγείας του. Εκτός από τις άμεσες επιδράσεις του άγχους και της κατάθλιψης στην ενδοκρινική και ανοσοποιητική λειτουργία, τα άτομα που είναι πολύ πιθανό να έχουν και ανθυγιεινές συνήθειες, όπως κακές συνήθειες ύπνου, ανεπαρκή διατροφή, λιγότερη άσκηση και μεγαλύτερη τάση για κατάχρηση οινόπνευματος, κάπνισμα κ.ά. Όλοι αυτοί οι παράγοντες μπορεί

να συσχετιστούν με καθυστέρηση στην επουλωτική διαδικασία (Guo και DiPietro, 2010).

2.5 Κατηγορίες Ελκών

Τα έλκη μπορούν να ταξινομηθούν σε διάφορες κατηγορίες με βάση την αιτία πρόκλησής τους:

Κατηγορίες Ελκών

- **Μηχανικής αιτιολογίας (τραυματισμοί, εγκαύματα, έλκη ακτινοβολίας, κατακλίσεις, κ.ά.)**
- **Αγγειακής αιτιολογίας (αρτηριακά, φλεβικά, ή/και λεμφικά)**
- **Νευροπαθητικής αιτιολογίας (λόγω σακχαρώδη διαβήτη, συριγγομυελίας κ.ά.)**
- **Νεοπλασματικής αιτιολογίας (μελάνωμα, βασικοκυτταρικό καρκίνωμα, σάρκωμα Karosi κ.ά.)**
- **Μολυσματικής αιτιολογίας**
- **Μεταβολικά έλκη (λόγω σακχαρώδους διαβήτη, υποθυρεοειδισμού κ.ά.)**
- **Φαρμακοεπαγόμενα έλκη**
- **Έλκη λόγω αιματολογικών διαταραχών (λόγω διαταραχών των ερυθρών αιμοσφαιρίων, λευχαιμίας κ.ά.)**
- **Έλκη λόγω υποδερματίτιδας**
- **Άλλης αιτιολογίας (π.χ. γαγγραινώδες πυόδερμα)**

Πίνακας: κατηγορίες ελκών (Phillips και Dover, 1991)

Επιπλέον, τα έλκη διαχωρίζονται σε χρόνια και σε οξέα ανάλογα με την ταχύτητα επούλωσής τους (Yamaguchi και Yoshikawa, 2001). Τα οξέα έλκη γενικά ορίζονται ως εκείνα που προχωρούν μέσα από τις φυσιολογικές φάσεις της επούλωσης και συνήθως εμφανίζουν σημάδια επούλωσης σε λιγότερο από 4 εβδομάδες (McGuckin et al., 2003), ενώ τα χρόνια έλκη ως αυτά που δεν ακολουθούν τη φυσιολογική διαδικασία επούλωσης και δεν παρουσιάζουν σημάδια επούλωσης στο διάστημα των 4 εβδομάδων (Fletcher, 2008).

2.6 Σακχαρώδης Διαβήτης και Δέρμα

2.6.1 Σακχαρώδης Διαβήτης

Το πάγκρεας αποτελεί αδένα του πεπτικού συστήματος με ενδοκρινή και εξωκρινή μοίρα που παράγει πλήθος σημαντικών ορμονών με κυριότερες την ινσουλίνη, το γλυκαγόνο και τη σωματοστατίνη. Η ενδοκρινής μοίρα του παγκρέατος αποτελείται από συναθροίσεις κυττάρων που ονομάζονται νησίδια του Langerhans και είναι διεσπαρμένα εντός της εξωκρινούς μοίρας του αδένα (Ionescu-Tirgoviste et al., 2015). Στο πάγκρεας υπάρχουν πάνω από ένα εκατομμύριο νησίδια, πολλά εκ των οποίων περιέχουν αρκετές εκατοντάδες κυττάρων. Η ενδοκρινής μοίρα του παγκρέατος διαθέτει σημαντική εκκριτική εφεδρεία. Έτσι, η δυσλειτουργία του παγκρέατος γίνεται κλινικά έκδηλη μόνο όταν καταστραφεί ποσοστό μεγαλύτερο του 70% των β-κυττάρων. Τα νησίδια αποτελούνται από τέσσερις τύπους κυττάρων, καθένας από τους οποίους παράγει ένα διαφορετικό κύριο εκκριτικό προϊόν. Τα β-κύτταρα που εκκρίνουν την ινσουλίνη, βρίσκονται στην κεντρική περιοχή των νησιδίων (Χανιώτης και Χανιώτης, 2009). Τα α-κύτταρα εκκρίνουν το γλυκαγόνο, τα δ-κύτταρα εκκρίνουν τη σωματοστατίνη και τα F-κύτταρα (ή PP κύτταρα) το παγκρεατικό πολυπεπίδιο (PP).

Η αυξημένη συγκέντρωση γλυκόζης στο αίμα που σχετίζεται με το σακχαρώδη διαβήτη (Σ.Δ.), προκύπτει από την απουσία ή την ανεπαρκή παγκρεατική έκκριση ινσουλίνης, με ή χωρίς την ταυτόχρονη πλημμελή δράση της ορμόνης. Η ινσουλίνη είναι η κύρια ορμόνη που ρυθμίζει την πρόσληψη της γλυκόζης από το αίμα στα περισσότερα κύτταρα του σώματος, ειδικά στο ήπαρ, στους μυς και στο λιπώδη ιστό. Έτσι τόσο η έλλειψη ινσουλίνης όσο και η απευαισθητοποίηση των υποδοχέων της μπορεί να οδηγήσει σε διάφορες μορφές Σ.Δ. (Gardner et al, 2007).

Το σώμα λαμβάνει γλυκόζη από τρεις διαφορετικές οδούς, με την εντερική απορρόφηση από την τροφή, από τη διάσπαση του γλυκαγόνου και τη γλυκονεογένεση (παραγωγή γλυκόζης από υποστρώματα διαφορετικά των υδατανθράκων) (Gardner et al., 2007). Η ινσουλίνη παίζει κύριο ρόλο στην ισορροπία των επιπέδων της γλυκόζης στον οργανισμό. Μπορεί να αναστείλει τη διάσπαση του γλυκαγόνου ή τη διαδικασία της γλυκονεογένεσης, ή μπορεί να διεγείρει τη μεταφορά της γλυκόζης στα λιπώδη και μυϊκά κύτταρα και να διεγείρει την αποθήκευσή της με τη μορφή γλυκαγόνου.

Η ινσουλίνη απελευθερώνεται στο αίμα από τα β-κύτταρα ως απάντηση αυξημένης γλυκόζης, συνήθως μετά το γεύμα. Χρησιμοποιείται συνήθως από τα 2/3 των κυττάρων του οργανισμού ώστε να απορροφηθεί η γλυκόζη από το αίμα για χρήση ως καύσιμο καθώς και για την αποθήκευσή της. Χαμηλά επίπεδα γλυκόζης οδηγούν σε μειωμένη απελευθέρωση ινσουλίνης και μικρή διάσπαση γλυκαγόνου (Gardner et al., 2007).

Όταν η ποσότητα της ινσουλίνης είναι ανεπαρκής ή όταν τα κύτταρα δεν ανταποκρίνονται στη δράση της (αντοχή ή απευαισθητοποίηση) τότε η γλυκόζη δεν θα απορροφηθεί σωστά από τα κύτταρα του οργανισμού που τη χρειάζονται και δεν θα αποθηκευτεί στο ήπαρ και στους μυς. Αποτέλεσμα αυτής της παθολογικής

διαδικασίας είναι τα αυξημένα επίπεδα γλυκόζης, η μειωμένη πρωτεϊνική σύνθεση και άλλες μεταβολικές διαταραχές όπως η οξείδωση.

Όταν η συγκέντρωση της γλυκόζης στο αίμα παραμείνει αυξημένη για μεγάλα χρονικά διαστήματα, οι νεφροί θα φτάσουν το κατώφλι της επαναρρόφησης και η γλυκόζη θα απεκκριθεί στα ούρα (γλυκοζουρία) (Bender et al., 2012). Το γεγονός αυτό θα αυξήσει την ωσμωτική πίεση των ούρων και θα αναστείλει την επαναρρόφηση του νερού από τους νεφρούς, με αποτέλεσμα την αυξημένη παραγωγή και αποβολή υγρών (πολυουρία). Η μείωση του όγκου του αίματος θα αποκατασταθεί ωσμωτικά από το νερό των κυττάρων του οργανισμού προκαλώντας αφυδάτωση και αύξηση της δίψας (πολυδιψία).

Οι καταστάσεις της νόσου που υπάγονται στη διάγνωση του Σ.Δ. έχουν σήμερα ταξινομηθεί σε τέσσερις κατηγορίες: τύπου 1-ινσουλινοεξαρτώμενος διαβήτης, τύπου 2-μη ινσουλινοεξαρτώμενος διαβήτης, τύπου 3 και τύπου 4 (Gardner et al., 2007).

Ο **σακχαρώδης διαβήτης τύπου 1** χαρακτηρίζεται από απώλεια παραγωγής ινσουλίνης από τα β-κύτταρα των νησιδίων του Langerhans στο πάγκρεας, οδηγώντας σε ανεπάρκεια ινσουλίνης. Τα αίτια είναι άγνωστα, αλλά υποστηρίζεται ότι είναι συνδυασμός γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων. Η προδιάθεση φαίνεται ότι εμπλέκει μία πολυπαραγοντική γενετική σύνδεση, αλλά μόνο το 15-20% των ασθενών παρουσιάζουν θετικό οικογενειακό ιστορικό (Gardner et al., 2007). Ο τύπος αυτός, μπορεί να κατηγοριοποιηθεί σε ανοσοποιητική μορφή ή ιδιοπαθή. Η πλειοψηφία των ασθενών έχει την πρώτη μορφή, όπου τα T κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος επιτίθενται και προκαλείται απώλεια των β-κυττάρων και ινσουλίνης (Rother, 2007). Ο διαβήτης τύπου 1 προσβάλλει παιδιά και ενήλικες, όμως η πλειοψηφία είναι παιδιά.

Η διάγνωση του διαβήτη τύπου 1, γίνεται με μέτρηση της γλυκοζυλιωμένης αιμοσφαιρίνης (A1C) όπου φαίνεται η μέση συγκέντρωση της γλυκόζης στο πλάσμα του αίματος τους 3 τελευταίους μήνες. Δυστυχώς, δεν υπάρχει τρόπος για πρόληψη της νόσου. Η θεραπεία με ινσουλίνη είναι απαραίτητη για την επιβίωση του ασθενούς, και συνήθως χορηγείται με υποδόρια ένεση. Εκτός από τη χορήγηση φαρμάκων, ο ασθενής πρέπει να ακολουθεί συγκεκριμένη διαίτα και άσκηση. Ο αρρυθμιστος διαβήτης μπορεί να προκαλέσει αρκετές επιπλοκές, οξείες και χρόνιες (Gardner et al., 2007). Στις οξείες ανήκουν η διαβητική κετοξέωση και το υπερωσμωτικό κώμα, που είναι επικίνδυνες καταστάσεις για τη ζωή του ασθενούς (Chiang et al., 2014). Στις χρόνιες επιπλοκές ανήκουν οι παθήσεις της καρδιάς, το εγκεφαλικό επεισόδιο, η νεφρική ανεπάρκεια, τα έλκη του άκρου ποδός και η βλάβη των οφθαλμών. Επιπλέον, σοβαρές επιπλοκές μπορεί να συμβούν και σε καταστάσεις υπογλυκαιμίας μετά από υπερβολική δόση ινσουλίνης κατά τη θεραπεία.

Ο **διαβήτης τύπου 2** χαρακτηρίζεται από ιστική αντίσταση στη δράση της ινσουλίνης, σε συνδυασμό με μία σχετική ανεπάρκεια στην έκκριση της ορμόνης. Οι ασθενείς είναι συχνά παχύσαρκοι και εμφανίζουν το διαβήτη στην ενήλικη ζωή. Η επίπτωση αυξάνεται προοδευτικά με την ηλικία όσο η λειτουργία των β-κυττάρων μειώνεται. Η θεραπεία ξεκινά με ρύθμιση της διαίτας παρόλο που τα υπογλυκαιμικά

φάρμακα συνήθως είναι απαραίτητα, και περίπου στο 1/3 των ασθενών απαιτείται χορήγηση ινσουλίνης (Katzung και Staff, 2000).

Τα κλασικά συμπτώματα για Σ.Δ. που δεν έχει θεραπευτεί είναι τα εξής: απώλεια βάρους, πολυουρία, πολυδιψία και πολυφαγία. Τα συμπτώματα μπορούν να αναπτυχθούν πολύ γρήγορα (εβδομάδες ή μήνες) στο διαβήτη τύπου 1, ενώ στο διαβήτη τύπου 2 αναπτύσσονται πιο αργά (Cooke και Plotnick, 2008).

2.6.2 Διαβητικό Δέρμα

Ο Σ.Δ. είναι μία χρόνια και συστηματική νόσος που χαρακτηρίζεται από υπεργλυκαιμία και σοβαρές διαταραχές όπως νεφροπάθεια, νευροπάθεια και οφθαλμολογικά προβλήματα (Gardner et al., 2007). Έχει αναφερθεί ότι το 1/3 των ασθενών που πάσχουν από Σ.Δ. έχει εμφανίσει δερματολογικά προβλήματα (Aye και Masson, 2002). Η πιο συχνή δερματική διαταραχή είναι τα χρόνια έλκη που είναι το αποτέλεσμα ελλιπούς epύλωσης του διαβητικού δέρματος (Falanga, 2005). Τα έλκη αυτά μπορούν εύκολα να μολυνθούν και να καταλήξουν σε ακρωτηριασμό του άκρου (Ngo et al., 2005).

Επίσης συχνά εμφανίζονται και άλλες μορφές δερματικών παθήσεων, όπως για παράδειγμα λιποειδική νεκροβίωση, μελανίζουσα ακάνθωση, σκληροίδημα και δακτυλιοειδές κοκκίωμα (Jelinek, 1993). Ο γενικευμένος κνησμός, η ξηροδερμία, η καθυστερημένη epύλωση και οι δερματικές μολύνσεις αποτελούν τους κύριους παράγοντες στους διαβητικούς ασθενείς που επηρεάζουν την ποιότητα ζωής και ενδέχεται να καταλήξουν σε δερματικές παθήσεις (Mahajan et al., 2003).

Η ξηροδερμία είναι ένα από τα πρώιμα και πιο κοινά συμπτώματα δερματικής διαταραχής στους διαβητικούς ασθενείς (Pavlonic et al., 2007). Πιστεύεται ότι δρα ως ο κύριος παράγοντας στην πρόκληση ρωγμών στο δέρμα και υπερκεράτωσης και ελκών στο διαβητικό πόδι. Το 48% των ασθενών με διαβήτη τύπου 1, εμφανίζει κλινικά σημεία ιχθύασης. Επίσης η δυσλειτουργία των νεύρων του συμπαθητικού συστήματος συνεισφέρει στην ξηροδερμία, στη μειωμένη έκκριση ιδρώτα και σε διαταραχή των επιδερμικών λιπιδίων (Garrigue et al., 2011).

Η αδυναμία epύλωσης των ελκών και οι δερματικές διαταραχές αποτελούν κύρια προβλήματα των ασθενών με Σ.Δ.. Η υπεργλυκαιμία προκαλεί κυτταρικές ανωμαλίες μέσω μη ενζυματικών διαδικασιών, οξειδωτικού στρες (Stern et al., 2002), ενεργοποίησης της αναγωγής της αλδόζης και της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC). Η συσσώρευση τοξικών ουσιών στο δερματικό κολλαγόνο όπως τελικά προϊόντα προχωρημένης μη ενζυματικής γλυκοζυλίωσης (advanced glycosylation end products, AGEs) στο διαβητικό δέρμα (Sternberg et al., 1985) προκαλεί οξειδωτικό στρες, μικροαγγειακές επιπλοκές (Nakai et al., 2011), ακαμψία και λέπτυνση του δέρματος (Liao et al., 2009). Τα AGEs συνιστούν πρωτεΐνες ή λιπίδια που γλυκοζυλιώνονται μετά από έκθεση σε αυξημένη συγκέντρωση γλυκόζης και αποτελούν βασικούς παράγοντες γήρανσης. Οι υποδοχείς των AGEs αυξάνονται στα επιδερμικά κερατινοκύτταρα και οι αλληλεπιδράσεις των προϊόντων αυτών με τους υποδοχείς τους επηρεάζουν το επιδερμικό φραγμό (Kennedy και Baynes, 1984).

Αν και οι μηχανισμοί προκλήσεως των σχετιζόμενων με το Σ.Δ. δερματοπαθειών είναι σχεδόν άγνωστοι, φαίνεται ότι η παθογένεση σχετίζεται με την υπεργλυκαιμία και τη σχετική ή πλήρη ανεπάρκεια ινσουλίνης άμεσα ή μέσω βλάβης των αγγείων και του νευρικού και ανοσολογικού συστήματος.

2.6.3 Ο επιδερμικός φραγμός στο διαβητικό δέρμα

Η ινσουλίνη αποτελεί το μόριο κλειδί για την επιδερμική ομοίωση, αφού δρα ως αυξητικός παράγοντας σε καλλιέργεια κερατινοκυττάρων. Σε αυτά τα κύτταρα εκφράζονται οι υποδοχείς ινσουλίνης, έχοντας το δικό τους σύστημα πρόσληψης της ορμόνης. Γι'αυτό η ινσουλίνη έχει ιδιαίτερο ρόλο στη διαφοροποίηση των κερατινοκυττάρων, στον πολλαπλασιασμό και στη μετανάστευσή τους στην κεράτινη στιβάδα. Η έκθεση των κερατινοκυττάρων σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης αναστέλλει την έκφραση και την αυτοφωσφορύλιωση του ινσουλινόμορφου αυξητικού παράγοντα 1 (IGF-1) (Spravchikov et al., 2001).

Η κατάσταση του επιδερμικού φραγμού μπορεί να εκτιμηθεί με τη μέτρηση διαφόρων βιοφυσικών μεθόδων όπως της ενυδάτωσης, της άδηλης απώλειας νερού, των λιπιδίων του σμήγματος και του pH. Όμως στο διαβητικό δέρμα τα αποτελέσματα των ερευνών διαφέρουν στην αξιολόγηση του δερματικού φραγμού.

Πιο συγκεκριμένα, η ενυδάτωση της κεράτινης στιβάδας ρυθμίζεται κυρίως από τρεις παράγοντες: τον Φυσικό Ενυδατικό Παράγοντα (NMF), τα λιπίδια του σμήγματος και τα ενδοκυττάρια λιπίδια (κεραμίδια). Σε μελέτες σε μοντέλα μυών με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 1 έχει παρατηρηθεί μειωμένη ποσότητα νερού στην κεράτινη στιβάδα και διαταραχή στο λιπιδικό περιεχόμενο. Στη συγκέντρωση της προφίλαγγρίνης, της φιλαγγρίνης, της λορικρίνης και της κερατίνης 1,5,10 δεν παρατηρήθηκαν αλλαγές. Σε αντίστοιχες μελέτες σε ανθρώπους, η ενυδάτωση της κεράτινης στιβάδας ήταν μειωμένη και μάλιστα η διαφορά ήταν πιο έντονη σε ηλικιωμένους διαβητικούς ασθενείς (Seité et al., 2011).

Η επιδερμική άδηλη απώλεια νερού δείχνει την ποσότητα του νερού που περνάει είτε με διάχυση είτε με εξάτμιση τον επιδερμικό φραγμό. Σε μυς με σακχαρώδη διαβήτη είτε τύπου 1 είτε τύπου 2 δεν φάνηκαν σημαντικές διαφορές.

Το σμήγμα και τα ενδοκυττάρια λιπίδια διαδραματίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στη λειτουργία του επιδερμικού φραγμού και στην ενυδάτωση της κεράτινης στιβάδας (Imokawa et al., 1990). Ο σμηγματογόνος αδένας μπορεί να αλληλεπιδρά με την ινσουλίνη, και αυτή η ενέργεια φαίνεται να επηρεάζεται στο Σ.Δ., αφού σε επίμυς με διαβήτη τύπου 1 υπήρξε μειωμένη έκκριση σμήγματος αλλά και αλλαγή στη σύστασή του. Πιο συγκεκριμένα, βρέθηκαν μειωμένα τριγλυκερίδια στην κεράτινη στιβάδα με αυξημένη συχνότητα εστέρων χοληστερόλης και λιπαρών οξέων, ενώ τα κεραμίδια και η χοληστερόλη ήταν χωρίς αλλαγή (Sakai et al., 2003). Στον άνθρωπο, έχει παρατηρηθεί μείωση των λιπιδίων στην επιφάνεια του δέρματος, ανάλογα με την ανατομική περιοχή (Sakai et al., 2005).

Η ελαστικότητα του δέρματος βρέθηκε μειωμένη και στους δύο τύπους διαβήτη σε ανθρώπους (Yoon et al., 2002). Η συσσώρευση των AGEs μπορεί να ευθύνεται για

αυτό το φαινόμενο αλλά δεν υπάρχει ακόμα κάποια τεκμηριωμένη μελέτη (Seirafi et al., 2009).

2.6.4 Ινσουλίνη και Δέρμα

Η ινσουλίνη και ο IGF εμφανίζουν σημαντική δράση στη φυσιολογική λειτουργία του δέρματος. Οι δύο αυτοί παράγοντες προωθούν τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των κερατινοκυττάρων της επιδερμίδας. Παρόλο που η ινσουλίνη θεωρείται πως έχει την κύρια μεταβολική δράση στο δέρμα, οι πληροφορίες για τη δράση της είναι αρκετά ελλιπείς. Η ινσουλίνη και ο IGF-1 ρυθμίζουν τη μεταφορά της γλυκόζης σε μεγάλο αριθμό ιστών. Το γεγονός ότι στους διαβητικούς ασθενείς παρατηρείται μεγάλος αριθμός βλαβών στο δέρμα, υποδεικνύει ότι μπορεί να υπάρχει ελάττωση του σήματος της ινσουλίνης ή απορρύθμιση του μεταβολισμού της γλυκόζης. Οι αντίστοιχοι υποδοχείς τους (υποδοχείς της ινσουλίνης και του IGF (IGF-R)) εκφράζονται στα κερατινοκύτταρα και ανήκουν στους υποδοχείς με δράση κινάσης τυροσίνης (Receptor Tyrosine Kinases, RTKs). Και οι δύο υποδοχείς εκφράζονται σε πολλά κύτταρα, όπου η κύρια δράση τους μπορεί να μην είναι η μεταφορά της γλυκόζης αλλά να παραμένει άγνωστη. Στην επιδερμίδα, κατά τη διαφοροποίηση των κερατινοκυττάρων φαίνεται να αυξάνεται η σύνδεση της ινσουλίνης στους υποδοχείς της καθώς και η αυτοφωσφορυλίωση του υποδοχέα της ενώ επίσης φαίνεται να μειώνεται η σύνδεση του IGF-1 στους αντίστοιχους υποδοχείς. Στα διαφοροποιημένα κύτταρα η σύνδεση αυτή μειώθηκε και στις 2 κατηγορίες υποδοχέων. Συμπερασματικά, η ινσουλίνη διευκολύνει την επαγωγή διαφοροποιητικών παραγόντων του δέρματος όπως της κερατίνης 1 και κερατίνης 10, ενώ ταυτόχρονα φαίνεται ότι ο IGF-1 αναστέλλει αυτή τη διαδικασία προωθώντας τα γεγονότα της μίτωσης (Wertheimer et al., 2000).

2.6.5 Διαβητικό Πόδι

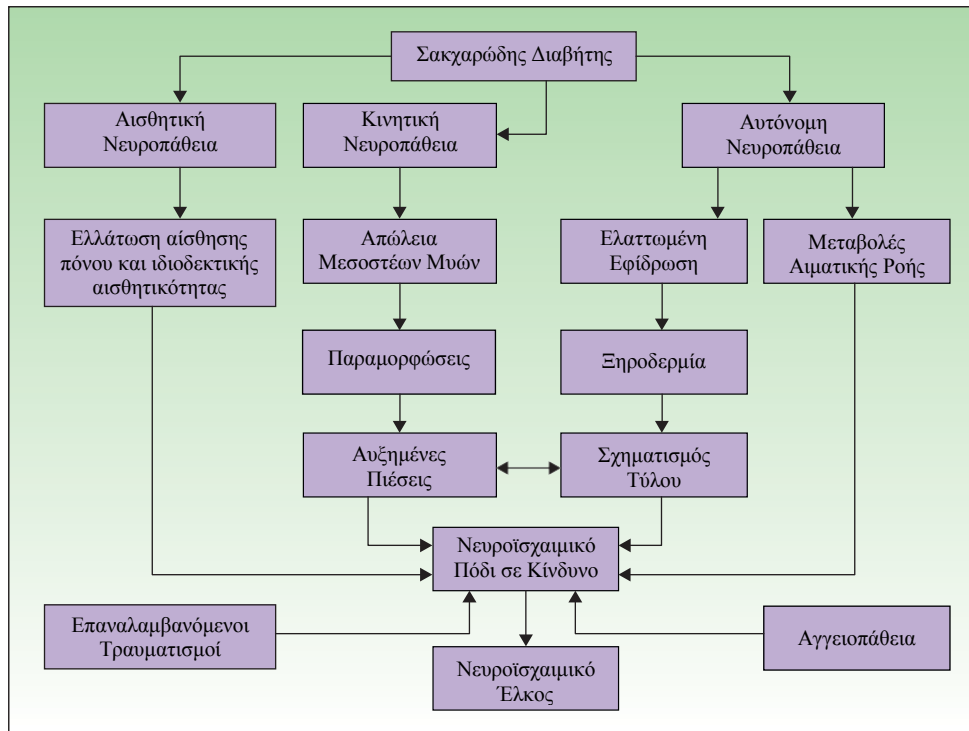
Το έλκος του διαβητικού άκρου ποδός αποτελεί ένα από πιο κοινά χρόνια τραύματα που επηρεάζει ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη (Gardner et al., 2007). Υπολογίζεται ότι 15% των διαβητικών αναπτύσσουν έλκος στο κάτω άκρο (Petrakis et al., 2017). Σύμφωνα με τα στοιχεία της Διεθνούς Ομοσπονδίας Διαβήτη (International Diabetes Federation, IDF) τα ποσοστά εκδήλωσης της ασθένειας αναμένεται να διπλασιαστούν την επόμενη τριακονταετία (IDF, 2017). Οι διαβητικοί ασθενείς είναι πιο επιρρεπείς στο να αναπτύξουν έλκη στα πόδια τα οποία οφείλονται σε πληθώρα παραγόντων, συμπεριλαμβανομένων της νευροπάθειας, της αγγειακής νόσου και των μηχανικών τραυμάτων (Jude και Boulton, 1999; Jeffcoate και Harding, 2003). Ο επιπολασμός είναι μικρότερος στους νεότερους ασθενείς (1,7-33,3%) είτε με διαβήτη τύπου 1 είτε με τύπου 2 αλλά υψηλότερος στις μεγάλες ηλικίες (5-10%) κυρίως με διαβήτη τύπου 2 (Reiber και Ledoux, 2002). Καταστάσεις που συνδέονται με τη χρονιότητα των διαβητικών ελκών στα πόδια είναι η λοίμωξη του τραύματος και η οστεομυελίτιδα, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε ακρωτηριασμό (Jeffcoate και

Harding, 2003; Ramsey et al., 1999; Adler et al., 1999). Αποτελεί την κύρια αιτία ακρωτηριασμού των κάτω άκρων με ποσοστό ανώτερο του 80% (Boulton et al., 2004). Σημειωτέον δε, το 11% των ασθενών με διαβητικό πόδι καταλήγει σε ακρωτηριασμό (Pettrakis et al., 2017).

Το έλκος του διαβητικού ποδιού μπορεί να είναι επώδυνο και να περιορίσει τις καθημερινές και κοινωνικές δραστηριότητες, οδηγώντας σε υποβάθμιση της ποιότητας ζωής (Snyder και Hanft, 2009). Αυτό αποδεικνύεται και από την μελέτη των Goodridge et al., (2006) όπου τα μη επουλώσιμα έλκη στα πόδια μείωσαν παραμέτρους που σχετίζονται με τη συνολική σωματική υγεία, την ποιότητα ζωής, την κοινωνική ζωή και τις καθημερινές δραστηριότητες.

Επιπλέον, το κόστος της υγειονομικής περίθαλψης για την αντιμετώπιση των ασθενών με διαβητικά έλκη είναι αρκετά μεγάλο. Οι Ramsey et al. υπολόγισαν ότι οι πάσχοντες από διαβητικό πόδι χρησιμοποιούσαν περισσότερο τις υγειονομικές δομές στην Αμερική. Το ποσοστό των ασθενών που παρουσίασαν οστεομυελίτιδα ήταν 15% και το 15,6% χρειάστηκε ακρωτηριασμό του κάτω άκρου. Το κόστος για ένα περιστατικό έλκους διαβητικού ποδιού υπολογίστηκε σε 28.000\$ για περίοδο 2 ετών (Ramsey et al., 1999). Το κόστος όμως είναι πολύ μεγαλύτερο αν συνυπολογιστεί η απώλεια της παραγωγικότητας και το κόστος ζωής των ασθενών (Assal et al., 2002).

Το πάσχον διαβητικό πόδι μπορεί να διακριθεί σε νευροπαθητικό και νευροϊσχαιμικό, γιατί τις περισσότερες φορές η ελαττωμένη παροχή αίματος που το χαρακτηρίζει, συνοδεύεται από σημαντικό βαθμό νευροπάθειας (Καζάκος, 1995). Το νευροπαθητικό πόδι χαρακτηρίζεται από μειωμένη αιματική ροή, έλκος οπουδήποτε στο πόδι, ενίοτε πόνο, υπερκεράτωση και απουσία σφύξεων ενώ το νευροϊσχαιμικό χαρακτηρίζεται από αυξημένη αιματική ροή, έλκος στα σημεία πύεσως, ελάχιστο πόνο, υπερκεράτωση, τύλους και φυσιολογικές σφύξεις (Καζάκος, 1995). Παρόλο που τις περισσότερες φορές η διάκριση είναι ευχερής, συχνή είναι η συνύπαρξη και των δύο τύπων (Καζάκος, 1995). Συνοπτικά η παθοφυσιολογία του διαβητικού ποδιού φαίνεται στο επόμενο σχήμα:



Εικόνα: παθοφυσιολογία του μηχανισμού πρόκλησης έλκους στο διαβητικό πόδι (Boada, 2012)

Οι βασικοί παράγοντες πρόκλησης διαβητικού ποδιού όπως αναφέρθηκε είναι η περιφερική νευροπάθεια, η ισχαιμία και οι μολύνσεις (Caputo et al., 1994) σε συνδυασμό με τα μηχανικά τραύματα. Η περιφερική νευροπάθεια έχει κεντρικό ρόλο και είναι παρούσα σε περισσότερο από το 80% των ασθενών με διαβητικό πόδι (Pecoraro et al., 1990). Συχνά, η εξέλκωση είναι το αποτέλεσμα της απώλειας της προστατευτικής αισθητικότητας επιτρέποντας σε πολλαπλούς μικροτραυματισμούς να περάσουν απαρατήρητοι έως ότου προκληθεί μόλυνση (Boulton et al., 1986; Sosenko et al., 1990). Ωστόσο, ο πιο κοινός μηχανισμός φαίνεται να είναι η υπερβολική και επαναλαμβανόμενη πίεση στις πελματιαίες οστεώδεις προεξοχές, όπως η κεφαλή του μεταταρσίου (Brand, 1988). Η ισχαιμία είναι ο άλλος σημαντικός παράγοντας που συμβάλλει στην πάθηση. Η περιφερειακή αγγειακή νόσος έχει υψηλή συχνότητα εμφάνισης σε διαβητικούς ασθενείς και φαίνεται να είναι ένας παθογόνος παράγοντας στο 60% των διαβητικών ασθενών με μη επουλώσιμα έλκη και στο 46 % εκείνων που έχουν υποστεί σημαντικές ακρωτηριάσεις (Pomposelli et al., 1990). Η ισχαιμία αποδυναμώνει τις τοπικές άμυνες ενάντια στη μόλυνση, λόγω της μειωμένης προσφοράς οξυγόνου, απαραίτητων θρεπτικών συστατικών και αυξητικών παραγόντων. Η λοίμωξη είναι μια συχνή επιπλοκή που προκαλείται από την νευροπάθεια και την ισχαιμία. Η σοβαρότητά της μπορεί να κυμαίνεται από μια ήπια, εντοπισμένη λοίμωξη σε ένα άκρο έως νέκρωση του ιστού (Mathieu et al., 2006).

Οι κανονιστικές οδηγίες διαχείρισης για την επούλωση του διαβητικού ποδιού περιλαμβάνουν τη μέτρηση της πληγής, τη βελτίωση της γλυκαιμικής κατάστασης, τον χειρουργικό καθαρισμό του υπερκερατικού ιστού, της μολυσμένης περιοχής, τον

έλεγχο των λοιμώξεων, τη μηχανική αποφόρτιση και τη χρήση επιδέσμων ώστε να διατηρηθεί η υγρή επούλωση (Bakker et al., 2016; Brem et al., 2003; Snyder και Hanft, 2009; Steed et al., 2006). Επιπλέον υπάρχει αρκετά μεγάλος αριθμός θεραπευτικών επιλογών για τη βελτίωση της επούλωσης στο διαβητικό πόδι (Dumville et al., 2012). Παρόλα αυτά, τα ποσοστά θεραπείας του διαβητικού ποδιού παραμένουν χαμηλά (Snyder και Hanft, 2009) και απαιτείται περαιτέρω έρευνα για την αντιμετώπιση του προβλήματος αυτού (Rathur και Boulton, 2007).

2.6.6 Πειραματική πρόκληση Σ.Δ. σε μυς με ένεση στρεπτοζοτοκίνης (STZ)

Η STZ ανακαλύφθηκε ως προϊόν ζύμωσης του *Streptomyces achromogenes*, που διαθέτει δράση αντιβιοτικού ευρέως φάσματος καθώς και αντικαρκινική δράση. Όταν η ουσία αυτή χρησιμοποιήθηκε ως αντικαρκινικός παράγων, βρέθηκε ότι η ένεσή της προκαλεί υπεργλυκαιμία και χαμηλά επίπεδα ινσουλίνης γιατί καταστρέφει εκλεκτικά τα β-κύτταρα του παγκρέατος (Szkudelski, 2001).

Η τοξική δράση της STZ στα β-κύτταρα του παγκρέατος συνοδεύεται από χαρακτηριστικές αλλαγές των επιπέδων γλυκόζης και ινσουλίνης στο αίμα. Η απόκριση αυτή είναι τριφασική. Δύο ώρες μετά από ένεσή της, παρατηρείται υπεργλυκαιμία και ελάττωση της ινσουλίνης του πλάσματος. Αυτή η πρώτη φάση της απόκρισης οφείλεται, πιθανώς, στην άμεση αναστολή της έκκρισης ινσουλίνης από την STZ. Περίπου έξι ώρες αργότερα παρατηρείται υπογλυκαιμία με υψηλά επίπεδα ινσουλίνης στο πλάσμα, που θα μπορούσε να οφείλεται στην απελευθέρωση ινσουλίνης από τα κοκκία των β-κυττάρων κατά την καταστροφή τους. Τέλος, εγκαθίσταται μια μόνιμη υπεργλυκαιμία και τα επίπεδα ινσουλίνης στο πλάσμα ελαττώνονται. Αυτό οφείλεται στην μόνιμη πλέον καταστροφή των β-κυττάρων (Bedoya et al., 1996; West et al., 1996).

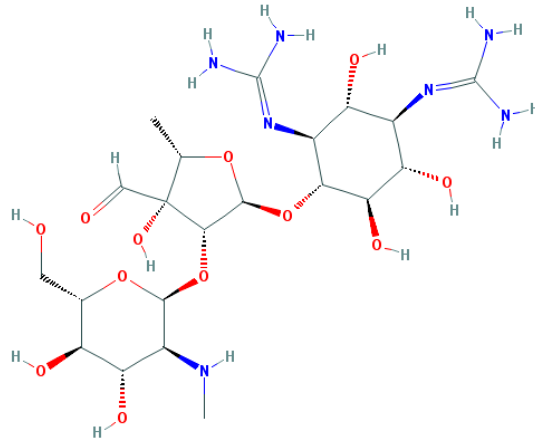
2.6.6.1 Μηχανισμός Δράσης STZ

Η STZ συσσωρεύεται στα παγκρεατικά β-κύτταρα μέσω των μεταφορέων γλυκόζης GLUT2 και προκαλεί την καταστροφή τους μέσω παραγωγής ελευθέρων ριζών οξυγόνου και οξειδωτικών μηχανισμών. Ακόμη, λόγω της αλκυλιωτικής της ικανότητας, αλκυλιώνει και κατακερματίζει το DNA, τροποποιεί τα βιολογικά μακρομόρια και τελικά καταστρέφει τα β-κύτταρα, προκαλώντας τελικά ινσουλινοεξαρτώμενο διαβήτη (Chatzigeorgiou et al., 2009).

2.6.6.2 Τρόπος χορήγησης STZ

- Εφάπαξ ενδοπεριτοναϊκή ένεση STZ (200 mg/kg) προκαλεί άμεση καταστροφή των β-κυττάρων του μυός ενώ καταγράφονται επίπεδα γλυκόζης >500 mg/dL εντός 48 h (Furman, 2015).
- Ενδοπεριτοναϊκή ένεση STZ (40 mg/kg) επί 5 συνεχόμενες ημέρες προκαλεί μερική καταστροφή των β-κυττάρων του μυός η οποία οδηγεί σε ετεροχρονισμένη επέλευση σακχαρώδους διαβήτη τύπου 1 (Furman, 2015).

Τέλος, πρέπει να σημειωθεί ότι η STZ είναι ασταθής σε διάλυμα, ακόμα και σε όξινο pH, και πρέπει να ενεθεί αμέσως μετά από αραιώσή της σε ρυθμιστικό διάλυμα κιντρικών pH 5,0 (Furman, 2015).



Εικόνα: χημικός τύπος STZ (Pubchem ncbi.nlm.nih.gov., 2018a)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

3. Τοπικά χορηγούμενοι φαρμακευτικοί παράγοντες για την επουλωτική διαδικασία

3.1 Εισαγωγή

Πληθώρα τοπικών παραγόντων χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία ελκών με σημαντικά δεδομένα τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*. Η επουλωτική διαδικασία περιλαμβάνει τη συμμετοχή πολλών ειδών κυττάρων όπως κερατινοκύτταρα, ινοβλάστες, μελανινοκύτταρα, λεμφοκύτταρα αλλά και άλλους κυτταρικούς πληθυσμούς οι οποίοι είναι ιδιαίτερα ευαίσθητοι στην επίδραση τοπικά εφαρμοζόμενων ουσιών. Σε πολλές περιπτώσεις, οι επιβλαβείς επιδράσεις των τοπικών σκευασμάτων στην επούλωση των ελκών, υπερτερούν της θεραπευτικής τους δράσης. Επιπλέον, ένα τραύμα χαρακτηρίζεται από διαταραγμένο επιδερμικό φραγμό γεγονός που το καθιστά ευαίσθητο στην εφαρμογή παραγόντων που θεωρούνται αβλαβείς για το φυσιολογικό δέρμα. Η σωστή διαχείριση της κατάστασης αυτής όμως δίνει τη δυνατότητα διεύθυνσης σε παράγοντες με ευεργετικές επιδράσεις (Cross, 2007).

3.2 Αντιμικροβιακοί παράγοντες

Οι αντιμικροβιακοί παράγοντες που χρησιμοποιούνται στην περιποίηση των ελκών μπορούν γενικά να χωριστούν σε αντιβιοτικά, αντισηπτικά και απολυμαντικά. Καθώς τα απολυμαντικά δε χρησιμοποιούνται σε ζωντανό ιστό και συνεπώς δεν εφαρμόζονται στους ανθρώπους, θα αναφερθούν μόνο τα αντιβιοτικά και τα αντισηπτικά. Ενώ τα αντιβιοτικά χορηγούνται εντερικά ή παρεντερικά στους ασθενείς και μπορούν να μεταφερθούν μέσω του αίματος ή του λεμφικού συστήματος σε άλλα μέρη του σώματος, τα αντισηπτικά (και μερικά αντιβιοτικά όταν εφαρμόζονται τοπικά) περιορίζονται στην τοπική χρήση. Ιδανικά, τα αντιμικροβιακά παρασκευάσματα που προορίζονται για την περιποίηση των πληγών πρέπει να διαθέτουν ένα ευρύ φάσμα αντιμικροβιακής δράσης, να είναι ταχέως δραστικά και σταθερά, χωρίς να προάγουν ανθεκτικά βακτηριακά στελέχη. Επιπλέον, αυτοί οι παράγοντες θα πρέπει να χαρακτηρίζονται από μηδαμινή κυτταροτοξικότητα για τον ιστό του ξενιστή, να μην προκαλούν ανεπιθύμητες ενέργειες, να μην είναι μεταλλαξιογόνες/καρκινογόνες και να μην παρατείνουν την επούλωση. Οι μεταλλαξιογόνοι και καρκινογόνοι παράγοντες δεν έχουν θέση στην φροντίδα του τραύματος, αλλά η εξισορρόπηση της αντιμικροβιακής αποτελεσματικότητας έναντι της κυτταροτοξικότητας είναι δύσκολη (Gottrup et al., 2014).

3.2.1 Αντισηπτικοί παράγοντες

Μια διαδεδομένη άποψη είναι ότι τα αντισηπτικά μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να καθαρίσουν και να προστατεύσουν τους ιστούς ενός τραύματος έναντι της βακτηριακής λοίμωξης (Cross, 2007). Τα αντισηπτικά διαλύματα (υδραργυρικά, τεταρτοταγείς ενώσεις αμμωνίου, ιώδιο και ιωδιούχα, αλκοόλες, χλωρεξιδίνη και υπεροξειδίο του υδρογόνου) είναι χημικές ενώσεις που προορίζονται για την εφαρμογή σε ανέπαφο δέρμα (Smith, 2005). Έχει αποδειχθεί ότι τα αντισηπτικά έχουν βλαπτικές επιδράσεις σε λευκοκύτταρα, ινοβλάστες, στην επιθηλιοποίηση και στην εναπόθεση κολλαγόνου, επομένως και στην επουλωτική διαδικασία (Tatnall et al., 1990; Brown και Zitelli, 1993). Η σύγκριση της τοξικότητας των αντισηπτικών έναντι των ινοβλαστών και των κερατινοκυττάρων *in vitro* έχει προταθεί σαν κατευθυντήρια γραμμή για τη χρήση τους (Wilson et al., 2005). Η διαμάχη για την ασφάλεια των αντισηπτικών συνεχίζεται λόγω έλλειψης επαρκών κλινικών μελετών (Smith, 2005).

Antiseptic	Product formulation	Action	Local toxicity	Systemic toxicity
PVD-I	Scrub, 10% solution, 1–0.001% cream, 5% polyethylene glycol-based ointment, 10%	Detergent, cleansing agent, bactericidal	Leukocytes, fibroblasts, keratinocytes, epithelialization, collagen maturation, granulation formation	Potential for free iodine absorption and thyroid disease with continued or large-scale use
Sodium hypochlorite (Dakin's solution)	Solution, 0.025% solution, 0.005% solution,	Bactericidal	Leukocytes, fibroblasts, endothelial cells, keratinocytes	None reported
Acetic acid	solution, 0.25%	Limited bactericidal	Fibroblasts, keratinocytes, Cytotoxicity surpasses bactericidal effects	None reported
Hydrogen peroxide	Solution, 3%	Effervescent cleanser, limited bactericidal	Fibroblasts, red blood cells, cytotoxicity surpasses bactericidal effects	None reported
Chlorhexidine	Scrub, 0.1% solution, 4–0.05% cream, 0.15–0.3% dressing, 0.5%	Detergent, cleansing agent, bactericidal	Fibroblasts, keratinocytes, prolonged use may cause contact dermatitis	None reported

Πίνακας: ευρέως χρησιμοποιούμενα αντισηπτικά στη θεραπευτική (Cross, 2007)

3.2.2 Αντιβιοτικοί παράγοντες

Τα τοπικά αντιβιοτικά χορηγούνται συχνότερα κατά τη θεραπεία εγκαυμάτων, δίχως η χρήση τους σε άλλους τύπους πληγών να αντενδείκνυται (Cross, 2007). Η τοπική οδός εφαρμογής έχει ως πλεονέκτημα την ελαχιστοποίηση της συστηματικής απορρόφησης που οδηγεί σε παρενέργειες, την επίτευξη υψηλών συγκεντρώσεων του φαρμάκου τοπικά στο έλκος και τη μειωμένη ανάπτυξη αντίστασης των βακτηρίων (Lio και Kaye, 2004).

Μια σύνοψη των αντιμικροβιακών παραγόντων που χρησιμοποιούνται τοπικά, όπως και οι δυνητικά επιβλαβείς ιδιότητές τους που θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη

κατά την εφαρμογή αυτών σε ανοιχτές πληγές, παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα:

Anti-infective agent	Property						
	Sensitivity reactions	Painful upon application	Inactivated by local substances	Possible side effects	Toxic to local cell populations	Resistance possible	Poorly absorbed
Bacitracin ^a	×	×	×	–	–	×	√
Gentamicin ^b	√	×	–	√	×	√	×
Mafenide solution ^c	√	√	×	√	√	–	×
Mupirocin ^d	×	×	×	–	×	√	√
Nystatin ^e	×	–	–	–	–	√	–
Neomycin ^f	√	–	–	√	√	√	×
Nitrofurazone ^g	–	√	–	–	√	√	–
Neosporin ^h	See individual components						
Polymyxin B sulfate ⁱ	×	–	–	–	√	×	√
Polysporin ^l	See individual components						
Silver nitrate ^k	×	×	–	√	–	×	√
Silver sulfadiazine ^l	√	×	×	√	√	×	√

Πίνακας: αντιβιοτικοί παράγοντες και ιδιότητες αυτών (Cross, 2007)

3.3 Αιμοστατικοί παράγοντες

Ένα από τα ευρέως χρησιμοποιούμενα αιμοστατικά είναι το διάλυμα υποθειώδους σιδήρου ή διάλυμα Monsel. Με το διάλυμα αυτό επιτυγχάνεται αιμόσταση τοπικά, μέσω μετουσίωσης των πρωτεϊνών του πλάσματος η οποία ακολουθείται από αγγειακή θρόμβωση. Με παρόμοιο τρόπο δρουν και άλλοι τέτοιου είδους παράγοντες, όπως διαλύματα χλωριούχου αργιλίου (Larson, 1988). Το διάλυμα Monsel έχει αποδειχθεί ότι έχει μακροχρόνια κυτταροτοξική δράση, καθυστερεί την επούλωση και προκαλεί αισθητά μεγαλύτερες ουλές στα έλκη (Amazon et al., 1980; Epstein, 1986). Ως αιμοστατικοί παράγοντες χρησιμοποιούνται επίσης σκευάσματα περιέχοντα ζελατίνη, κολλαγόνο, ινώδες και θρομβίνη και εφαρμόζονται μέσω επιδέσμων στο τραύμα (Tomizawa, 2005).

3.4 Αυξητικοί παράγοντες

Η τοπική χορήγηση αυξητικών παραγόντων για τη διέγερση των κυττάρων που εμπλέκονται στην επούλωση των ελκών, έχει εδώ και χρόνια προταθεί σαν ελκυστική θεραπευτική προσέγγιση. Οι αυξητικοί παράγοντες προερχόμενοι από τα αιμοπετάλια (PDGF) απελευθερώνονται από ενεργοποιημένα αιμοπετάλια ώστε να διεγείρουν τη μετάβαση κυττάρων φλεγμονής στην περιοχή του τραύματος, προάγοντας την αγγειογένεση και τον σχηματισμό κοκκιοματώδους ιστού (Cross, 2007).

Η θεραπεία των ελκών του διαβητικού ποδιού βελτιώνεται με την τοπική εφαρμογή των PDGF και κατάλληλη φροντίδα (Steed, 2006), ενώ η χρήση

αυτόλογων αιμοπεταλίων από τον ασθενή δεν έδειξε καμία βελτίωση όταν εφαρμόζεται σε φλεβικά έλκη των κάτω άκρων (Stacey et al., 2000).

3.5 Ένζυμα

Η εφαρμογή ενζύμων τοπικά ενδείκνυται για την απομάκρυνση του νεκρωτικού ή του κίτρινου ινώδους ιστού που καλύπτει τον πυθμένα του έλκους (debridement) (Ayello et al., 2004). Κάποια ένζυμα δρουν εκλεκτικά λύοντας μόνο τον νεκρωτικό ιστό σε αντίθεση με άλλα τα οποία πλήττουν εξίσου και το υγιές δέρμα ενώ η χρήση τους δεν προτιμάται όταν ο σχηματισμός του νεκρωτικού ιστού βρίσκεται σε προχωρημένο στάδιο (Falanga et al., 2008).

Ένζυμα τα οποία έχουν χρησιμοποιηθεί για τον καθαρισμό του νεκρωτικού ιστού είναι η θρυψίνη, ο συνδυασμός στρεπτοκινάσης-στρεπτοδορνάσης και η σουμπτιλίσίνη (Enoch και Harding, 2003). Επίσης η χρήση της βρωμελαΐνης βρίσκεται υπό μελέτη (McCallon et al., 2014). Τα πλέον κοινώς χρησιμοποιούμενα ένζυμα είναι ο συνδυασμός παπαΐνης-ουρίας με τη μορφή κρέμας και η κολλαγενάση με τη μορφή αλοιφής (Enoch και Harding, 2003).

3.5.1 Παπαΐνη - Ουρία

Η παπαΐνη είναι μια πρωτεάση κυστεΐνης που βρίσκεται στον γαλακτώδη οπό των άγουρων καρπών του φυτού *Carica papaya* και παρουσιάζει ικανότητα λύσεως του νεκρωτικού ιστού των τραυμάτων (Wright και Shi, 2003). Η ουρία διευκολύνει την πρωτεολυτική δράση της παπαΐνης μεταβάλλοντας τη δομή των πρωτεϊνών της περιοχής (Ayello et al., 2004). Η παπαΐνη αποδομεί πρωτεΐνες με κατάλοιπα κυστεΐνης χωρίς να έχει εκλεκτική δράση. Παρασκευάσματα περιέχοντα παπαΐνη και ουρία εφαρμόζονται εδώ και δεκαετίες στην κλινική πράξη ιδιαίτερα στην αντιμετώπιση ελκών εκ πίεσεως (Falanga, 2002).

3.5.2 Κολλαγενάση

Η κολλαγενάση αποτελεί εκλεκτικό πρωτεολυτικό παράγοντα και απομονώνεται από τη ζύμωση των βακτηρίων *Clostridium histolyticum* (Ramundo και Gray, 2009). Η εκλεκτική αυτή δράση εκδηλώνεται μέσω της αποδόμησης του κολλαγόνου της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας (Extracellular Matrix, ECM) προωθώντας έτσι τα γεγονότα της επούλωσης. Παρόλο που η έντονη έκφραση των μεταλλοπρωτεϊνών της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας (MMPs) αποτελεί κοινό χαρακτηριστικό των χρονίων ελκών, η προσθήκη μιας MMP βακτηριακής προέλευσης βελτιώνει την κατάσταση της πληγής λόγω του debridement που επιτυγχάνει καταδεικνύοντας έτσι την εξειδικευμένη δράση της κολλαγενάσης (Jovanovic et al., 2012; Santyl, 2012). Ακόμη, η χρήση του ενζύμου χαρακτηρίζεται ως ασφαλής για εφαρμογή σε έλκη με υψηλό βακτηριακό φορτίο (Payne et al., 2008).

Η αλοιφή Santyl αποτελεί το μοναδικό παρασκεύασμα περιέχον κολλαγενάση το οποίο έχει λάβει έγκριση από τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων Η.Π.Α. (Food and Drug Administration, FDA) για τη θεραπεία δερματικών ελκών και εγκαυμάτων (Milne et al., 2010; Demidova-Rice et al., 2012; Santyl, 2012).

Για την αντιμετώπιση ελκών διαβητικού άκρου ποδός, η θεραπεία με κολλαγενάση είναι πιο αποτελεσματική όταν προηγηθεί χειρουργικός καθαρισμός τουλάχιστον πριν την πρώτη εφαρμογή ενώ είναι εξαιρετικά αποτελεσματική όταν ο χειρουργικός καθαρισμός επαναλαμβάνεται σε εβδομαδιαία βάση (Lantis και Gordon, 2017).

3.6 Μέθοδοι Debridement

Στον πίνακα που ακολουθεί αναφέρονται, εκτός από τα ένζυμα, οι πιο κοινές μέθοδοι καθαρισμού του νεκρωτικού ιστού ενός έλκους που μπορεί να εφαρμοστούν συνδυαστικά ή κατά μόνας (McCallon et al., 2014).

Μέθοδος	Περιγραφή
Ενζυματική	Χρήση ενζύμων για την αποδόμηση των συστατικών της ECM
Χειρουργική	Απομάκρυνση του νεκρωτικού ιστού με χειρουργικά εργαλεία
Αυτολυτική (υγρογέλες, υδροκολλοειδή)	Χρήση των ενδογενών ενζύμων για λύση του νεκρωτικού ιστού με τη διατήρηση υγρής της επιφάνειας του έλκους
Βιολογική	Εφαρμογή αποστειρωμένων προνυμφών στην περιοχή του έλκους
Μηχανική (wet-to-dry επιθέματα, υπέρηχοι, υδροθεραπεία)	Χρήση επιθέματων ή συσκευών για την απομάκρυνση του νεκρωτικού ιστού με άσκηση μηχανικών δυνάμεων

Πίνακας: μέθοδοι debridement (McCallon et al., 2014)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

4. Καθαρισμός νεκρωτικού ιστού με τη χρήση προνυμφών

4.1 Εισαγωγή

Από τις αρχές της δεκαετίας του 1990, επανήλθε στη θεραπευτική η μέθοδος εφαρμογής των προνυμφών (larvae, maggots) της μύιας *Lucilia (Phaenicia) sericata* (Diptera: Calliphoridae) απευθείας σε πληγές για την αφαίρεση του νεκρωτικού ιστού (Maggot Debridement Therapy, MDT), την καταπολέμηση σε πολλές περιπτώσεις των μολύνσεων αλλά και τη διέγερση της επουλωτικής δραστηριότητας. Σε σχέση με τον χειρουργικό καθαρισμό, οι προνύμφες δρουν μικροχειρουργικά χωρίς να θίγουν τον υγιή ιστό οδηγώντας σε σημαντική μείωση του χρόνου επούλωσης (Grassberger et al., 2013).

Η μέθοδος αυτή έχει βοηθήσει σημαντικά στη μείωση των ακρωτηριασμών ιδιαίτερα σε διαβητικά έλκη άκρου ποδός (Tian et al., 2013). Ακόμη, οι προνύμφες της *L. sericata* μπορούν να προκαλέσουν λύση των σχηματιζόμενων βιοϋμενίων (biofilms) συμβάλλοντας στην καταπολέμηση ανθεκτικών βακτηριακών στελεχών (Sherman, 2014).

4.2 Ιστορική Αναδρομή

Η χρήση προνυμφών διαφόρων εντόμων συναντάται ήδη στη λαϊκή θεραπευτική πολλών λαών της αρχαιότητας σε φυλές όπως οι Αβορίγινες της Νέας Νότιας Ουαλίας, οι ιθαγενείς φυλές της Μιανμάρ και η φυλή των Μάγια στην Κεντρική Αμερική. Σύμφωνα με ανθρωπολογικές μελέτες, οι θεραπευτές των Μάγια χρησιμοποιούσαν επιθέματα εμποτισμένα με αίμα βοός τα οποία άφηναν στον ήλιο έως ότου εποικιστούν από προνύμφες προτού τα εφαρμόσουν για την αντιμετώπιση δερματικών βλαβών (Whitaker et al., 2007).

Στον Δυτικό Κόσμο η ευεργετική επίδραση των προνυμφών στην επούλωση πληγών παρατηρείται για πρώτη φορά από τον Γάλλο χειρουργό Ambroise Paré (1510-1590) (Whitaker et al., 2007). Τρεις περίπου αιώνες αργότερα, ο Αμερικανός χειρουργός Forney Zacharias (1837-1901) καταγράφει για πρώτη φορά επίσημα τη χρήση τους, κατά τη διάρκεια του Αμερικανικού Εμφυλίου Πολέμου (Fleischmann et al., 2004). Στη διάδοση της μεθόδου συνέβαλε καθοριστικά ο Αμερικανός ορθοπαιδικός William S. Baer (1872 - 1931), ο οποίος πρώτος εντόπισε την αναγκαιότητα αποστείρωσής τους (Baer, 1931). Έτσι, κατά τη δεκαετία του 1930 η χρήση προνυμφών για την επούλωση ελκών υιοθετήθηκε σε περισσότερα από 300 νοσηλευτικά ιδρύματα των Η.Π.Α., ενώ ταυτόχρονα δημοσιεύθηκε πλήθος σχετικών άρθρων σε επιστημονικά περιοδικά. Ωστόσο, μετά την “έκρηξη” των σουλφοναμιδών και της πενικιλίνης, αλλά και την άφιξη πληθώρας νέων αντισηπτικών φαρμάκων, το ενδιαφέρον για τη θεραπευτική χρήση προνυμφών

ατόνησε, για να επανέλθει στο προσκήνιο από τους Sherman και Pechter στις αρχές της δεκαετίας του 1990 (Whitaker et al., 2007).

Ορόσημα στην Ιστορία του MDT
<ul style="list-style-type: none">• Ο Γάλλος χειρουργός Ambroise Paré (1510-1590) παρατηρεί την ευεργετική επίδραση των προνυμφών.
<ul style="list-style-type: none">• Ο Αμερικανός χειρουργός Forney Zacharias (1837-1901) καταγράφει επίσημα τη χρήση τους, κατά τη διάρκεια του Αμερικανικού Εμφυλίου Πολέμου.
<ul style="list-style-type: none">• Το 1929, ο William S. Baer αναφέρει την αντιμετώπιση οστεομυελίτιδας με τη χρήση προνυμφών, βασιζόμενος σε δικές του παρατηρήσεις κατά τη διάρκεια του Α' Παγκοσμίου Πολέμου.
<ul style="list-style-type: none">• Οι Ronald Sherman και Edward Pechter φέρνουν ξανά στο προσκήνιο και ενθαρρύνουν τη χρήση προνυμφών στις ΗΠΑ κατά τη δεκαετία του 1990.

Πίνακας: ορόσημα στην ιστορία του MDT (Whitaker et al., 2007)

4.3 Η Βιολογία της Μυΐας *Lucilia sericata*

Η μυΐα *Lucilia (Phaenicia) sericata*, οικογένεια Caliphoridae, τάξη Diptera πειγράφηκε για πρώτη φορά από τον Meigen το 1826 ως ένα έντομο με στενή οικολογικά συσχέτιση με τον άνθρωπο. Συναντάται σε θερμά και τροπικά κλίματα ενώ είναι ιδιαιτέρως κοινή σε περιάκτιες περιοχές (Grassberger et al., 2013). Αποτελεί μη αυτογενές προαιρετικό εξωπαράσιτο προβάτων (sheep blow fly), με σημαντικές συνέπειες στην κτηνοτροφία (Nigam et al., 2010).

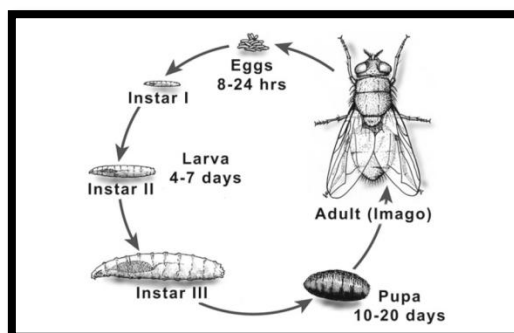
Πολλά είδη διπτέρων (αληθείς μύγες) αρέσκονται στην παρασίτωση σε ζώντες ιστούς σπονδυλωτών, μια κατάσταση που ονομάζεται μυΐαση. Μυΐες που προκαλούν μυΐαση ανήκουν στις οικογένειες Oestridae, Sarcophagidae και Calliphoridae και διακρίνονται σε υποχρεωτικά και προαιρετικά παράσιτα (Nigam et al., 2010). Τα υποχρεωτικά παράσιτα απαιτούν κατανάλωση ζώντος ιστού προκειμένου να ολοκληρώσουν τον κύκλο ζωής τους προκαλώντας έτσι σοβαρή βλάβη σε υγιείς ιστούς. Τα προαιρετικά παράσιτα, αντιθέτως, παρασιτούν σε ζώντες οργανισμούς μόνο όταν οι συνθήκες είναι ευνοϊκές και συνήθως αναπτύσσονται σε νεκρωτικό ιστό (Erzinclioğlu, 1996). Μόνον ένας πολύ μικρός αριθμός από τα περίπου 80.000 είδη μυϊών που προκαλούν μυΐαση μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη θεραπευτική (Whitaker et al., 2007). Σε αυτά ανήκουν οι προνύμφες της *L. sericata* οι οποίες ως προαιρετικά παράσιτα δεν καταναλώνουν υγιή ιστό (Weil et al., 1933). Η παρασίτωση σε υγιή άτομα από προνύμφες της *L. sericata* είναι εξαιρετικά σπάνια. Συνηθέστερες είναι οι περιπτώσεις παρασίτωσης στα ζώα και ιδιαίτερα στα πρόβατα (Nigam et al., 2010).

Στη φύση, οι ενήλικες θηλυκές μυΐες του είδους *L. sericata* εναποθέτουν 2000-3000 ωά κατά τη διάρκεια της ζωής τους. Τα ωά εναποτίθενται κατά συστάδες των 200-250 ωών, σε επιφάνεια η οποία θα αποτελέσει την πηγή τροφής των προνυμφών που θα εκκολαφθούν (Hayes et al., 1999). Η ανάπτυξη των προνυμφών απαιτεί

υπόστρωμα πλούσιο σε υγρασία διαφορετικά τα νεαρά έντομα αποξηραίνονται. Έτσι, τα ακμαία έντομα επιλέγουν για ωοτοκία νοτισμένα υποστρώματα πλούσια σε θρεπτικά συστατικά όπως είναι οι σοροί που βρίσκονται σε αποσύνθεση και τα υγρά νεκρωτικά έλκη (Erzinclioglu, 1996). Ανάλογα με τις περιβαλλοντικές συνθήκες και την κατάσταση του υποστρώματος τα ωά εκκολάπτονται σε 18-24 ώρες (Nigam et al., 2010).

Η *L. sericata* ανήκει στα ολομετάβολα έντομα όπου τα ανήλικα στάδια είναι τελείως διαφορετικά από τα ενήλικα και υφίσταται τη διαδικασία της πλήρους μεταμόρφωσης έως ότου φτάσει στο στάδιο του ενηλίκου (Greenberg, 1973). Οι προνύμφες είναι ακέφαλες, άποδες και τα στοματικά εξαρτήματά τους έχουν μειωθεί σε ένα ζεύγος χιτινισμένων στοματικών αγκίστρων που χρησιμεύουν στην κίνηση. Παρατηρείται επίσης μια μείωση στον αριθμό των τραχειακών ανοιγμάτων (τρημάτων). Έτσι, υπάρχει μόνο ένα ζεύγος αναπνευστικών τρημάτων, στο τελευταίο τμήμα του σώματος. Τα οπίσθια αναπνευστικά τρήματα είναι εμφανή (μεγάλα) και ανοίγουν προς τα πίσω παρά πλαγίως (Szpila et al., 2013; van Emden, 2013).

Στο πρώτο προνυμφικό στάδιο (instar I) οι προνύμφες έχουν μήκος 1-2 mm. Εκκρίνουν ένα ευρύ φάσμα πρωτεολυτικών ενζύμων τα οποία ρευστοποιούν τον ιστό του ξενιστή γεγονός που τους επιτρέπει να τραφούν μέσω της απορρόφησής του (Chambers et al., 2003; Sherman, 1998; Terra και Ferreira, 1994; Ziffren et al., 1953). Στις επόμενες 4-7 ημέρες (ανάλογα και με θερμοκρασία-υγρασία) και έπειτα από 2 εκδύσεις (molts) περνούν στη δεύτερη (Instar II) και τελικά στην τρίτη (Instar III) προνυμφική ηλικία όπου ξεπερνούν σε μέγεθος τα 10 mm. Μετά και το Instar III επέρχεται κατάσταση κορεσμού και εγκαταλείπουν το θρεπτικό υπόστρωμα προς αναζήτηση ενός περιβάλλοντος με μειωμένη υγρασία (π.χ. χώμα, άμμος) ώστε να περάσουν στο νυμφικό στάδιο (pupal stage) όπου και παραμένουν για 10-20 ημέρες (Sherman, 1998). Οι νύμφες (pupae) της *L. sericata* είναι ακίνητες, συνεσφιγμένες και δεν τρέφονται (Greenberg, 1973; van Emden, 2013). Μετά και το πέρας του νυμφικού σταδίου το πλήρως αναπτυγμένο ενήλικο έντομο (ακμαίο, imago) διαρρηγνύει τη λεία θήκη (puparium) του συρρικνωμένου και χιτινισμένου δέρματος του Instar III εντός της οποίας βρισκόταν κατά το νυμφικό στάδιο και εξέρχεται (Nigam et al., 2010; van Emden, 2013). Για τη σεξουαλική ωρίμανση (ανάπτυξη ωοθηκών) των



Εικόνα: κύκλος ζωής *L. sericata* (Grassberger et al., 2013)



Εικόνα: *L. sericata*: (a) ακμαίο έτοιμο για ωοτοκία· (b) ωά· (c) πρόσθιο μέρος προνύμφης τρίτου instar με τα χαρακτηριστικά στοματικά άγκιστρα· (d) τετμημένη προνύμφη τρίτου instar όπου διακρίνονται οι σιελογόνοι αδένες (βέλη), ο πρόλοβος (Cr), ο οισοφάγος (E), ο στομάχος (Pr), το μεσέντερο (Mg) και το οπισθέντερο (Hg) (Grassberger et al., 2013)

θηλυκών ακμαίων απαιτείται πηγή σακχάρου, νερό και πηγή πρωτεΐνης η οποία θα χρησιμεύσει και ως υπόστρωμα για ωοτοκία (Zhang et al., 2009).

4.4 Προνύμφες και Ιατροδικαστική Εντομολογία

Μυΐες της οικογένειας των καλλιφοριδών αποτελούν το πρώτο σμήνος εντόμων που αποικίζει ένα πτώμα (Smith, 1986) και αποτελούν σημαντικό εύρημα στην προσπάθεια προσδιορισμού του χρόνου θανάτου (postmortem interval, PMI) (Grassberger και Reiter, 2001). Μυΐες του γένους *Lucilia* έλκονται από τις οσμές που παράγονται κατά τα πρώτα στάδια της αποσύνθεσης (Anderson, 2001; Dadour et al., 2001). Ο ρυθμός ανάπτυξης των προνυμφών της *L. sericata* εξαρτάται από τις καιρικές συνθήκες, τη γεωγραφική θέση και από εποχιακές μεταβολές. Εντούτοις, λαμβάνοντας υπόψη τους παραπάνω παράγοντες, ο ιατροδικαστής μπορεί να υπολογίσει με ακρίβεια τον PMI. Ακόμη, η παρουσία ή η απουσία ορισμένων ειδών προνυμφών μπορεί να δώσει πολύτιμες πληροφορίες σχετικά με πιθανή μεταθανάτια μετακίνηση του πτώματος (Nigam et al, 2010). Τέλος, τα έντομα που ανακτώνται από τους αποσυντιθέμενους ιστούς μπορούν να λειτουργήσουν ως ένα πολύτιμο εργαλείο για την Τοξικολογία (Εντομοτοξικολογία). Οι προνύμφες είναι σε θέση να σκελετοποιήσουν το πτώμα μέσα σε λίγες μόνο ημέρες, καταναλώνοντας τα σωματικά υγρά και τους ιστούς που στέλνονται συνήθως για τοξικολογικές αναλύσεις. Έτσι, εάν μια φαρμακευτική ή τοξική ουσία (π.χ. οπιούχα, κοκαΐνη, βαρβιτουρικά) σχετίζεται με το θάνατο του συγκεκριμένου ατόμου, οι προνύμφες που αναπτύσσονται μεταθανάτια την καταναλώνουν παράλληλα με τους ιστούς σε βάρος των οποίων τρέφονται, και η χημική ανάλυσή τους την αποκαλύπτει σε πλείστες περιπτώσεις (Campobasso et al., 2004; Στούκας και Μιχαλοδημητράκης, 2008).

4.5 Προνύμφες και Επούλωση

4.5.1 Αποδοχή και Ενδείξεις

Η ελεγχόμενη θεραπευτική μυΐαση με τη χρήση αποστειρωμένων προνυμφών, υπό τον όρο Maggot Debridement Therapy (MDT) (Sherman, 2009), έλαβε έγκριση από τον Αμερικανικό Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων το 2004 ως ιατροτεχνολογικό προϊόν μίας χρήσης (υποχρεωτικά συνταγογραφούμενο) με ενδείξεις: τον καθαρισμό νεκρωτικού ιστού σε έλκη κατακλίσεων, φλεβικά, νευροπαθητικά έλκη και μετεγχειρητικές πληγές (Food and Drug Administration, 2004). Ομοίως, το 2010 έλαβε έγκριση από τον Ευρωπαϊκό Οργανισμό Φαρμάκων για χορήγηση σε έλκη του άκρου ποδός (European Medicines Agency, 2010). Η μέθοδος εφαρμόζεται σε πολλές χώρες ανά την υφήλιο μεταξύ των οποίων είναι οι Η.Π.Α., η Αγγλία, η Αυστραλία, η Ιαπωνία και το Ισραήλ (Kruglíkova και Chernysh, 2011) ενώ περισσότερα από 24 εργαστήρια έχουν λάβει άδεια παρασκευής αποστειρωμένων προνυμφών για ιατρική χρήση (Sherman, 2009).

4.5.2 Ευνοϊκές ιδιότητες των προνυμφών της *L. sericata*

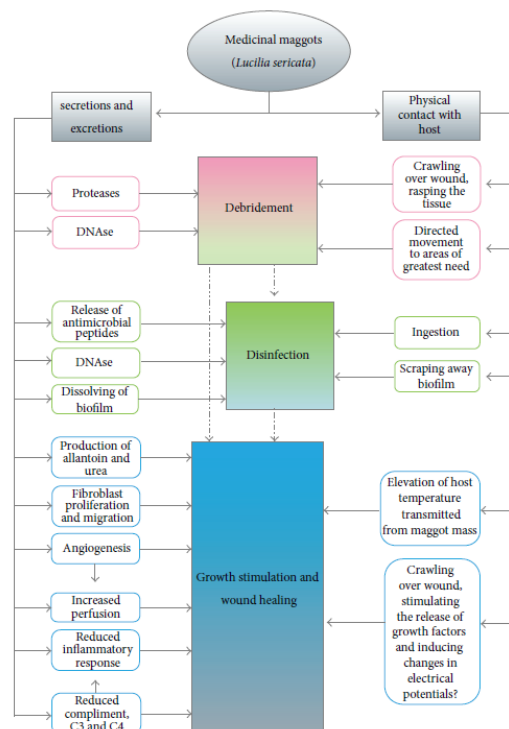
Οι προνύμφες της *L. sericata* διαθέτουν εγγενή χαρακτηριστικά που τις καθιστούν τις πλέον κατάλληλες στην εφαρμογή του MDT σε αντίθεση με τις μυΐες των οικογενειών Oestridae και Sarcophagidae που μπορούν επίσης να προκαλέσουν μυΐαση. Ενδεικτικά, οι προνύμφες της *L. sericata* τρέφονται αποκλειστικά με τον νεκρωτικό ιστό που έχει σχηματιστεί στην περιοχή του έλκους χωρίς να υπάρχει κίνδυνος διείσδυσης και προσβολής εσωτερικών οργάνων. Ακόμη, μπορούν να αναπτυχθούν ταχέως στον ξενιστή χωρίς να εμφανίζουν εξειδίκευση. Ιδιαίτερα σημαντικό βέβαια είναι το ότι εκτρέφονται με ευκολία *in vitro* και ότι τα ωά τους μπορούν να αποστειρωθούν με τις υπάρχουσες μεθόδους (Sherman et al., 2000) με αποτέλεσμα να είναι δυνατή η ανάπτυξη προνυμφών οι οποίες όχι απλά επιβιώνουν σε περιβάλλον στείρο μικροβίων αλλά και επιτελούν τις λειτουργίες τους ανεμπόδιστα (Wolff και Hansson, 2005). Στον πίνακα που ακολουθεί αναφέρονται τα είδη μυΐών που έχουν δοκιμαστεί στη θεραπευτική:

Οικογένεια	Είδος	Πρώτη Αναφορά
Calliphoridae	<i>Calliphora vicina</i>	Teich και Myers (1986)
	<i>Chrysomya rufifacies</i>	
	<i>Lucilia caesar</i>	Baer (1931) και McClellan (1932)
	<i>Lucilia cuprina</i>	Fine και Alexander (1934)
	<i>Lucilia illustris</i>	Leclercq (1990)
	<i>Lucilia sericata</i>	Baer (1931)
	<i>Phormia regina</i>	Baer (1931) Horn et al. (1976) Robinson (1933) Reames et al. (1988)
	<i>Protophormia terraenovae</i>	
Sarcophagidae	<i>Wohlfahrtia nuba</i>	Grantham-Hill (1933)

Πίνακας: είδη προνυμφών που έχουν δοκιμαστεί (Grassberger et al., 2013)

4.5.3 Μηχανισμοί Δράσης των Προνυμφών στην Πληγή

Κύρια δράση των προνυμφών της *L. sericata* αποτελεί η απομάκρυνση του νεκρωτικού (debridement) και ιδιαίτερα του κίτρινου ιώδους ιστού που καλύπτει τον πυθμένα του έλκους. Έχει βρεθεί ότι κάθε προνύμφη μπορεί να απομακρύνει έως και 25mg νεκρωτικού ιστού μέσα σε 24h (Mumcuoglu, 2001). Ωστόσο, μελέτες φέρνουν στην επιφάνεια τη δράση των εκκρίσεων/απεκκρίσεων τους τόσο έναντι των βακτηρίων (Huberman et al., 2007a; Huberman et al., 2007b) όσο και στην προώθηση των γεγονότων της επούλωσης (Wang et al., 2010).

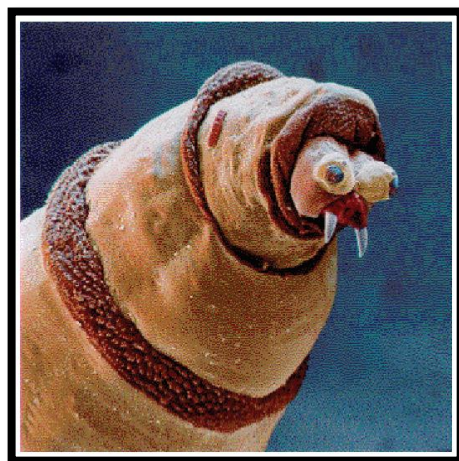


Σχήμα: μηχανισμοί δράσης προνυμφών (Sherman, 2014)

4.5.3.1 Debridement

Το σώμα των προνυμφών της *L. sericata* διαθέτει μικροσκοπικές προσεκβολές με τις οποίες προκαλείται ήπια απόξεση του νεκρωτικού ιστού κατά την κίνησή τους στον πυθμένα του έλκους (Sherman, 2014; Thomas et al., 2002). Οι εκκρίσεις/απεκκρίσεις (E/A) τους τον ρευστοποιούν και σε υγρή πλέον μορφή μπορεί να καταναλωθεί. Αξίζει να σημειωθεί ότι η φυσική δραστηριότητά τους στον πυθμένα του έλκους αποτέλεσε έναν από τους βασικούς λόγους για τους οποίους ο FDA κατέταξε τις προνύμφες της *L. sericata* στην κατηγορία των ιατροτεχνολογικών (Sherman, 2014).

Μελέτες καταδεικνύουν ότι οι E/A περιέχουν ένα ευρύ φάσμα MMP όπως πρωτεάσες σερίνης τύπου θρυψίνης και τύπου χυμοθρυψίνης, μία πρωτεΐνάση ασπαρτικού και μία MMP τύπου εξωπεπτιδάσης, οι οποίες διατηρούν τη δράση τους σε μεγάλο εύρος pH (5.0-10.0) (Schmidtchen et al., 2003; Chambers et al., 2003; Telford et al., 2010). Ειδικότερα, μέσω της έκκρισης αμμωνίας επιτυγχάνεται αλκαλοποίηση της περιοχής ενεργοποιώντας πρωτεάσες τύπου θρυψίνης που συμβάλλουν στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την παραγωγή



Εικόνα: πρόσθιο τμήμα προνύμφης *L. sericata*, λήψη με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (Fleischmann et al., 2004)

κυτταροκινών επιταχύνοντας την επουλωτική διαδικασία (Chambers et al., 2003). Ακόμη, κάποιες από τις πρωτεάσες παρουσιάζουν ανθεκτικότητα έναντι στη δράση των αναστολέων των πρωτεασών (Telford et al., 2010). Ένα από αυτά τα ένζυμα (μια πρωτεάση σερίνης τύπου χυμοθρυψίνης) έχει παραχθεί με γενετικό ανασυνδυασμό σε *Escherichia coli* (Pritchard et al., 2002).

Επιπροσθέτως, οι E/A περιέχουν δεοξυριβονουκλεάση (DNAse) η οποία καταστρέφει τόσο μικροβιακό όσο και ανθρώπινο DNA στην περιοχή του νεκρωτικού ιστού (Brown et al., 2012). Η DNAse θα μπορούσε να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο όχι μόνο στην απομάκρυνση του νεκρωτικού ιστού αλλά και στη μείωση του βακτηριακού φορτίου και την αντιμετώπιση του biofilm (Sherman, 2014).

4.5.3.2 Αντιμικροβιακή Δράση

Αρχικά τέθηκε η υπόθεση ότι συμβιωτικά βακτήρια του πεπτικού όπως ο *Proteus mirabilis* παρήγαγαν αντιμικροβιακές ουσίες (Greenberg, 1968). Δύο εξ αυτών, το φαινυλοξικό οξύ και η φαινυλακεταλδεΐδη, ταυτοποιήθηκαν και απομονώθηκαν από στέλεχος πρωτέα του πεπτικού των προνυμφών της μύιας *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae) (Erdmann και Khalil, 1986). Ωστόσο, νεότερα δεδομένα έδειξαν ότι η παρουσία του *P. mirabilis* δεν είναι απαραίτητη για την εκδήλωση αντιβακτηριακής δράσης. Κατά την πρόσληψη *E. coli* που παρήγαγε φθορίζουσα πρωτεΐνη παρατηρήθηκε η πορεία του βακτηρίου κατά μήκος του πεπτικού των προνυμφών της *L. sericata* με τη βοήθεια συνεστιακού μικροσκοπίου σάρωσης με laser. Ενώ το βακτηριακό φορτίο ήταν αρκετά υψηλό στον πρόλοβο, παρατηρήθηκε μεγάλη μείωση στο μεσέντερο και το οπισθέντερο και τελικά εξερχόταν μηδενικό από το ορθό. Εξάγεται λοιπόν το συμπέρασμα ότι οι προνύμφες καταπολεμούν τα βακτήρια και μέσω του συστήματος πέψης τους (Mumcuoglu et al., 2001).

Σύμφωνα με νεότερες μελέτες, από τις προνύμφες της *L. sericata* έχουν απομονωθεί αντιβακτηριακά κλάσματα δύο τάξεων μεγέθους: ένα της τάξεως των 0,3-0,5 kDa και ένα <500Da. Τα κλάσματα αυτά εμφάνισαν δράση έναντι ευρέως φάσματος βακτηρίων μεταξύ των οποίων ήταν και τα εξής: *Staphylococcus aureus*, *S. aureus* ανθεκτικός στη μεθικιλίνη (MRSA), *S. aureus* ευαίσθητος στη μεθικιλίνη (MSSA), *Streptococcus pyogenes* και σε μικρότερο βαθμό έναντι *Pseudomonas aeruginosa* (Bexfield et al., 2004; Kerridge et al., 2005). Στη συνέχεια απομονώθηκαν τρία μόρια μοριακού βάρους 194, 152 και 138 kDa από ολικό εκχύλισμα, εκχύλισμα αιμολέμφου και από τις εκκρίσεις των προνυμφών, με αντιβακτηριακή δράση έναντι πολλών παθογόνων (Huberman et al., 2007b; Huberman et al., 2007a). Τα μόρια αυτά αποτελούν την πρώτη γραμμή άμυνας έναντι των παθογόνων ενώ η δράση τους ενισχύεται με τη σύνθεση αντιμικροβιακών πεπτιδίων σε προχωρημένο στάδιο της μόλυνσης (Kerridge et al., 2005).

Το 2010 προσδιορίστηκε για πρώτη φορά η αλληλουχία DNA ενός αντιμικροβιακού πεπτιδίου τύπου ντεφενσίνης από προνύμφες της *L. sericata*, το οποίο ονομάστηκε Lucifensin ενώ η έρευνα για την ανεύρεση παρόμοιων πεπτιδίων συνεχίζεται και σε άλλα έντομα στα οποία έχουν βρεθεί ντεφενσίνες (Čeřovský et al.,

2010). Πέραν αυτού, έλεγχος κλάσματος μοριακού βάρους <500Da έναντι κοινών παθογόνων στην κλινική πράξη όπως MRSA, *Staphylococcus* sp., *Bacillus* sp., *E. coli*, *Pseudomonas* sp., *Proteus* sp., *Enterococcus* sp., *Serratia* sp., *Candida* sp. και *Enterobacter* sp. οδήγησε στην απομόνωση ουσίας με εμπειρικό τύπο C₁₀H₁₆N₆O₉ η οποία έχει κατοχυρωθεί ως αντιβιοτικό με το όνομα Seraticin[®] (Nigam et al., 2010).

Μελέτες σε βιοϋλικά έδειξαν ότι η προσθήκη E/A προκαλεί λύση των biofilm των *S. aureus*, *P. aeruginosa* και *Staphylococcus epidermidis* ενώ ταυτόχρονα δυσχεραίνει την ανάπτυξή τους. Συγκριτικά, E/A από προνύμφες τρίτου σταδίου εμφάνισαν τα καλύτερα αποτελέσματα (Cazander et al., 2009; Cazander et al., 2010; Harris et al., 2009). Ακόμη, τα τελευταία χρόνια ερευνάται η δράση τους έναντι μυκήτων με τα αποτελέσματα να είναι ελπιδοφόρα για την αντιμετώπιση των *Fusarium sambucinum*, *Fusarium verticillioides* και *Candida albicans* (Palošova et al., 2008; Evans et al., 2015). Το 2014 ταυτοποιήθηκε ένα πεπτίδιο με 77 αμινοξέα που ονομάστηκε Lucimycin και εμφανίζει δράση έναντι Ασκομυκήτων, Βασιδιομυκήτων και Ζυγομυκήτων (Pöppel et al., 2014). Τέλος, μελέτες in vitro και in vivo έδειξαν δράση των E/A έναντι των πρωτοζώων *Leishmania tropica* και *Leishmania major* που προκαλούν δερματική λείσμανίαση με το μηχανισμό δράσης να μην είναι ακόμη γνωστός (Polat et al., 2012; Sanei-Dehkordi et al., 2016).

4.5.3.3 Επούλωση

Η συμβολή των προνυμφών της *L. sericata* στην ανάπτυξη νέου ιστού υποστηρίζεται από εργαστηριακά και κλινικά ευρήματα και οφείλεται τόσο σε μηχανικά μέσα όσο και σε βιοχημικά μονοπάτια (Sherman, 2014). Αρχικά, η αλκαλοποίηση της περιοχής του έλκους σε συνδυασμό με την παραγωγή αλλαντοΐνης και ουρίας θεωρήθηκαν τα βασικά μέσα συμβολής των προνυμφών στα γεγονότα της επούλωσης (Robinson, 1935).

Η ελαστάση (πρωταεάση σερίνης) αποδομεί την εξωκυττάρια θεμέλια ουσία παρεμποδίζοντας τους μηχανισμούς επιδιόρθωσης. Στις E/A βρέθηκαν θερμοευαίσθητα συστατικά τα οποία περιορίζουν την απελευθέρωση ελαστάσης και την παραγωγή H₂O₂ από τα ενεργοποιημένα ουδετερόφιλα με δοσοεξαρτώμενο τρόπο χωρίς να υπονομεύεται η φαγοκυτταρική τους δραστηριότητα (van der Plas et al., 2007). Η προσωρινή αύξηση της συγκέντρωσης του ενδοκυττάριου cAMP κατά τη χορήγηση των E/A οδηγεί στο συμπέρασμα ότι πιθανόν μηχανισμοί σχετιζόμενοι με το cAMP να εμπλέκονται στην αναστολή των προφλεγμονωδών απαντήσεων των ουδετεροφίλων και τελικά στην πρόληψη ή την αντιμετώπιση της χρόνιας φλεγμονώδους κατάστασης (van der Plas et al., 2007). Ο έλεγχος της φλεγμονής επιτυγχάνεται και μέσω αναστολής της ενεργοποίησης του συμπληρώματος και ειδικότερα των κλασμάτων C3a και C5a (Tamura et al., 2017). Ακόμη, παρουσία των E/A η μετανάστευση των μονοκυττάρων μειώθηκε και τα μακροφάγα εμφάνισαν μειωμένη παραγωγή των προφλεγμονωδών κυτταροκινών TNF-α, IL-12p40 και του παράγοντα αναστολής της μετανάστευσης των μακροφάγων (macrophage migration inhibitory factor, MIF) (van der Plas et al., 2009).

Επιπροσθέτως, στις E/A ταυτοποιήθηκαν τα αμινοξέα L-ιστιδίνη, 3-γουανιδινοπροπιονικό οξύ (GPA) και η L-βαλινόλη, ουσίες οι οποίες έδειξαν ότι ενισχύουν τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων και την αγγειογένεση (Bexfield et al., 2010). Σύμφωνα με in vitro μελέτες, οι εκκρίσεις των προνυμφών ενισχύουν σημαντικά τη μετανάστευση των ινοβλαστών στην περιοχή του έλκους (Horobin et al., 2003; Horobin et al., 2005). Βιοψίες που λήφθηκαν μετά από θεραπεία με προνύμφες αποκάλυψαν τον σχηματισμό κοκκιώδους ιστού και αγγειογένεσης ως αποτέλεσμα της εφαρμογής τους (Sherman, 2002). Τέλος, μετά τη θεραπεία ασθενών με προνύμφες παρατηρήθηκε αυξημένη αιμάτωση και οξυγόνωση του ιστού (Wollina et al., 2002).

4.5.4 Τεχνικές Εφαρμογής

Για την επιτυχία της μεθόδου MDT ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να λαμβάνεται στη διασφάλιση της παραμονής των προνυμφών στην πάσχουσα περιοχή (Nishijima et al., 2017). Το έλκος θα πρέπει να ξεπλένεται με φυσιολογικό ορό για την απομάκρυνση ρύπων (Choudhary et al., 2016) ενώ η εφαρμογή υδρογέλης προτείνεται για την απομάκρυνση του ξηρού νεκρωτικού ιστού. Οι προνύμφες αποξηραίνονται σε περιβάλλον φτωχό σε υγρασία αλλά και δεν τους επιτρέπεται η πρόσβαση στα βαθύτερα σημεία του έλκους όπου και δεν είναι δυνατός ο χειρουργικός καθαρισμός (Mid Essex CCG, 2018). Η συστηματική χορήγηση αντιβιοτικών δεν αποτελεί τροχοπέδη για την εφαρμογή του MDT (Sherman et al., 1995; Peck και Kirkup, 2014) ωστόσο η τοπική χορήγηση αλοιφών με αντιβιοτικά θα πρέπει να αποφεύγεται καθώς μπορεί να προκαλέσει απόφραξη των αναπνευστικών τρημάτων των προνυμφών και να οδηγήσει σε ασφυξία (Grassberger et al., 2013).

Για την εφαρμογή των προνυμφών της *L. sericata* στην περιοχή του ελλείμματος επιλέγεται μία από τις δύο τεχνικές που θα περιγραφούν στη συνέχεια:

4.5.4.1 Εφαρμογή προνυμφών σε ελεύθερη επαφή με το έλκος

Για την ελεύθερη επαφή των προνυμφών με την πάσχουσα περιοχή κατασκευάζεται ανάλογα με τις διαστάσεις του έλκους, ειδικό επίθεμα τύπου κλωβού εντός του οποίου τοποθετούνται οι προνύμφες (Choudhary et al., 2016). Το επίθεμα αυτό εμποδίζει τη διαφυγή των προνυμφών και ταυτόχρονα προστατεύει το υγιές δέρμα από ερεθισμό λόγω της δράσης των εκκρινόμενων πρωτεολυτικών ενζύμων (Turkmen et al., 2010). Το ιδανικό επίθεμα θα πρέπει να πληροί τις παρακάτω προϋποθέσεις:

Το Ιδανικό Επίθεμα για MDT

1. Αποτρέπει τη διαφυγή των προνυμφών
2. Επιτρέπει τη ροή αέρα στο εσωτερικό του και των υγρών του ρευστοποιηθέντος νεκρωτικού ιστού στη γάζα
3. Εφαρμόζεται εύκολα
4. Διατηρείται εύκολα
5. Είναι ανθεκτικό καθ' όλη τη διάρκεια της θεραπείας
6. Δεν είναι ερεθιστικό για το δέρμα
7. Είναι ημιδιαφανές και επιτρέπει τον οπτικό έλεγχο της πορείας του τραύματος
8. Δεν είναι δαπανηρό

Πίνακας: χαρακτηριστικά επιθέματος για MDT (Sherman, 1997)

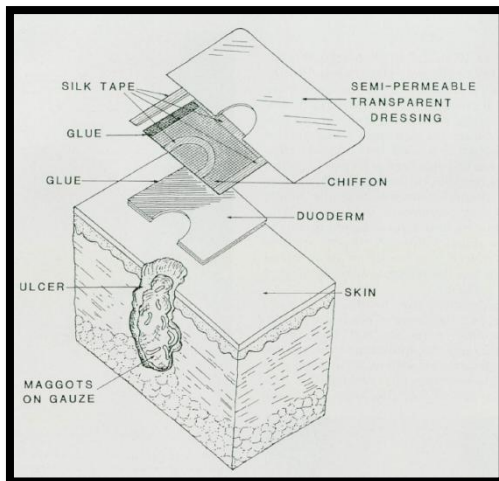
Μετά από χρόνια δοκιμών τα οποία είχαν ως αποτέλεσμα τη δημιουργία είτε εξαιρετικά πολύπλοκων επιθεμάτων είτε επιθεμάτων που κάθε άλλο παρά διασφάλιζαν την ομαλή πορεία της θεραπείας, οι ερευνητές κατέληξαν σε ένα επίθεμα 2 επιπέδων (Sherman, 1997).

Το πρώτο (κάτω) επίπεδο (τύπου κλωβού) το οποίο έρχεται σε επαφή με το δέρμα έχει ως σκοπό τον περιορισμό των προνυμφών ενώ ταυτόχρονα επιτρέπει την είσοδο του αέρα και την έξοδο των υγρών της περιοχής. Ένα υδροκολλοειδές επίθεμα χαράσσεται στο περίγραμμα του έλκους και τοποθετείται επάνω στο υγιές δέρμα. Οι προνύμφες τοποθετούνται στην πάσχουσα περιοχή και το έλλειμμα καλύπτεται με αποστειρωμένο νάιλον πλέγμα το οποίο επικολλάται στο υδροκολλοειδές. Διάφανη ημιδιαπερατή κολλητική μεμβράνη καλύπτει την περιοχή λίγο πριν το τέλος του υδροκολλοειδούς έως και το υγιές δέρμα. Η μεμβράνη αυτή προσδίδει επιπλέον σταθερότητα στο επίθεμα και λειτουργεί ως δεύτερος φραγμός έναντι στη διαφυγή των προνυμφών (Sherman, 1997; Turkmen et al., 2010). Το κάτω αυτό επίπεδο αφήνεται χωρίς αλλαγή για 24, 48 ή 72 h ανάλογα με τις ανάγκες της θεραπείας (Mumcuoglu, 2001).

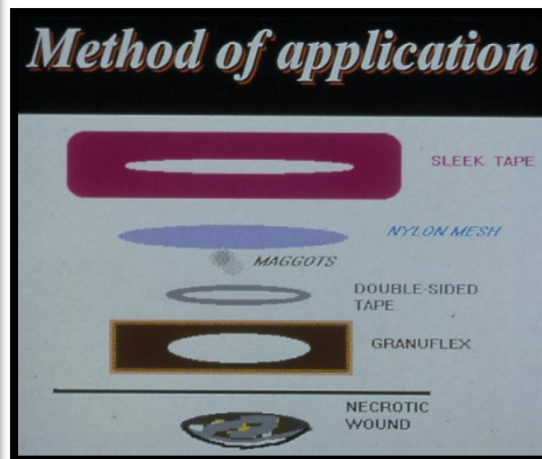
Στη συνέχεια, τοποθετείται το δεύτερο (επάνω) επίπεδο το οποίο αποτελείται από γάζα η οποία απορροφά τα υγρά του νεκρωτικού ιστού που ρευστοποιείται από τη δράση των προνυμφών (Sherman, 1997; Turkmen et al., 2010). Η γάζα αυτή απαιτεί συχνή αλλαγή (κάθε 4-6 h) ενώ εάν παραμείνει χωρίς αλλαγή για περισσότερο των 8 h οι προνύμφες οδηγούνται σε ασφυξία ή πνιγμό από τα υγρά της πληγής. Κατά τις αλλαγές αυτές δεν επηρεάζεται το πρώτο (κάτω) επίπεδο (Sherman, 1997).

Μετά το τέλος της θεραπείας το νάιλον πλέγμα και το υδροκολλοειδές αφαιρούνται και οι προνύμφες απομακρύνονται εύκολα με έκπλυση με φυσιολογικό ορό και με τη βοήθεια αποστειρωμένης λαβίδας (Derby City PCT, 2012).

Ακολουθεί απεικόνιση της τεχνικής επιθέσεως για εφαρμογή προνυμφών σε ελεύθερη επαφή με έλκος:



Εικόνα: τεχνική επιθέσεως για MDT (Sherman, 1997)



Εικόνα: τεχνική επιθέσεως για MDT (Turkmen et al., 2010)

4.5.4.2 Εφαρμογή προνυμφών περιορισμένων σε ασκό (biobag)

Για την αποφυγή της άμεσης επαφής με την περιοχή του έλκους που σε κάποιους ασθενείς μπορεί να προκαλέσει αίσθημα πόνου αλλά και για ευκολότερη εφαρμογή, προνύμφες μπορούν να εγκλειστούν σε ασκό πολυβινυλικής αλκοόλης (PVA hydrosponge) πάχους 0,5 mm (Fleischmann και Thoener, 2000). Εντός του ασκού τοποθετείται κύβος από σπογγώδες

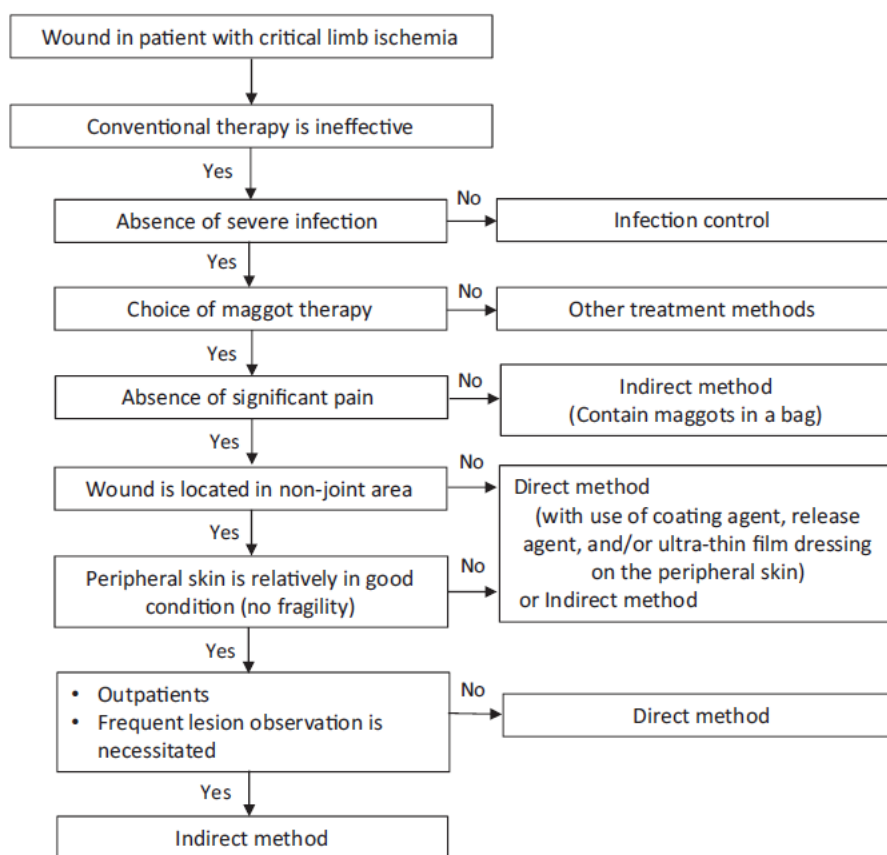


Εικόνα: biobag (Blake et al., 2007)

υλικό για να αποφευχθεί η συγκόλληση των τοιχωμάτων (Fleischmann και Thoener, 2000; Blake et al., 2007). Το πορώδες του ασκού επιτρέπει τη διαρροή των εκκρίσεων των προνυμφών στην πάσχουσα περιοχή και ταυτόχρονα τον ρευστοποιημένο νεκρωτικό ιστό να φτάσει σε αυτές (Grassberger και Fleischmann, 2002).

Ο ασκός καλύπτεται με νοτισμένη γάζα και η περιοχή επιδένεται. Ανάλογα με την πορεία της θεραπείας οι ασκοί μπορούν μετακινούνται στα σημεία όπου κρίνεται απαραίτητο (Derby City PCT, 2012). Έχει παρατηρηθεί ότι οι προνύμφες αναπτύσσονται βραδύτερα όταν βρίσκονται σε περιορισμό με αποτέλεσμα να απαιτούνται 4 ή και 5 ημέρες συνεχούς εφαρμογής στην περίπτωση του biobag (Blake et al., 2007; Derby City PCT, 2012).

Όταν οι ανάγκες του ασθενούς δεν αποκλείουν αυτόματα μία από τις δύο επιλογές, εργαστηριακά και κλινικά δεδομένα συνηγορούν ότι η εφαρμογή προνυμφών σε ελεύθερη επαφή με την πάσχουσα περιοχή είναι η πλέον αποδοτική μέθοδος (Thomas et al., 2002; Steenvoorde et al., 2007; Čičková et al., 2013). Σε κάθε περίπτωση, η επιλογή ανάμεσα στην εφαρμογή ελεύθερων προνυμφών ή biobag μπορεί να γίνει με βάση το παρακάτω διάγραμμα:



Διάγραμμα: επιλογή του καταλληλότερου τρόπου εφαρμογής του MDT (Nishijima et al., 2017)

4.5.5 Δοσολογία

Σύμφωνα με τα βιβλιογραφικά δεδομένα, η χορηγούμενη δόση των προνυμφών δεν είναι καθορισμένη με ακρίβεια. Συνήθως εφαρμόζονται 5-10 προνύμφες/cm² (Sherman, 2009; Singh et al., 2014; Waniczek et al., 2013). Στην κτηνιατρική έχει αναφερθεί τόσο η εφαρμογή 5-10 προνυμφών/cm² (Sherman et al., 2007; Lepage et al., 2012) όσο και ένα σχήμα με 8-12 προνύμφες/cm² (Κοϊσιονά et al., 2006). Η επιλογή του αριθμού των προνυμφών εξαρτάται από πολλούς παράγοντες όπως για παράδειγμα η ποσότητα του νεκρωτικού ιστού, το βάθος του ελλείμματος και το εύρος της πάσχουσας περιοχής (Lepage et al., 2012; Choudhary et al., 2016). Η προσπάθεια υπολογισμού του απαιτούμενου αριθμού των προνυμφών οδήγησε στην κατασκευή του παρακάτω πίνακα στον οποίο όμως δε λαμβάνονται υπόψη όλες οι παράμετροι που προαναφέρθηκαν. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι στον πίνακα δεν φαίνεται ο αριθμός των προνυμφών που θα εφαρμοστούν αλλά αποτελεί οδηγό για τον υπολογισμό του μεγέθους της παραγγελίας ανάλογα με τις ανάγκες του ασθενούς, με δεδομένο ότι οι προνύμφες έχουν εξαιρετικά μειωμένη διάρκεια ζωής (Derby City PCT, 2012).

Loose Larvae Calculator

1. Measure the dimensions of the wound in centimetres
2. Pick the nearest size from the measurements on the left of the chart
3. Move sideways to the appropriate percentage of wound coverage
4. The recommended number of larvae required is indicated.

Key

- 1 x Larvae100[®]
- 1 x Larvae200[®]
- 1 x Larvae100[®] + 1 x Larvae200[®]
- 2 x Larvae200[®]
- Use combination of Larvae100[®] + Larvae200[®] as required

Maximum wound size (cm)	Percentage of wound covered with slough/necrotic tissue				
	20%	40%	60%	80%	100%
up to 2 x 2	100	100	100	100	100
5 x 5	100	100	100	100	200
5 x 10	100	100	200	200	300
10 x 10	100	200	300	400	500
10 x 15	200	300	500	600	800
15 x 15	300	500	700	900	1200
15 x 20	300	600	900	1200	1500
20 x 20	400	800	1200	1600	2000

Note that the calculator only measures the surface of the wound. If the wound has significant depth, more larvae may be required.

Πίνακας: υπολογισμός απαιτούμενων περιεκτών με προνύμφες (BioMonde[®], 2016)

4.5.6 Δοσολογικό Σχήμα

Τα εργαστήρια διανέμουν αποστειρωμένες προνύμφες λίγο αφότου έχουν εκκολαφθεί και προτείνουν την άμεση εφαρμογή τους κατά την παράδοση. Συστήνουν καθημερινό έλεγχο της πορείας της θεραπείας και παραμονή των προνυμφών στην περιοχή του έλκους για 48-72 h (Derby City PCT, 2012; BioMonde[®], 2016). Αν απαιτείται συνέχιση της θεραπείας θα πρέπει να τοποθετηθούν νέες καθώς κατά το πέρας των 72 ωρών παρατηρείται κορεσμός και μείωση της δραστηριότητάς τους (Grassberger et al., 2013). Ακόμη, αναφέρεται ότι συνήθως απαιτούνται 1-6 κύκλοι θεραπείας (Monarch Labs, 2017).

Εντούτοις, προτείνεται και η στρατηγική της καθημερινής ανανέωσης των προνυμφών. Στην περίπτωση αυτή χρησιμοποιούνται προνύμφες 14-16 ωρών από τη στιγμή που εκκολάφθηκαν. Έχει βρεθεί ότι οι προνύμφες αναπτύσσονται ταχύτατα μεταξύ 16 και 40 ωρών από την εκκόλαψη με αποτέλεσμα να εκδηλώνουν τη βέλτιστη αποδοτικότητά τους τη χρονική αυτή περίοδο (Mumcuoglu, 2001). Ανάλογα με το μέγεθος της πληγής χρειάζονται κατά μέσο όρο 4 εφαρμογές (Mumcuoglu et al., 1999) ενώ η θεραπεία διαρκεί κατά μέσο όρο 6 ημέρες (Mumcuoglu, 2001).

4.5.7 Αντενδείξεις και Επιπλοκές

Η μέθοδος MDT είναι γενικά ασφαλής ωστόσο σε κάποιες περιπτώσεις η εφαρμογή των προνυμφών αντενδείκνυται ενώ ακόμα και όταν εφαρμόζονται ορθώς, υπάρχει πάντα η πιθανότητα εμφάνισης επιπλοκών (Grassberger et al., 2013). Στον πίνακα που ακολουθεί περιγράφονται οι περιπτώσεις στις οποίες η χορήγηση προνυμφών αντενδείκνυται.

Η χρήση των προνυμφών θα πρέπει να αποφεύγεται σε:
• ασθενείς με διαταραχές πήξης
• έλκη που περιβάλλουν μεγάλα αγγεία
• έλκη που βρίσκονται σε άμεση επικοινωνία με σωματική κοιλότητα ή εσωτερικά όργανα
• οφθαλμούς, ανώτερο γαστρεντερικό, αναπνευστική οδό
• οξείες, ταχέως εξελισσόμενες, απειλητικές για τη ζωή μολύνσεις
• ασθενείς με χαμηλό κατώφλι πόνου

Πίνακας: αντενδείξεις MDT (Nigam et al., 2010)

Σημαντική επίσης είναι η προστασία του υγιούς δέρματος που περιβάλλει το έλκος από τη δράση των εκκρινόμενων πρωτεολυτικών ενζύμων με τη χρήση αυτοκόλλητου επιθέματος ή υδροκολλοειδούς για την αποφυγή πρόκλησης ερυθήματος ή κυτταρίτιδας. Τα υγρά που παράγονται στην περιοχή μπορεί να προκαλέσουν χαλάρωση του επιθέματος και διαφυγή των προνυμφών εάν δεν έχει αφαιρεθεί μετά το πέρας 48 h. Ιδιαίτερη προσοχή θα πρέπει να δίνεται σε ασθενείς με αλλεργίες στα υλικά των επιθεμάτων ενώ μέχρι στιγμής δεν έχει αναφερθεί περιστατικό με αλλεργική αντίδραση στις προνύμφες καθεαυτές (Grassberger et al., 2013). Πρέπει να τονιστεί ακόμη, ότι η χρήση μη αποστειρωμένων προνυμφών μπορεί να οδηγήσει σε βακτηριαιμία ή/και σήψη (Nuesch et al., 2002).

Τα τελευταία χρόνια και ιδιαίτερα στις χώρες με ιστορικό εφαρμογής της θεραπείας, φαίνεται ότι μειώνεται αισθητά η ανησυχία των ασθενών και του περιβάλλοντός τους (γνωστή και ως the “yuck factor”) που λειτουργούσε αποτρεπτικά στο να αποδεχτούν τη μέθοδο (Sherman και Shimoda, 2004; Steenvoorde et al., 2005).

4.5.8 Κλινική Εφαρμογή

Ακολουθούν αναφορές αποτελεσμάτων κλινικών μελετών αλλά και μεμονωμένων περιστατικών όπου εφαρμόστηκε η μέθοδος MDT.

4.5.8.1 Προνύμφες και Debridement

- Σε μελέτη που διεξήχθη σε ασθενείς με χρόνια δυσεπούλωτα έλκη, στο 88,4% ο καθαρισμός του νεκρωτικού ιστού ήταν πλήρης με τη μελέτη να καταλήγει στο ότι η μέθοδος MDT αποτελεί γρήγορη και αποδοτική μέθοδο για καθαρισμό μεγάλων νεκρωτικών ελκών στα οποία οι συμβατικές μέθοδοι δεν βελτίωσαν την κατάσταση (Mumcuoglu et al., 1999).

- Σε μελέτη κοόρτης 63 ασθενών με έλκη πίεσης, παρατηρήθηκε 4 φορές γρηγορότερος καθαρισμός του νεκρωτικού ιστού με τη μέθοδο MDT σε σχέση με τη μέχρι τότε ακολουθούμενη διαδικασία του νοσοκομείου (Sherman, 2002).

- Σε αντίστοιχη μελέτη σε διαβητικούς ασθενείς με μη επουλώσιμα νευροπαθητικά και νευροϊσχαιμικά έλκη του άκρου ποδός, παρατηρήθηκε

καθαρισμός του 50% του νεκρωτικού ιστού σε 9 μόλις ημέρες σε αντίθεση με τη συμβατική θεραπεία όπου αντίστοιχο αποτέλεσμα επιτεύχθηκε μετά από 29 ημέρες. Τελικά, μετά από 4 εβδομάδες MDT παρατηρήθηκε πλήρης καθαρισμός ενώ στα περιστατικά όπου ακολουθήθηκε συμβατική θεραπεία, το 33% του νεκρωτικού ιστού δεν είχε απομακρυνθεί (Sherman, 2003).

- Τυχαιοποιημένη κλινική δοκιμή (randomized controlled trial, RCT) σε 267 ασθενείς με φλεβικά και μικτά έλκη, όπου εφαρμόστηκαν τόσο ελεύθερες προνύμφες όσο και περιορισμένες σε ασκό έδειξε στατιστικά σημαντικά μειωμένο χρόνο καθαρισμού του νεκρωτικού ιστού σε σχέση με την εφαρμογή υδρογέλης (Dumville et al., 2009).

4.5.8.2 Προνύμφες και Αντιμικροβιακή Δράση

- Σε RCT 19 ασθενών με χρόνια έλκη του άκρου ποδός παρατηρήθηκε σημαντική μείωση του βακτηριακού φορτίου σε σχέση με τις ομάδες ελέγχου (Contreras-Ruiz et al., 2005).

- Σε 12 από 13 διαβητικούς ασθενείς με μολυσμένα με MRSA έλκη των κάτω άκρων παρατηρήθηκε εξάλειψη της λοίμωξης μετά από κατά μέσο όρο 3 εφαρμογές MDT (Bowling et al., 2007).

- Μελέτη 60 κατάκοιτων διαβητικών με νευροϊσχαιμικά έλκη στα κάτω άκρα και περιφερική αγγειοπάθεια η εφαρμογή MDT οδήγησε σε μείωση των ακρωτηριασμών και της ανάγκης λήψης αντιβιοτικών (Armstrong et al., 2005).

- Σε διαβητικούς ασθενείς με μολυσμένα έλκη των κάτω άκρων παρατηρήθηκε απότομη μείωση του βακτηριακού φορτίου μετά από μόλις έναν κύκλο MDT (Tantawi et al., 2007).



Εικόνα: δύο έλκη διαβητικού κάτω άκρου: πριν το MDT (a), μετά από 2 (b), 4 (c) και 8 (d) εβδομάδες εφαρμογής του MDT (Tantawi et al., 2007)

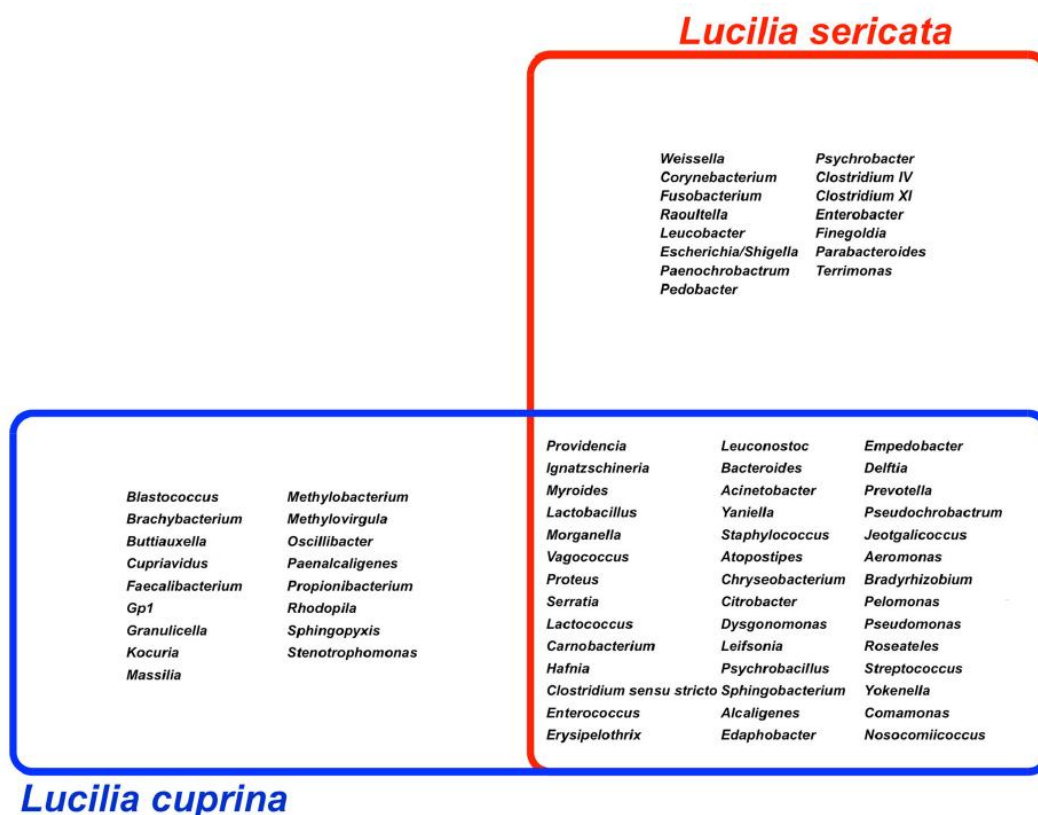
4.5.8.3 Προνύμφες και Επούλωση

- Μετά από μία εφαρμογή προνυμφών σε 30 ασθενείς με έλκη μικτής αιτιολογίας εκτιμήθηκε η θετική επίδρασή τους στην επούλωση μέσω ανάπτυξης κοκκιώδους ιστού στον πυθμένα του έλκους και μέσω αύξησης της οξυγόνωσης των ιστών (Wollina et al., 2002).

4.5.9 Η σημασία της αποστείρωσης των προνυμφών

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, η χρήση ελλιπώς ή μη αποστειρωμένων προνυμφών μπορεί να οδηγήσει σε βακτηριαιμία ή/και σήψη (Nuesch et al., 2002).

Στο διάγραμμα Venn που ακολουθεί παρατίθενται τα γένη των βακτηρίων που έχουν βρεθεί σε δύο είδη μυϊών που έχουν χρησιμοποιηθεί στη μέθοδο MDT (*L. sericata* και *L. cuprina*).



Διάγραμμα: γένη βακτηρίων των *L. sericata* και *L. cuprina* (Singh et al., 2015)

4.5.9.1 Μέθοδοι αποστείρωσης

Βασικά χαρακτηριστικά ενός διαλύματος ώστε να επιλεγεί για την αποστείρωση των ωών αποτελούν το ευρύ αντιβακτηριακό φάσμα σε συνδυασμό με την όσο το δυνατόν χαμηλότερη εκδήλωση τοξικής δράσης (Fleischmann et al., 2004). Ανάμεσα στις διαφορετικές τεχνικές αποστείρωσης των ωών της *L. sericata*, τα πρωτόκολλα των Sherman και Tran (1995) και Mumcuoglu et al. (1999) αποτελούν τα πλέον κοινώς εφαρμοζόμενα.

- Τα ωά διαχωρίζονται μετά από εμβάπτιση σε διάλυμα Na_2SO_3 1% και ανάδευση για 10 min. Ακολουθεί αποστείρωση με αφαίρεση του διαλύματος Na_2SO_3 και προσθήκη διαλύματος Lysol 3% και ανάδευση για 10 min. Στη συνέχεια, το διάλυμα απομακρύνεται, τα ωά εκπλένονται με φυσιολογικό ορό και τοποθετούνται σε αποστειρωμένο θρεπτικό μέσο για επώαση (Sherman και Tran, 1995).

- Τα ωά διαχωρίζονται μετά από εμβάπτιση σε διάλυμα Na_2SO_3 1%. Ακολουθεί αποστείρωση με αφαίρεση του διαλύματος Na_2SO_3 και προσθήκη διαλύματος CH_2O 2,5%. Στη συνέχεια, το διάλυμα απομακρύνεται, τα ωά εκπλένονται με φυσιολογικό ορό και τοποθετούνται σε αποστειρωμένο θρεπτικό μέσο περιέχον 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ θεικής καναμυκίνης για επώαση (Mumcuoglu et al., 1999).

- Τα ωά διαχωρίζονται μετά από εμβάπτιση σε διάλυμα NaClO 0,05%. Ακολουθεί αποστείρωση με αφαίρεση του διαλύματος NaClO και προσθήκη διαλύματος CH₂O 5% για αποστείρωση. Στη συνέχεια, το διάλυμα απομακρύνεται, τα ωά εκπλένονται με αποστειρωμένο απεσταγμένο H₂O και τοποθετούνται σε αποστειρωμένο θρεπτικό μέσο περιέχον αντιβιοτικά (θειική Πολυμυξίνη Β και θειική Καναμυκίνη) (IBS Newsletter #6, 2002).

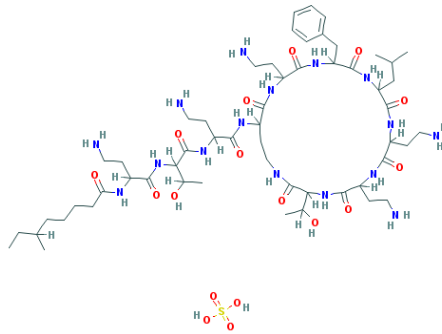
➤ **Θειική Πολυμυξίνη Β**

Οι πολυμυξίνες είναι αμφιπαθητικά μόρια λιποπεπτιδίων που προέρχονται από τα προϊόντα ζύμωσης των βακτηρίων *Paenibacillus polymyxa* (Stansly et al., 1947). Πέντε διαφορετικές πολυμυξίνες (Α, Β, C, D και E) απομονώθηκαν αρχικά, αλλά μόνο η πολυμυξίνη Β και η πολυμυξίνη Ε (κολιστίνη) είναι διαθέσιμες για κλινική χρήση (Kwa et al., 2007).

Τόσο η πολυμυξίνη Β όσο και η κολιστίνη είναι δραστικές έναντι αρκετών Gram αρνητικών βακτηρίων, συμπεριλαμβανομένων των *Acinetobacter* spp., *P. aeruginosa*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Yersinia* spp. και *Citrobacter* spp.. Ωστόσο, όλα τα θετικά κατά Gram βακτήρια, τα αναερόβια και ορισμένα Gram αρνητικά (*Proteus* spp., *Providencia* spp., *Morganella morganii*, *Serratia* spp. και *Burkholderia cepacia*) είναι εγγενώς ανθεκτικά στις πολυμυξίνες (Kwa et al., 2008). Σε πρόσφατες μελέτες, αποδείχθηκε ότι η πολυμυξίνη Β έχει και αντιμυκητιασική δραστηριότητα ευρέος φάσματος σε σχετικώς υψηλές συγκεντρώσεις και επιδεικνύει συνέργεια με την φλουκοναζόλη έναντι των *Candida glabrata* και *Cryptococcus neoformans* (Zhai et al., 2010).

Μετά τη σύνδεση με τους λιποπολυσακχαρίτες (LPS) στην εξωτερική μεμβράνη Gram αρνητικών βακτηρίων, οι πολυμυξίνες διαταράσσουν τόσο την εξωτερική όσο και την εσωτερική μεμβράνη. Η υδρόφοβη ουρά παίζει σημαντικό ρόλο στην πρόκληση βλάβης στη μεμβράνη, με δράση παρόμοια με αυτής των απολυμαντικών (Velkov et al., 2013).

Η απομάκρυνση της υδρόφοβης ουράς της πολυμυξίνης Β δίδει ένα νοναπεπτίδιο πολυμυξίνης, το οποίο εξακολουθεί να δεσμεύεται με LPS, αλλά δεν προκαλεί θανάτωση του βακτηριακού κυττάρου. Ωστόσο, εξακολουθεί να αυξάνει τη διαπερατότητα του κυτταρικού τοιχώματος για άλλα αντιβιοτικά, υποδεικνύοντας ότι εξακολουθεί να προκαλεί κάποιο βαθμό αποσύνθεσης της μεμβράνης (Tsubery et al., 2002).



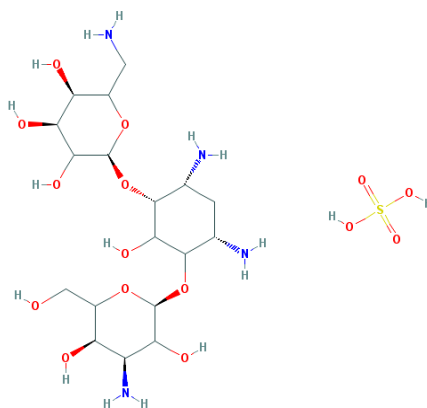
Εικόνα: χημικός τύπος θεικής πολυμυξίνης B (Pubchem ncbi.nlm.nih.gov., 2018b)

➤ Θεική Καναμυκίνη

Η θεική καναμυκίνη ανήκει στην ομάδα των αμινογλυκοσιδών και αποτελεί το θεικό άλας αντιβακτηριακών ουσιών που παράγονται κατά την ανάπτυξη επιλεγμένων στελεχών του *Streptomyces kanamyceticus*. Αποτελείται από ένα κύριο συστατικό την καναμυκίνη A με κύρια πρόσμειξη την καναμυκίνη B και σε ίχνη την καναμυκίνη C και D.

Σχετικά με την αντιβακτηριακή της δράση, τα Gram αρνητικά βακτήρια που παρουσιάζουν ευαισθησία στη καναμυκίνη είναι τα: *E. coli*, *Acinetobacter* spp., *Brucella* spp., *Neisseria* spp., *Serratia marcescens*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Hemophilus* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp. και αρκετά στελέχη του *Proteus*. Τα *Pseudomonas aeruginosa* και *Bacteroides* spp. είναι ανθεκτικά στην καναμυκίνη. Είναι επίσης δραστική έναντι ορισμένων *Mycoplasma* spp. και Gram θετικών βακτηρίων, ειδικά των *Staphylococcus pyogenes* και *Staphylococcus epidermidis*

Η καναμυκίνη χρησιμοποιείται μόνο όταν εμφανίζεται ανθεκτικότητα σε λιγότερο τοξικά αντιβιοτικά. Χρησιμοποιείται στην αντιμετώπιση σηψαιμιών από Gram αρνητικά βακτήρια (Gottrevitch et al., 1958; Bera et al., 2010)



Εικόνα: χημικός τύπος θεικής καναμυκίνης (Pubchem ncbi.nlm.nih.gov., 2018c)

Family	Species	Sterilizing/concentration	References/country
Calliphoridae	<i>Phormia regina</i> (Meigen, 1826)	Mercuric chloride (1:1,000), ethyl alcohol 25%, and hydrochloric acid 0.5%	Baer (1931)/EUA
	<i>C. putoria</i> (Wiedemann, 1818)	Formal 10% and sodium chloride 0.85% Sodium hypochlorite 0.5%, formaldehyde 1%, and farmaseptplus 1:4,000	Fine and Alexander (1934)/EUA Varzim (2005)/Brazil
	<i>C. megacephala</i> (Fabricius, 1794)	Glutaraldehyde 2% and Tween 20 5 ml	Dallavecchia et al. 2010, Dallavecchia, D.L. 2013/Brazil
	<i>Lucilia caesar</i> (Linnaeus, 1758)	Mercuric chloride (1:1,000), ethyl alcohol 25%, and hydrochloric acid 0.5%	Baer (1931)/EUA
	<i>L. sericata</i> (Meigen, 1826)	Formalin 5% and sodium hydroxide 1% Sodium sulphite 2.5% and formaldehyde 2.5% Ortophtaldeido/(unspecified)	Simmons (1934)/EUA Mumcuoglu et al. (1999)/Israel Contreras et al. (2005)/México
	<i>Lucilia cuprina</i> (Wiedemann, 1830)	Sodium hypochlorite 0.5% and formalin 10% Acetic acid and streptomycin Phenol 3% or sodium hypochlorite 0.5%	Figueroa et al. (2006)/Chile Kocisova et al. (2006)/Eslovaquia Sherman et al. (2007)/EUA
		Ultraviolet chlorhexidine and 70% alcohol	Mohd et al. (2005)/Malásia

Πίνακας: χημικά μέσα για την αποστείρωση ωών για MDT (Dallavecchia et al., 2014)

4.5.9.2 Έλεγχος της επιτυχίας της αποστείρωσης

Σε αυτό το σημείο θα πρέπει να τονιστεί ότι δεν θα πρέπει να παραλείπεται η επιβεβαίωση της επιτυχίας της αποστείρωσης. Για το λόγο αυτό λαμβάνεται δείγμα από τις προνύμφες λίγο μετά την εκκόλαψη και ακολουθεί ενοφθαλμισμός των θρεπτικών μέσων που έχουν επιλεγεί για τον έλεγχο ανάπτυξης αερόβιων, μικροαερόφιλων και αναερόβιων βακτηρίων (Baer, 1931; Dallavecchia et al., 2014). Η απουσία ή η ανάπτυξη μικροοργανισμών αξιολογείται μετά από 24 ή 48 h (Thyssen et al., 2013). Εν αναμονή των αποτελεσμάτων του ελέγχου στειρότητας, οι προνύμφες τοποθετούνται στο ψυγείο στους 4 °C προκειμένου να επιβραδυνθεί η ωρίμανσή τους. Η βιωσιμότητά τους στις συνθήκες αυτές διατηρείται για τουλάχιστον 5 ημέρες (Wolff και Hansson, 2005).

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η επούλωση των δερματικών πληγών συμβάλλει τα μέγιστα στην ομοίωση του οργανισμού και στην πρόληψη σημαντικών δερματικών και συστηματικών ασθενειών. Έλκωση μπορεί να προκληθεί από τραύμα, έγκαυμα, ισχυρή φλεγμονή είτε από λύση της συνεχείας του δέρματος λόγω στάσεως (κατάκλιση) (Rosique et al., 2015; Rowan et al., 2015).

Ο σακχαρώδης διαβήτης (Σ.Δ.) σχετίζεται με τη σημαντική παραγωγή νεκρωτικού ιστού που μπορεί να οδηγήσει σε μόλυνση του έλκους, αναστολή της επούλωσης έως και ακρωτηριασμό (Eming et al., 2014). Η αφαίρεση του σχηματιζόμενου νεκρωτικού ιστού γίνεται στην πράξη με συχνό χειρουργικό καθαρισμό ενώ προσπάθεια απομάκρυνσης των μικροβίων γίνεται με έκπλυση της πληγής και εφαρμογή αντιμικροβιακών-αντιβιοτικών ουσιών από το στόματος ή τοπικά (Hobizal και Wukich, 2012).

Για την αφαίρεση του νεκρωτικού ιστού, την καταπολέμηση σε πολλές περιπτώσεις των μολύνσεων αλλά και τη διέγερση της επουλωτικής δραστηριότητας, χρησιμοποιείται η μέθοδος εφαρμογής των προνυμφών της μυΐας *Lucilia (Phaenicia) sericata* (Diptera: Calliphoridae) απευθείας σε πληγές υπό το διεθνή όρο Maggot Debridement Therapy (MDT) (Grassberger et al., 2013). Η μέθοδος έχει πλέον καταξιωθεί διεθνώς με την αποδοχή της με κάποιες παραλλαγές σε Η.Π.Α. και Ευρώπη και θεωρείται ότι υπερέχει του χειρουργικού καθαρισμού (Food and Drug Administration, 2004; European Medicines Agency, 2010; Grassberger et al., 2013).

Η απομόνωση δραστικών ουσιών μέσω παραλαβής των εκκρίσεων/απεκκρίσεων της προνύμφης καθώς και μέσω εκχύλισης του οργανισμού μπορεί να οδηγήσει σε παραγωγή τοπικών δραστικών προϊόντων (Kahl et al., 2015). Τα σκευάσματα αυτά μπορούν να αποτελέσουν σημαντικά όπλα στην αντιμετώπιση των διαβητικών ελκών του άκρου ποδός καθώς και στην αντικατάσταση της εφαρμογής των ζωντανών προνυμφών επί της πληγής. Κρίνεται λοιπόν απαραίτητη η ανάπτυξη προτύπου διαβητικού μυός στο οποίο θα είναι δυνατή η συγκριτική μελέτη της δράσης των προνυμφών και των σκευασμάτων που προκύπτουν από αυτές. Αξιοσημείωτο είναι ότι ενώ έχει πραγματοποιηθεί ικανοποιητικός αριθμός κλινικών μελετών σχετικά με τις προνύμφες, δεν έχει αναπτυχθεί πρότυπο τέτοιων μελετών σε προκλινικό στάδιο. Σχετικές προκλινικές μελέτες δεν έχουν πραγματοποιηθεί σε μυς ενώ δεν έχει συγκριθεί πειραματικά και κλινικά σε ποια ηλικία η προνύμφη δίδει τον καλύτερο καθαρισμό του τραύματος - επούλωση.

Για τον ανωτέρω σκοπό πραγματοποιήθηκαν αρχικά 3 επαναληπτικές δοκιμασίες αποστείρωσης με πρώτο στόχο την παραγωγή αποστειρωμένων προνυμφών ακολουθώντας διεθνές πρωτόκολλο (IBS Newsletter #6, 2002). Έπειτα από κάθε δοκιμασία διενεργήθηκε έλεγχος για πιθανή ανάπτυξη μικροοργανισμών με βάση το ίδιο πρωτόκολλο. Στην 4^η και τελευταία δοκιμασία αποστείρωσης, ο έλεγχος της διαδικασίας πραγματοποιήθηκε με βάση τα πρότυπα της Ευρωπαϊκής Φαρμακοποιίας για τα στείρα προϊόντα (Ph. Eur. Sterility., 2005).

Μετά την ολοκλήρωση των διαδικασιών αποστείρωσης, πραγματοποιήθηκε πρόκληση Σ.Δ. σε άτριχους αρσενικούς μυς. Σκοπός του πειράματος αυτού είναι ο έλεγχος της δράσης των τριών προνυμφικών σταδίων (ηλικιών) της *L. sericata* στον καθαρισμό του νεκρωτικού ιστού και της συμβολής τους στην επούλωση του ελλείμματος των διαβητικών μυών. Προδοκιμές πραγματοποιήθηκαν σχετικά με την εφαρμογή επιθεμάτων με αποστειρωμένες προνύμφες και το αποτέλεσμα αξιολογήθηκε μετά το πέρας 24 h.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

5. Υλικά και Μέθοδοι

5.1 Προετοιμασία Υλικών για Δοκιμασίες Αποστείρωσης

5.1.1 Παρασκευή διαλύματος NaClO 0,05% (IBS Newsletter #6, 2002)

Υλικά	διάλυμα NaClO (active chlorine ≈11%, PENTA), απεσταγμένο H₂O (Τομέας Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων, Τμήμα Φαρμακευτικής, Ε.Κ.Π.Α.)
Σκεύη	πιπέτα ακριβείας (100-1000 μL), tip , ογκομετρικός κύλινδρος 100 mL, υδροβολέα 200 mL

- 910 μL NaClO (11%) προστίθενται με πιπέτα ακριβείας σε 200 mL απεσταγμένου H₂O. Το διάλυμα φυλάσσεται σε υδροβολέα.

5.1.2 Παρασκευή διαλύματος CH₂O 5% (IBS Newsletter #6, 2002)

Υλικά	υδατικό διάλυμα CH₂O 37% (CHEMCO), απεσταγμένο H₂O (Τομέας Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων, Τμήμα Φαρμακευτικής, Ε.Κ.Π.Α.)
Σκεύη	πιπέτα ακριβείας (100-1000 μL), tip , ογκομετρικός κύλινδρος 100 mL, υδροβολέα 200 mL

- 31,25 mL CH₂O (37%) προστίθενται σε 200 mL απεσταγμένου H₂O. Το διάλυμα φυλάσσεται σε υδροβολέα.

5.1.3 Παρασκευή διαλύματος θεικής Πολυμυξίνης Β (IBS Newsletter #6, 2002)

Υλικά	θεική πολυμυξίνη Β (Fagron Hellas), απεσταγμένο H₂O (Τομέας Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων, Τμήμα Φαρμακευτικής, Ε.Κ.Π.Α.), αλουμινόχαρτο
Σκεύη/Όργανα	σπάτουλα , ποτήρι ζέσεως 50 mL, σύριγγα 20 mL φίλτρα σύριγγας 0,20 μm (Chromafil [®] CA-20/25 (S), Macherey-Nagel), κωνικά σωληνάρια 1,5 mL τύπου Eppendorf, στατώ , ζυγός ακριβείας , κλίβανος ξηρής αποστείρωσης (Tau Steril 2000 Automatic), θάλαμος νηματικής ροής (BBS-V800 Vertical Laminar Flow Cabinet)

- 15 κωνικά σωληνάρια 1,5 mL τύπου Eppendorf αποστειρώνονται σε κλίβανο ξηρής αποστείρωσης στους 120 °C για 15 min.

- 200 mg θεικής πολυμυξίνης Β διαλύονται σε 20 mL απεσταγμένου H₂O.

- Ακολουθεί αποστείρωση μέσω φιλτραρίσματος (0,20 μm): το διάλυμα φέρεται στο θάλαμο νηματικής ροής, λαμβάνεται με σύριγγα των 20 mL και διαμοιράζεται στα αποστειρωμένα σωληνάρια. Σε κάθε ένα μοιράζεται περίπου 1,2 mL του αποστειρωμένου διαλύματος.
- Το διάλυμα παρασκευάζεται εντός του θαλάμου νηματικής ροής και μετά την πλήρωσή τους, τα σωληνάρια φυλάσσονται στην κατάψυξη (- 20 °C).

5.1.4 Παρασκευή διαλύματος θειικής Καναμυκίνης (IBS Newsletter #6, 2002)

Υλικά	ιδιοσκεύασμα θειικής καναμυκίνης 25% , 100 mL (Neocell Pharmaceuticals), απεσταγμένο H₂O (Τομέας Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων, Τμήμα Φαρμακευτικής, Ε.Κ.Π.Α., αλουμινόχαρτο
Σκεύη/Όργανα	ποτήρι ζέσεως 50 mL , ογκομετρική φιάλη 50 mL , σύριγγα 1 mL , σύριγγα 20 mL φίλτρα σύριγγας 0,20 μm (Chromafil [®] CA-20/25 (S), Macherey-Nagel), πιπέτα ακριβείας (100-1000 μL) , tip , κωνικά σωληνάρια 1,5 mL τύπου Eppendorf , στατώ , ζυγός ακριβείας , κλίβανος ξηρής αποστείρωσης (Tau Steril 2000 Automatic) , θάλαμος νηματικής ροής (BBS-V800 Vertical Laminar Flow Cabinet)

- 15 κωνικά σωληνάρια 1,5 mL τύπου Eppendorf αποστειρώνονται σε κλίβανο ξηρής αποστείρωσης στους 120 °C για 15 min.
- Διαθέτουμε ιδιοσκεύασμα 100 mL θειικής καναμυκίνης 25%. Κάθε 1 mL του ιδιοσκευάσματος περιέχει 250 mg θειικής καναμυκίνης.
- Με αποστειρωμένη σύριγγα λαμβάνεται 1 mL από το ιδιοσκεύασμα. Ακολουθεί αραιώση με απεσταγμένο H₂O σε ογκομετρική φιάλη των 50 mL. Από εκεί λαμβάνονται 320 μL με πιπέτα ακριβείας τα οποία προστίθενται σε 20 mL απεσταγμένου H₂O.
- Ακολουθεί αποστείρωση μέσω φιλτραρίσματος (0,20 μm): το διάλυμα φέρεται στο θάλαμο νηματικής ροής, λαμβάνεται με σύριγγα των 20 mL και διαμοιράζεται στα αποστειρωμένα σωληνάρια. Σε κάθε ένα μοιράζεται περίπου 1,2 mL του αποστειρωμένου διαλύματος.
- Το διάλυμα παρασκευάζεται εντός του θαλάμου νηματικής ροής και μετά την πλήρωσή τους, τα σωληνάρια φυλάσσονται στην κατάψυξη (- 20 °C).

5.1.5 Παρασκευή αποστειρωμένου θρεπτικού μέσου για προνύμφες (IBS Newsletter #6, 2002)

Υλικά	βόειο συκώτι, άγαρ (Fisher BioReagents™), απεσταγμένο H ₂ O (Τομέας Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων, Τμήμα Φαρμακευτικής, Ε.Κ.Π.Α., διάλυμα θεικής Πολυμυξίνης Β, διάλυμα θεικής Καναμυκίνης, 100% υδρόφιλο βαμβάκι, γάζα μέτρου, αντικολλητικό χαρτί, αλουμινοχαρτο, λαστιχάκια, αυτοκόλλητη ταινία (δείκτης υγρής αποστείρωσης), Parafilm “M”
Σκεύη/Όργανα	μαχαίρι, ξύλινη σπάτουλα, μεταλλικό κουτάλι, ψαλίδι, πλαστικό πιάτο, πλαστικό μπολ, ποτήρι ζέσεως 250 mL, 2 κωνικές φιάλες 250 mL, πιπέτα ακριβείας (100-1000 µL), τίρ, πλαστικά αποστειρωμένα τρυβλία Petri 9 cm, ζυγός, μπλέντερ (Multi Moulinette mini-chopper, Moulinex®), θερμαινόμενος μαγνητικός αναδευτήρας, μαγνήτης ανάδευσης PTFE, αυτόκαυστο (Autoclave Mini, PBI), κλίβανος ξηρής αποστείρωσης (Tau Steril 2000 Automatic), θάλαμος νηματικής ροής (BBS-V800 Vertical Laminar Flow Cabinet)

- Τα διαλύματα των αντιβιοτικών (θεική Πολυμυξίνη Β και θεική Καναμυκίνη) παραλαμβάνονται από τους - 20 °C και αφήνονται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Θα χρειαστεί 1 mL από κάθε διάλυμα για κάθε 100 mL θρεπτικού μέσου.

- Τίρ για πιπέτα ακριβείας εισάγονται στον κλίβανο ξηρής αποστείρωσης για 20 min στους 125 °C.

- Μετά από καλή έκπλυση με απεσταγμένο H₂O, απομάκρυνση λίπους και ινών και ομογενοποίηση σε μπλέντερ, λαμβάνονται 100 g ομογενοποιημένου βόειου συκωτιού.

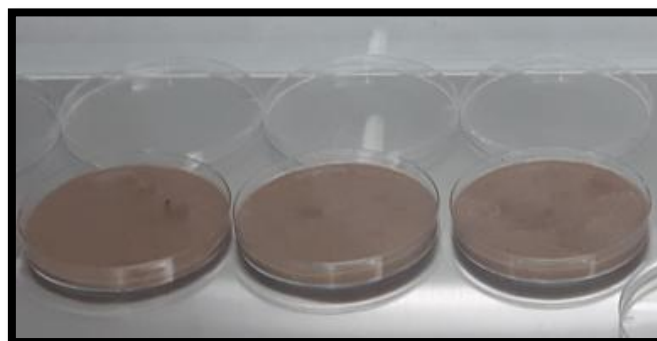
- Σε ποτήρι ζέσεως των 250 mL, προστίθενται 126,3 g απεσταγμένου H₂O. Στη συνέχεια, προστίθεται το άγαρ σε ποσοστό 3,5% (σε αυτήν την περίπτωση 4,42 g). Ακολουθεί θέρμανση στους 88 °C υπό ανάδευση για περίπου 15 min μέχρι να διαλυθεί το άγαρ στο νερό. Έπειτα προστίθεται το ομογενοποιημένο συκώτι και το μίγμα αναδεύεται καλά με σπάτουλα. 100 mL μέσου μεταφέρονται σε κάθε μία από τις δύο κωνικές φιάλες των 250 mL (είναι σημαντικό να μη γεμίζονται πάνω από τη μέση πριν την εισαγωγή στο αυτόκαυστο). Οι κωνικές πωματίζονται με βαμβάκι τυλιγμένο σε γάζα και το στόμιο καλύπτεται με αντικολλητικό χαρτί.

Επάνω στο χαρτί επικολλάται η ταινία με το δείκτη αποστείρωσης και τελικά εισάγονται στο αυτόκαυστο για 20 min στους 121 °C.



Εικόνα: κωνικές με μέσο πριν την εισαγωγή στο αυτόκαυστο

- Μετά το πέρας του χρόνου αποστείρωσης, οι κωνικές με το μέσο εισάγονται στο θάλαμο νηματικής ροής έως ότου η θερμοκρασία τους πέσει περίπου στους 45 °C προκειμένου να προστεθούν τα διαλύματα των αντιβιοτικών.
- Το μέσο με τα αντιβιοτικά διαμοιράζεται σε τρυβλία Petri και αφήνεται να πήξει. Μετά την πήξη του θρεπτικού μέσου, τα τρυβλία Petri σφραγίζονται με Parafilm και φυλάσσονται στο ψυγείο (4 °C) όπου μπορούν να διατηρηθούν για 2-3 εβδομάδες.



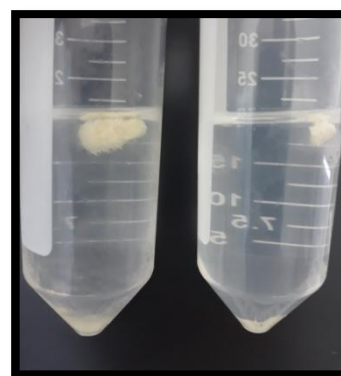
Εικόνα: τρυβλία με θρεπτικό μέσο και αντιβιοτικά

5.2 Διαδικασίες για την παραγωγή αποστειρωμένων προνυμφών

5.2.1 Πρωτόκολλο λήψης ωών της μυΐας *L. sericata*

Υλικά	ωά <i>L. sericata</i> (Θερμοκήπιο Εντομολογίας, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών), απεσταγμένο H₂O (Τομέας Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων, Τμήμα Φαρμακευτικής, Ε.Κ.Π.Α.
Σκεύη	κωνικά σωληνάρια φυγοκέντρου (Thermo Scientific™ Nunc™) 50 mL, ισοθερμική τσάντα, παγοκύστη

Στο Θερμοκήπιο Εντομολογίας (25±5 °C, 65±5% RH) του εργαστηρίου Γεωργικής Ζωολογίας και Εντομολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, μετά την εναπόθεσή τους από τα ενήλικα έντομα σε νοπό βόειο συκώτι, τα ωά συλλέγονται με τη βοήθεια λαβίδας και πινέλου. Στη συνέχεια τοποθετούνται σε κωνικό σωληνάριο φυγοκέντρου 50 mL περιέχον 20 mL απεσταγμένου H₂O. Το νερό προστατεύει τα ωά από τους κραδασμούς κατά τη μεταφορά και ταυτόχρονα διαλύει τη βλέννα μέσω της οποίας βρίσκονται ενωμένα σε συστάδες. Ο περιέκτης κατά τη διάρκεια της μεταφοράς στο τμήμα Φαρμακευτικής του Ε.Κ.Π.Α., τοποθετείται σε ισοθερμική τσάντα με μία παγοκύστη ώστε να αποφευχθεί ενδεχόμενη εκκόλαψη των ωών. Η καταγραφή του αριθμού των ωών που λαμβάνονται δεν είναι δυνατή. Εκτιμάται ότι πρόκειται για μερικές εκατοντάδες.



Εικόνα: συστάδες ωών σε κωνικό σωληνάριο με απεσταγμένο H₂O

5.2.2 Πρωτόκολλο αποστείρωσης των ωών (IBS Newsletter #6, 2002)

Υλικά	διάλυμα NaClO 0,05%, διάλυμα CH ₂ O 5%, Water for Injection, τρυβλία Petri με αποστειρωμένο θρεπτικό μέσο για προνύμφες, διηθητικό χαρτί, αντικολλητικό χαρτί, αλουμινόχαρτο, λαστιχάκια, αυτοκόλλητη ταινία (δείκτης υγρής αποστείρωσης), Parafilm “M”
Σκευή/Όργανα	συσκευή ορού, λαβίδες, ψαλίδι, γυάλινες πιπέτες Pasteur και φούσκες πλήρωσεως, χωνί Büchner, κωνική φιάλη διήθησης, πώμα σιλικόνης, ποτήρι ζέσεως 250 mL, αντλία κενού, επωαστικός κλίβανος (UM 200, Memmert), αυτόκαυστο (Autoclave Mini, PBI), κλίβανος ξηρής αποστείρωσης (Tau Steril 2000 Automatic), θάλαμος νηματικής ροής (BBS-V800 Vertical Laminar Flow Cabinet)

- Το διηθητικό χαρτί και οι φούσκες πλήρωσεως για τις πιπέτες Pasteur εισάγονται στο αυτόκαυστο για 20 min στους 121 °C.
- Οι λαβίδες, οι γυάλινες πιπέτες Pasteur, το χωνί Büchner, η κωνική φιάλη διήθησης και το ποτήρι ζέσεως 250 mL εισάγονται στον κλίβανο ξηρής αποστείρωσης για 90 min στους 180 °C.
- Τα μη αποστειρωμένα ωά βρίσκονται σε κωνικό σωληνάριο φυγοκέντρου 50 mL περιέχον 20 mL απεσταγμένου H₂O. Το H₂O απομακρύνεται με προσοχή με γυάλινη πιπέτα Pasteur και στο σωληνάριο εισάγεται διάλυμα NaClO 0,05% q.s. 35 mL. Ακολουθεί ανακίνηση για 13 min ώστε να ξεκολλήσουν τα ωά και αναμονή για 1 min ώστε να επέλθει καθίζηση.
- Το σωληνάριο εισάγεται στο θάλαμο νηματικής ροής και το διάλυμα NaClO απομακρύνεται όπως προηγουμένως στο ποτήρι ζέσεως 250 mL. Στη συνέχεια προστίθεται διάλυμα CH₂O 5% q.s. 35 mL και το σωληνάριο ανακινείται για 10 min.
- Τα ωά διηθούνται υπό κενό και εκπλένονται καλά με Water for Injection (WFI). Η διήθηση συνεχίζεται έως ότου απομακρυνθούν όλα τα υγρά και τα ωά στεγνώσουν καλά.
- Το αποστειρωμένο θρεπτικό μέσο για προνύμφες (τρυβλία Petri 9 cm) εισάγεται στο θάλαμο νηματικής ροής και τεμαχίζεται με αποστειρωμένη λαβίδα ώστε να επιτραπεί η διείσδυση των προνυμφών σε αυτό όταν εκκολαφθούν.
- Τα ωά τοποθετούνται στο θρεπτικό μέσο με αποστειρωμένη λαβίδα, το τρυβλίο σφραγίζεται με Parafilm και εισάγεται στον επωαστικό κλίβανο (37 °C).

5.3 1^η, 2^η και 3^η δοκιμασία αποστείρωσης

- Λήφθηκαν 2 κωνικά σωληνάρια με ωά από το Γεωπονικό Πανεπιστήμιο όπως περιγράφεται στην υποενότητα 5.2.1.
- Για το σωληνάριο 1 ακολουθήθηκε η διαδικασία αποστείρωσης που περιγράφεται στην υποενότητα 5.2.2 και τα ωά διαμοιράστηκαν σε 3 τρυβλία Petri 9 cm (για λόγους επαναληψιμότητας) με αποστειρωμένο θρεπτικό μέσο για προνύμφες που είχε παρασκευαστεί όπως περιγράφεται στην υποενότητα 5.1.5 (Dallavecchia et al., 2014).

Τα τρυβλία επισημάνθηκαν ως (A), (B), (C) και περιείχαν από 50 περίπου προνύμφες έκαστο.

- Για το σωληνάριο 2 δεν ακολουθήθηκε διαδικασία αποστείρωσης και μία συστάδα ωών τοποθετήθηκε σε 1 τρυβλίο Petri 9 cm με αποστειρωμένο θρεπτικό μέσο για προνύμφες που είχε παρασκευαστεί όπως περιγράφεται στην υποενότητα 5.1.5 με τη διαφορά ότι στο μέσο αυτό δεν έγινε προσθήκη των διαλυμάτων θειικής Πολυμυξίνης Β και θειικής Καναμυκίνης (Wolff και Hansson, 2005). Το τρυβλίο επισημάνθηκε ως (+) και είχε το ρόλο του θετικού control κατά τη διαδικασία του συγκριτικού ελέγχου της αποστείρωσης.

- Στις δοκιμασίες αποστείρωσης 1, 2 και 3 η λήψη του δείγματος από τα τρυβλία για τη διεξαγωγή του ελέγχου στειρότητας έγινε σε διαφορετικά χρονικά σημεία μετά την εκκόλαψη των ωών έτσι ώστε να ληφθούν πληροφορίες για το χρονικό διάστημα κατά το οποίο η στειρότητα των προνυμφών διατηρείται, επομένως είναι κατάλληλες για χρήση. Έτσι δείγμα λήφθηκε 20 h, 8 h και 4 h μετά την εκκόλαψη των ωών αντίστοιχα, και ακολούθησε έλεγχος σε:

- αιματούχο άγαρ
- σοκολατόχρωμο άγαρ και
- θειογλυκολικό ζωμό (IBS Newsletter #6, 2002)

- Ακόμη, χρησιμοποιήθηκε από ένα τρυβλίο/σωληνάριο για κάθε ένα από τα προαναφερθέντα μέσα στο οποίο δεν έγινε ενοφθαλμισμός δείγματος και είχε το ρόλο του αρνητικού control με επισήμανση (-). Τα υπόλοιπα έλαβαν επισήμανση αντίστοιχη με αυτήν του δείγματος με το οποίο ενοφθαλμίστηκαν/εμβολιάστηκαν ((A), (B), (C), (+)).

- Τα στερεά μέσα ελέγχθηκαν οπτικά για ανάπτυξη αποικιών και ο ζωμός για θολεροτητα ή/και ίζημα στις 24 h και 48 h οπότε και λήφθηκαν φωτογραφίες.

5.3.1 Αιματούχο Άγαρ

Χρησιμοποιήθηκαν έτοιμα στρωμένα τρυβλία 9 cm με αιματούχο άγαρ (Blood Agar (Horse Blood), Bioprepate®).

Το αιματούχο άγαρ αποτελεί μη εκλεκτικό θρεπτικό υλικό. Περιέχει ερυθρά αιμοσφαίρια και χρησιμοποιείται για την ανάπτυξη σχεδόν όλων των βακτηρίων (Tortora et al., 2007). Τα τρυβλία αποσφραγίζονται σε απόλυτα καθαρό χώρο (laminar flow) και τοποθετούνται στον επωαστικό κλίβανο για στέγνωμα για περίπου 30 min (Bioprepate®, 2018a).

- Το δείγμα ενοφθαλμίστηκε με βαμβακοφόρο συτλεό και τοποθετήθηκε στον επωαστικό κλίβανο στους 37 °C για επώαση σε αερόβιες συνθήκες.



Εικόνα: ανάπτυξη *Streptococcus pyogenes* σε blood agar (Bioprepate®, 2018a)

5.3.2 Σοκολατόχρωμο Άγαρ

Χρησιμοποιήθηκαν έτοιμα στρωμένα τρυβλία 9 cm με σοκολατόχρωμο άγαρ (Chocolate Agar (Horse Blood), Bioprepare[®]).

Το σοκολατόχρωμο άγαρ αποτελεί μη εκλεκτικό θρεπτικό υλικό. Περιέχει ερυθρά αιμοσφαίρια τα οποία έχουν υποστεί λύση. Χρησιμοποιείται για την ανάπτυξη απαιτητικών βακτηρίων με αυξημένες ανάγκες CO₂ όπως είναι τα *Haemophilus influenza* και *Neisseria meningitides* (Tortora et al., 2007; Bioprepare[®], 2018b). Τα τρυβλία αποσφραγίζονται σε απόλυτα καθαρό χώρο (laminar flow) και τοποθετούνται στον επωαστικό κλίβανο για στέγνωμα για περίπου 30 min (Bioprepare[®], 2018b).

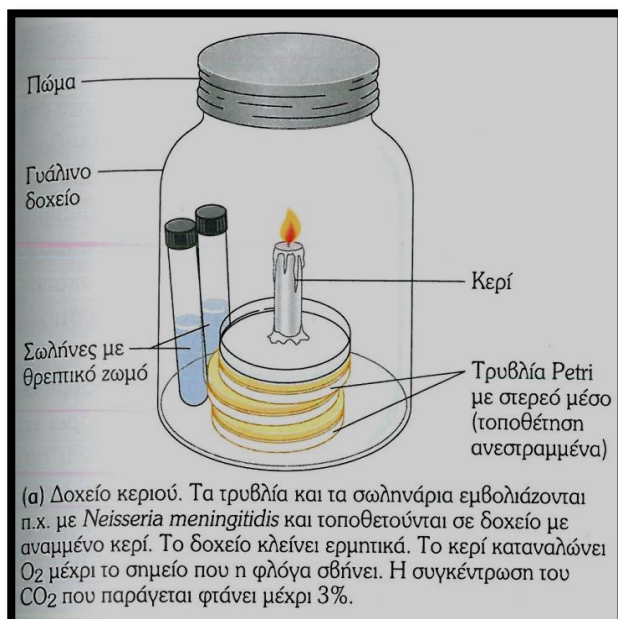
- Το δείγμα ενοφθαλμίστηκε με βαμβακοφόρο στυλεό και τοποθετήθηκε στον επωαστικό κλίβανο στους 37 °C για επώαση σε αερόβιο περιβάλλον εμπλουτισμένο με CO₂. Λόγω μη δυνατότητας πρόσβασης σε κλίβανο CO₂ προκρίθηκε η χρήση δοχείου κεριού (Tortora et al., 2007).

5.3.2.1 Δοχείο Κεριού – Επικύρωση Μεθόδου

Χρησιμοποιήθηκε γυάλινο δοχείο (3500 mL Borgonovo Ortes). Το στόμιο επικαλύφθηκε με μονωτική ταινία από PVC και το δοχείο έκλεισε ερμητικά. Εντός του δοχείου, μαζί με τα τρυβλία, τοποθετήθηκε αναμμένο κεριό ρεσώ (λευκό, μη αρωματικό) και βαμβάκι εμποτισμένο με απεσταγμένο H₂O ως πηγή υγρασίας.

Για την επικύρωση της μεθόδου, πριν την 1^η δοκιμασία αποστείρωσης, το δοχείο εστάλη στο ινστιτούτο Pasteur όπου 2 τρυβλία με σοκολατόχρωμο άγαρ ενοφθαλμίστηκαν με δείγμα καθαρής καλλιέργειας *Neisseria gonorrhoeae*. Τα τρυβλία τοποθετήθηκαν εντός του δοχείου και επώαστηκαν στους 37 °C. Η ανάπτυξη του γονοκόκκου αξιολογήθηκε 24 h αργότερα.

Στην αριστερή εικόνα παρουσιάζεται η αρχή λειτουργίας του δοχείου κεριού:



Εικόνα: δοχείο κεριού (Tortora et al., 2007)

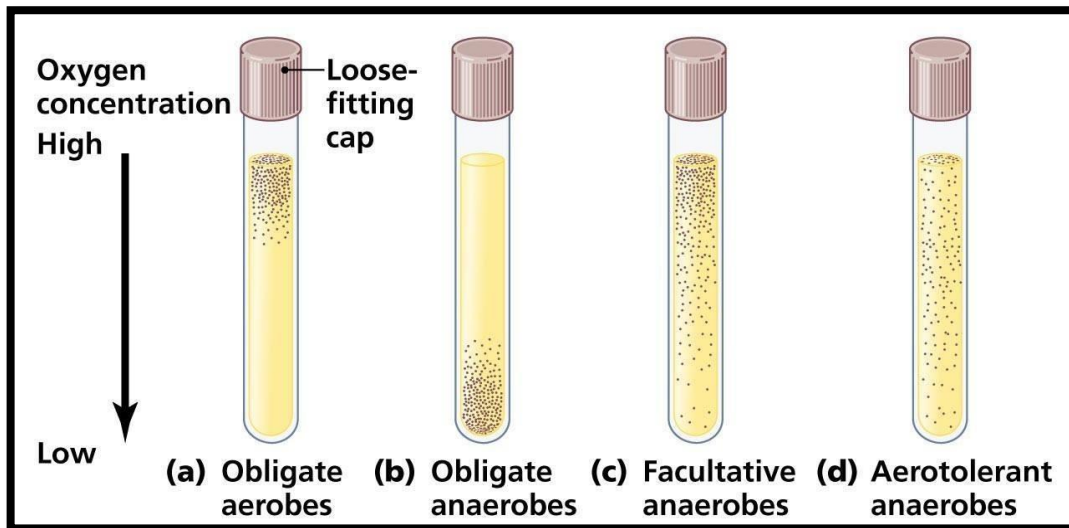


Εικόνα: το δοχείο κεριού που χρησιμοποιήθηκε

5.3.3 Θειογλυκολικός Ζωμός

Χρησιμοποιήθηκαν φιαλίδια με 100 mL θειογλυκολικού ζωμού (Thioglycollate Medium (Brewer), Bioprep[®]).

Ο θειογλυκολικός ζωμός χρησιμοποιείται για την καλλιέργεια αερόβιων, μικροαερόφιλων και αναερόβιων μικροβίων (Bioprep[®], 2018c). Το θειογλυκολικό νάτριο είναι ένας αναγωγικός παράγοντας που αποτρέπει τη συσσώρευση των υπεροξειδίων, τα οποία είναι θανατηφόρα για μερικούς μικροοργανισμούς. Επίσης, το μπλε του μεθυλενίου χρησιμοποιείται ως δείκτης οξειδοαναγωγής, ο οποίος γίνεται μπλε όταν οξειδώνεται και άχρωμος όταν ανάγεται. Η μικρή ποσότητα άγαρ υποβοηθά στη διατήρηση χαμηλού οξειδοαναγωγικού δυναμικού με σταθεροποίηση του υλικού καλλιέργειας έναντι ρευμάτων συναγωγής, διατηρώντας έτσι την αναεροβίωση στα χαμηλότερα βάθη του υλικού καλλιέργειας (Brewer, 1940; MacFaddin, 1985).



Εικόνα: βακτηριακή ανάπτυξη ανάλογα με τις απαιτήσεις σε οξυγόνο (Rijal, 2016)

Υλικά	θειογλυκολικός ζωμός (φιαλίδιο 100 mL, Bioprep [®]), αλουμινόχαρτο, Parafilm "M"
Σκεύη/Όργανα	γυάλινα σωληνάρια, πιπέτα ακριβείας (100-1000 μL), τίρ , κλίβανος ξηρής αποστείρωσης (Tau Steril 2000 Automatic), θάλαμος νηματικής ροής (BBS-V800 Vertical Laminar Flow Cabinet)

- Τα γυάλινα σωληνάρια εισάγονται στον κλίβανο ξηρής αποστείρωσης για 120 min στους 180 °C.
- Τίρ για πιπέτα ακριβείας εισάγονται στον κλίβανο ξηρής αποστείρωσης για 20 min στους 125 °C.
- Λίγο πριν τη χρήση το φιαλίδιο των 100 mL με θειογλυκολικό ζωμό αποσφραγίζεται σε απόλυτα καθαρό χώρο (laminar flow) και το υλικό διαμοιράζεται στα γυάλινα σωληνάρια. Στα διαθέσιμα σωληνάρια προστέθηκαν από 5 mL υλικού

αφού υπολογίστηκε ότι με την ποσότητα αυτή καλύπτεται το 1/3 της χωρητικότητάς τους.

- Τα σωληνάρια εμβολιάστηκαν με το προς εξέταση δείγμα, τοποθετήθηκαν με καλά κλεισμένο πώμα εντός του δοχείου κεριού μαζί με τα τρυβλία με το σοκολατόχρωμο άγαρ και επώαστηκαν στους 37 °C.

5.4 4^η δοκιμασία αποστείρωσης

5.4.1 Πρωτόκολλο συλλογής των προνυμφών από το θρεπτικό μέσο

Κατά την χρήση τους στην κλινική πράξη οι προνύμφες δεν πρέπει να εφαρμόζονται απευθείας από το θρεπτικό μέσο καθώς θα μεταφερθούν τα υπολείμματά του στην περιοχή του έλκους.

Υλικά	διάλυμα CH₂O 5%, Water for Injection, τρυβλία Petri με αποστειρωμένο θρεπτικό μέσο και προνύμφες, διηθητικό χαρτί, αντικολλητικό χαρτί, λαστιχάκια, αυτοκόλλητη ταινία (δείκτης υγρής αποστείρωσης), αλουμινόχαρτο
Σκεύη/Όργανα	μεταλλικός ηθμός, μπολ πορσελάνης, συσκευή ορού, λαβίδες, ψαλίδι, χωνί Büchner, κωνική φιάλη διήθησης, πώμα σιλικόνης, αντλία κενού, αυτόκαυστο (Autoclave Mini, PBI), κλίβανος ξηρής αποστείρωσης (Tau Steril 2000 Automatic), θάλαμος νηματικής ροής (BBS-V800 Vertical Laminar Flow Cabinet)

- Το διηθητικό χαρτί εισάγεται στο αυτόκαυστο για 20 min στους 121 °C.

- Ο μεταλλικός ηθμός, το μπολ πορσελάνης, οι λαβίδες, το χωνί Büchner και η κωνική φιάλη διήθησης εισάγονται στον κλίβανο ξηρής αποστείρωσης για 90 min στους 180 °C.

- Οι προνύμφες συλλέγονται από το θρεπτικό μέσο με αποστειρωμένη λαβίδα και τοποθετούνται σε μεταλλικό ηθμό. Ακολουθεί εμβάπτιση σε διάλυμα CH₂O για 7 min. Έπειτα διηθούνται υπό κενό και εκπλένονται καλά με WFI. Η διήθηση συνεχίζεται μέχρι να στεγνώσουν καλά.

Στο σημείο αυτό έγινε έλεγχος στειρότητας καθώς αποτελεί την τελευταία παρέμβαση πριν τη συσκευασία στον τελικό περιέκτη.

5.4.2 Προδοκιμαστικός έλεγχος στειρότητας προνυμφών που συλλέχθηκαν από το μέσο

- Λήφθηκε 1 κωνικό σωληνάριο με ωά από το Γεωπονικό Πανεπιστήμιο όπως περιγράφεται στην υποενότητα 5.2.1.

- Για το σωληνάριο 1 ακολουθήθηκε η διαδικασία αποστείρωσης που περιγράφεται στην υποενότητα 5.2.2. και περίπου 50 ωά τοποθετήθηκαν σε τρυβλίο Petri 9 cm με αποστειρωμένο θρεπτικό μέσο για προνύμφες που είχε παρασκευαστεί όπως περιγράφεται στην υποενότητα 5.1.5. Τα τρυβλίο επισημάνθηκε ως (Α).

- 4 h μετά την εκκόλαψη των ωών, ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο συλλογής των προνυμφών από το θρεπτικό μέσο όπως περιγράφεται στην υποενότητα 5.4.1. Το συγκεκριμένο χρονικό σημείο θεωρήθηκε το πλέον κοντινό στην κλινική εφαρμογή των προνυμφών (Mumcuoglu, 2001).

- Περίπου 30 προνύμφες συλλέχθηκαν και εμβολιάστηκαν σε σωληνάριο με θειογλυκολικό ζωμό 5 mL (A) (Thioglycollate Medium (Brewer), Bioprep[®]). Χρησιμοποιήθηκε σωληνάριο με θειογλυκολικό ζωμό 5 mL χωρίς δείγμα με προνύμφες ως αρνητικό control (-). Δε χρησιμοποιήθηκε θετικό control. Η επώαση έγινε στους 32 °C.

- Οπτικός έλεγχος και λήψη φωτογραφιών έγινε στις 24 h, 48 h, 1 εβδομάδα, 2 εβδομάδες.

5.4.3 Δοκιμασία ελέγχου στειρότητας προνυμφών που συλλέχθηκαν από το μέσο κατά τα πρότυπα της Ευρωπαϊκής Φαρμακοποιίας (Ph. Eur. Sterility, 2005)

- Ακολουθήθηκαν οι διαδικασίες που περιγράφηκαν στην υποενότητα 5.4.2 με την προσθήκη μη αποστειρωμένων προνυμφών που χρησιμοποιήθηκαν ως θετικό control (+).

- Ο αριθμός των προνυμφών προέκυψε μετά από ψύξη και ζύγιση σε ζυγό ακριβείας. Εκτιμήθηκε ότι περίπου 20 προνύμφες 2⁰⁰ instar ζυγίζουν περίπου 150 mg.

- Επελέγη η διαδικασία του απευθείας εμβολιασμού του υλικού στο θρεπτικό μέσο.

- Ο έλεγχος έγινε σε Thioglycollate W/Resazurin (USP) και Tryptone Soy Broth (USP) της Bioprep[®]. Και τα δύο μέσα παραλήφθηκαν σε σωληνάρια των 10 mL, έτοιμα προς χρήση.

- Το Thioglycollate W/Resazurin επώαστηκε στους 32 °C ενώ το Tryptone Soy Broth επώαστηκε στους 22 °C.

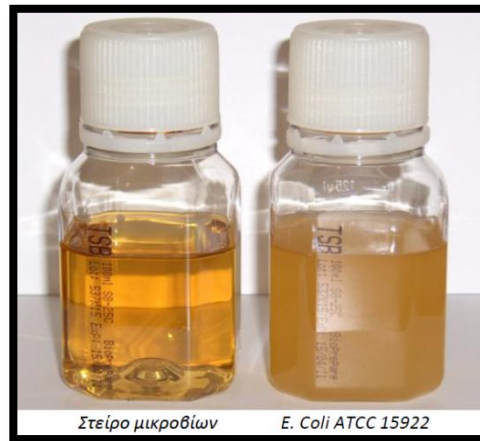
- Οπτικός έλεγχος και λήψη φωτογραφιών έγινε στις 24 h, 48 h, 72 h 1 εβδομάδα, 2 εβδομάδες.

➤ Thioglycollate W/Resazurin

Το Thioglycollate W/Resazurin χρησιμοποιείται για τις δοκιμές στειρότητας, σύμφωνα με τις προδιαγραφές της Ευρωπαϊκής και της Αμερικανικής Φαρμακοποιίας. Χρησιμοποιείται για την ανάπτυξη αναερόβιων, αερόβιων και μικροαερόφιλων βακτηρίων κατά τα πρότυπα του θειογλυκολικού ζωμού. Εδώ ως οξειδοαναγωγικός δείκτης χρησιμοποιείται η ρεσαζουρίνη η οποία παραμένει ροζ όταν οξειδώνεται και γίνεται άχρωμη όταν ανάγεται (Bioprep[®], 2018d).

➤ **Tryptone Soy Broth**

Το Tryptone Soy Broth (TSB) είναι ένας θρεπτικός ζωμός γενικού σκοπού ικανός για την ανάπτυξη ευρέος φάσματος βακτηριδίων και μυκήτων. Το μέσο συστήνεται από την Ευρωπαϊκή και την Αμερικανική Φαρμακοποιία για τη δοκιμή στειρότητας φαρμακευτικών προϊόντων (Bioprepate[®], 2018e).



Εικόνα: TSB (Bioprepate[®], 2018e)

5.5 Διαδικασία παραλαβής των εκκρίσεων/απεκκρίσεων (E/A) των προνυμφών (Kahl et al., 2015)

Υλικά	Water for Injection, τρυβλία Petri με αποστειρωμένες προνύμφες, Parafilm “M”
Σκεύη/Όργανα	συσκευή ορού, λαβίδες, ποτήρι ζέσεως 250 mL, πιπέτα ακριβείας (100-1000 μL), tip, πιπέτες Pasteur και φούσκες πλήρωσεως, ανακινητήρας οριζόντιας και κυκλικής κίνησης (Roto Mix Type 51300, Thermolyne), συσκευή φυγοκέντρωσης (202 MK Refrigerated, Sigma)

- Περίπου 450 αποστειρωμένες προνύμφες 2^{ου} και 3^{ου} instar παραλήφθηκαν από το θρεπτικό μέσο με βάση την υποενότητα 5.4.1.
- Αφότου τοποθετήθηκαν σε ποτήρι ζέσεως 250 mL, προστέθηκε 1 mL Water for Injection (WFI) και τέθηκαν υπό ήπια οριζόντια και κυκλική ανακίνηση για 1 h.
- Το ποτήρι ζέσεως καλύφθηκε με Parafilm γιατί οι προνύμφες εμφάνιζαν έντονη κινητικότητα.
- Μετά το πέρας της 1^{ης} ώρας προστέθηκε 1 mL WFI και το ποτήρι ζέσεως τοποθετήθηκε ξανά στον ανακινητήρα για 1 h. Η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε μέχρι την προσθήκη συνολικά 5 mL WFI.
- Το υγρό που υπήρχε στο ποτήρι μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας παραλήφθηκε με πιπέτα Pasteur και διαμοιράστηκε σε κωνικά σωληνάρια 1,5 mL τύπου Eppendorf.
- Ακολούθησε φυγοκέντρωση για 5 min στα 5350 rpm.

- Μετά τη φυγοκέντρωση παραλήφθηκε το υπερκείμενο υγρό το οποίο χρησιμοποιήθηκε σε πείραμα του Εργαστηρίου Μικρών Ζωικών Προτύπων για τη συγκριτική αξιολόγηση της δράσης των ενζύμων στον καθαρισμό του νεκρωτικού ιστού των πληγών.

5.6 Πείραμα Αξιολόγησης Επουλωτικής Δράσεως των Προνυμφών της Μυΐας *Lucilia sericata* σε Πληγές Διαβητικών Μυών

Το πείραμα βρίσκεται σε εξέλιξη. Στο σημείο αυτό θα παρουσιαστεί η διαδικασία με την οποία προκλήθηκε σακχαρώδης διαβήτης τύπου 1 στα ζώα. Η πρόκληση των ελλειμμάτων και η αξιολόγηση της επουλωτικής δράσης των προνυμφών δεν περιλαμβάνονται στην παρούσα εργασία.

5.6.1 Πειραματόζωα

Χρησιμοποιήθηκαν 41 άτριχοι αρσενικοί μύες τύπου SKH-hr1, ηλικίας άνω των 5 μηνών. Οι μύες προέρχονταν από το εργαστήριο Δερματοφαρμακολογίας-Κοσμητολογίας της Φαρμακευτικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών. Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων τα ζώα είχαν ελεύθερη πρόσβαση σε κατάλληλη τροφή για μύς και σε νερό δικτύου. Η θερμοκρασία στο χώρο πειραματισμού ήταν ελεγχόμενη και σταθερή μεταξύ 23°C και 24°C και η υγρασία πάνω από 30% (Νομοθεσία EL 25 BIO 07). Το πρωτόκολλο πλήρωσε τις προδιαγραφές με βάση την ελληνική και ευρωπαϊκή νομοθεσία και έλαβε τη σχετική άδεια (αριθ. πρωτ.: 2165/7-05-2018).

Πριν την έναρξη του πειράματος υπήρξε περίοδος εγκλιματισμού, στον θάλαμο πειραματισμού, των πειραματόζωων που χρησιμοποιήθηκαν, διάρκειας 10 ημερών. Στη συνέχεια, το δέρμα ελεγχόταν οπτικά για πληγές, ουλές και άλλα σημάδια που θα μπορούσαν ενδεχομένως να επηρεάσουν το πείραμα. Τέλος, παρακολουθούνταν η γενική κατάσταση της υγείας των ζώων και συγκεκριμένα των παρακάτω παραμέτρων:

- κατανάλωση τροφής
- συμπεριφορά

ώστε να κυμαίνονται στα ίδια επίπεδα χωρίς μεγάλες αποκλίσεις.

5.6.2 Πρωτόκολλο πρόκλησης σακχαρώδους διαβήτη τύπου 1

Υλικό: Zanosar[®] (1 g καθαρή στρεπτοζοτοκίνη (STZ), 220 mg άνυδρο κιτρικό οξύ)

- Και στους 41 μύς που επρόκειτο να χρησιμοποιηθούν έγινε ένεση διαλύματος STZ για 5 συναπτές ημέρες.

- Η τροφή αφαιρούνταν 4 h πριν τη στιγμή της ένεσης και το διάλυμα STZ παρασκευαζόταν καθημερινά πριν τις ενέσεις.

- Ζυγίζονταν κατάλληλη ποσότητα STZ (Zanosar[®]) και αραιωνόταν σε φυσιολογικό ορό 0,9% ώστε να παρασκευαστεί διάλυμα 10% w/v. Η δόση που αντιστοιχούσε σε κάθε μυ ήταν 40 mg/kg και για τους 41 μύς (π.χ. σε μυ βάρους 30 g αντιστοιχούσαν

120 μL, σε μν βάρους 35 g αντιστοιχούσαν 140 μL, σε μν βάρους 40 g αντιστοιχούσαν 160 μL κ.ο.κ.).

5.6.2.1 Επανάληψη ενέσεων διαλύματος STZ

4 εβδομάδες μετά την τελευταία ένεση STZ η διαδικασία επαναλήφθηκε για τους μυς που δεν ανέπτυξαν ικανοποιητικά επίπεδα γλυκόζης. Πιο συγκεκριμένα:

- Σε μυς με επίπεδα γλυκόζης < 200 mg/dL πραγματοποιήθηκε ένεση διαλύματος STZ για 3 συναπτές ημέρες. Η δόση που αντιστοιχούσε σε κάθε μν ήταν 50 mg/kg.

- Σε μυς με $200 \text{ mg/dL} \leq$ επίπεδα γλυκόζης $\leq 300 \text{ mg/dL}$ πραγματοποιήθηκε μία μόνο ένεση διαλύματος STZ. Η δόση που αντιστοιχούσε σε κάθε μν ήταν 50 mg/kg.

5.6.3 Πρωτόκολλο μέτρησης επιπέδων γλυκόζης στο αίμα

Χρησιμοποιήθηκε το σύστημα μέτρησης (ταινίες, μετρητής) γλυκόζης αίματος True Result twist της Nipro.

- Η τροφή αφαιρούνταν 6 h πριν τη μέτρηση των επιπέδων γλυκόζης.
- Με χειρουργικό ψαλίδι αφαιρούνταν με προσοχή ελάχιστο τμήμα από το άκρο της ουράς των μυών, ώστε να σχηματιστεί μικρή σταγόνα αίματος.
- Η ταινία μέτρησης εισαγόταν στην υποδοχή του μετρητή και μετά την εμφάνιση της κατάλληλης ένδειξης η σταγόνα αίματος τοποθετούνταν στην υποδοχή της ταινίας. Η ταινία μέτρησης λειτουργούσε ως σπόγγος τραβώντας το αίμα στο εσωτερικό της.
- Η μέτρηση ξεκινούσε αυτόματα μετά τη λήψη επαρκούς ποσότητας αίματος.
- Η μέτρηση ολοκληρωνόταν εντός ολίγων δευτερολέπτων και το αποτέλεσμα εμφανιζόταν αυτόματα στην οθόνη του μετρητή.

- 1^η μέτρηση: 14 ημέρες μετά την τελευταία ένεση του 1^{ου} κύκλου ενέσεων
- 2^η μέτρηση: 21 ημέρες μετά την τελευταία ένεση του 1^{ου} κύκλου ενέσεων
- 3^η μέτρηση: 30 ημέρες μετά την τελευταία ένεση του 1^{ου} κύκλου ενέσεων
- 4^η μέτρηση: 14 ημέρες μετά την τελευταία ένεση του 2^{ου} κύκλου ενέσεων (44 ημέρες μετά την τελευταία ένεση του 1^{ου} κύκλου ενέσεων)

5.7 Προδοκιμαστική εφαρμογή προνυμφών της μύϊας *L. sericata* σε μυς

5.7.1 Πειραματόζωα

Χρησιμοποιήθηκαν 3 άτριχοι αρσενικοί μύες, ηλικίας 5 μηνών, που προέρχονταν από διασταύρωση μυών των τύπων SKH-hr2 και ApoE. Οι μύες προέρχονταν από το εργαστήριο Δερματοφαρμακολογίας-Κοσμητολογίας της Φαρμακευτικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών και προορίζονταν για απόρριψη. Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων τα ζώα είχαν ελεύθερη πρόσβαση σε κατάλληλη τροφή για μυς και σε νερό δικτύου. Η θερμοκρασία στο χώρο πειραματισμού ήταν ελεγχόμενη και σταθερή μεταξύ 23°C και 24°C και η υγρασία πάνω από 30% (Νομοθεσία EL 25 BIO 07). Τόσο η διαδικασία της διασταύρωσης των ειδών όσο και η χρήση των ζώων που προήλθαν από τη διασταύρωση και προορίζονταν για απόρριψη έλαβαν τη σχετική άδεια (αριθ. πρωτ.: 4044/14-07-2017).

5.7.2 Πρωτόκολλο πρόκλησης πληγών

Χρησιμοποιήθηκε μίγμα αναισθητικών: υδροχλωρική ξυλαζίνη 23,32 mg/mL (Rompun®) 10 μL/ζώο και υδροχλωρική κεταμίνη 100 mg/mL (Imalgene 1000) 30 μL/ζώο.

- Ενέθηκαν ενδοπεριτοναϊκά 0,03 mL - 0,04 mL του μίγματος ανάλογα με το βάρος του μυός.
- Η περιοχή του τραύματος σχεδιάστηκε στην πλάτη του μυός σε απόσταση 2 cm από το ύψος του αυχένα. Χρησιμοποιήθηκε σφραγίδα με διαστάσεις 1,5 cm × 1,5 cm.
- Το τμήμα του δέρματος εντός της περιοχής σχεδίασης αφαιρέθηκε με χειρουργικό ψαλίδι.
- Το έλλειμμα καθαρίστηκε με φυσιολογικό ορό.

5.7.3 Δοκιμασία δημιουργίας επιθέματος και εφαρμογής προνυμφών

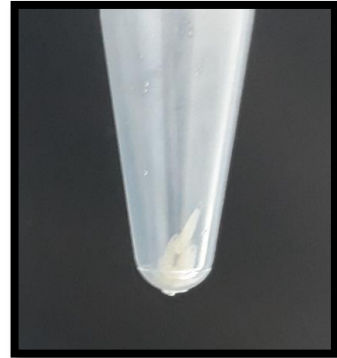
- Την Ημέρα 0 δημιουργήθηκαν ελλείμματα σε 3 μυς.
- Την Ημέρα 6 οι μυς αναισθητοποιήθηκαν, αφαιρέθηκε ο σχηματιζόμενος ξηρός νεκρωτικός ιστός με λαβίδα και στην περιοχή του ελλείμματος εφαρμόστηκαν προνύμφες σε ελεύθερη επαφή με τον πυθμένα του έλκους όπως περιγράφεται παρακάτω.

Ακολουθήθηκε γνωστή μέθοδος επίθεσης από την οποία δε χρησιμοποιήθηκε το υδροκολλοειδές επίθεμα γιατί θεωρήθηκε ότι θα επιβαρύνει σε σημαντικό βαθμό τους μυς (Sherman, 1997; Mumcuoglu et al., 1999).

Υλικά	αποστειρωμένες προνύμφες σε κωνικά σωληνάρια 1,5 mL τύπου Eppendorf, μεταξωτή ταινία (Durapore™ 2,5 cm, 3M), λεπτό υφασμάτινο πλέγμα, ημιδιαπερατή κολλητική διαφανής μεμβράνη (Tegaderm™, 3M), αποστειρωμένα επιθέματα γάζας (LAMED), φυσιολογικός ορός, βαμβακοφόροι στυλεοί αποστειρωμένοι, λαβίδα, ψαλίδι
--------------	--

- Αποστειρωμένες προνύμφες 1^{οο} instar παραλήφθηκαν από το θρεπτικό μέσο με βάση την υποενότητα 5.4.1 και τοποθετήθηκαν σε κωνικά σωληνάρια 1,5 mL τύπου Eppendorf.

- Αποφασίστηκε να εφαρμοστούν 10 προνύμφες/μυ δεδομένου ότι τα ελλείμματα είχαν εμβαδόν 2,25 cm² αλλά ήταν επιφανειακά. Στην κλινική πράξη χορηγείται δόση 5-10 προνυμφών/ cm² (Choudhary et al., 2016).



Εικόνα: προνύμφες 1^{οο} instar έτοιμες για εφαρμογή

Στάδια δημιουργίας επιθέματος και εφαρμογής των προνυμφών

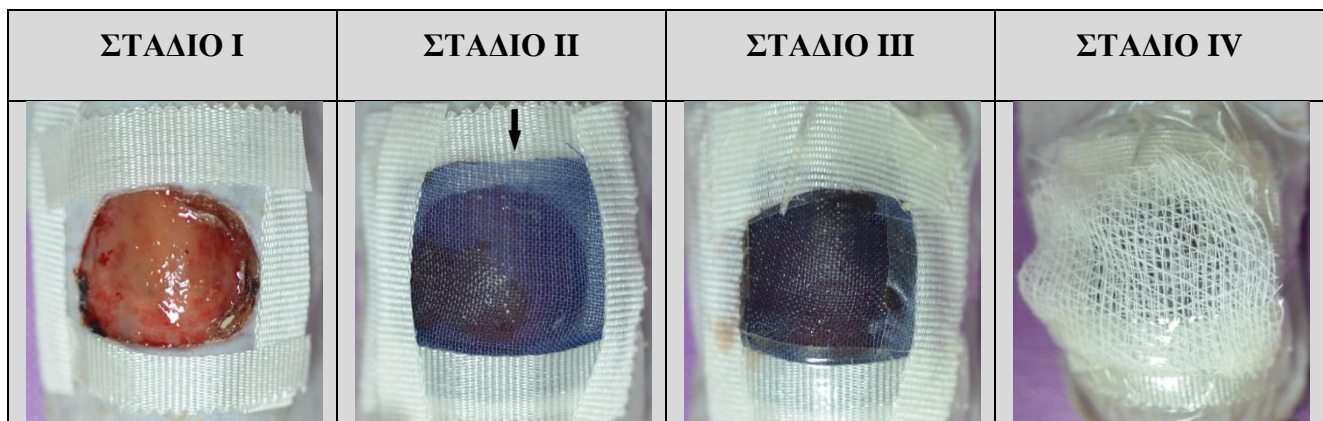
I. Μεταξωτή ταινία τοποθετήθηκε περιμετρικά της περιοχής του έλκους για την προστασία του υγιούς δέρματος από τις εκκρίσεις των προνυμφών.

II. Ο πυθμένας του έλκους καλύφθηκε με λεπτό υφασμάτινο πλέγμα το οποίο επικολλήθηκε με μεταξωτή ταινία επάνω στο 1^ο στρώμα ταινίας. Η μία πλευρά παρέμεινε ανοιχτή προκειμένου να εισαχθούν οι προνύμφες.

III. Ακολούθησε η εφαρμογή των προνυμφών και η ανοιχτή πλευρά έκλεισε με μεταξωτή ταινία. Οι 4 πλευρές του επιθέματος σφραγίστηκαν με διαφανή κολλητική μεμβράνη χωρίς να καλυφθεί όλη η επιφάνεια του πλέγματος για να επιτρέπεται η αναπνοή των προνυμφών.

IV. Το πλέγμα καλύφθηκε με λεπτό στρώμα γάζας για την απορρόφηση των παραγομένων υγρών χωρίς να παρεμποδίζεται η είσοδος του αέρα.

Στον πίνακα της επόμενης σελίδας παρουσιάζονται τα ανωτέρω στάδια κατά την εφαρμογή του στους μυς:



Πίνακας: απεικόνιση των σταδίων κατά τη δημιουργία επιθέματος για την εφαρμογή των προνυμφών στους μυς· στο **Στάδιο ΙΙ** φαίνεται η ανοιχτή πλευρά του πλέγματος (**βέλος**) από την οποία θα γίνει η εισαγωγή των προνυμφών

5.7.4 Εκτίμηση των επιθεμάτων και της δράσης των προνυμφών

- Ημέρα 6: λήφθηκε εικόνα του πυθμένα του έλκους μετά την αφαίρεση του ξηρού νεκρωτικού ιστού και πριν την εφαρμογή των προνυμφών
- Ημέρα 7: λήφθηκε εικόνα του πυθμένα του έλκους μετά την αφαίρεση των προνυμφών. Ακόμη, λήφθηκε εικόνα του επιθέματος και έγινε καταμέτρηση των προνυμφών που βρέθηκαν στην περιοχή 24 h μετά την εφαρμογή τους

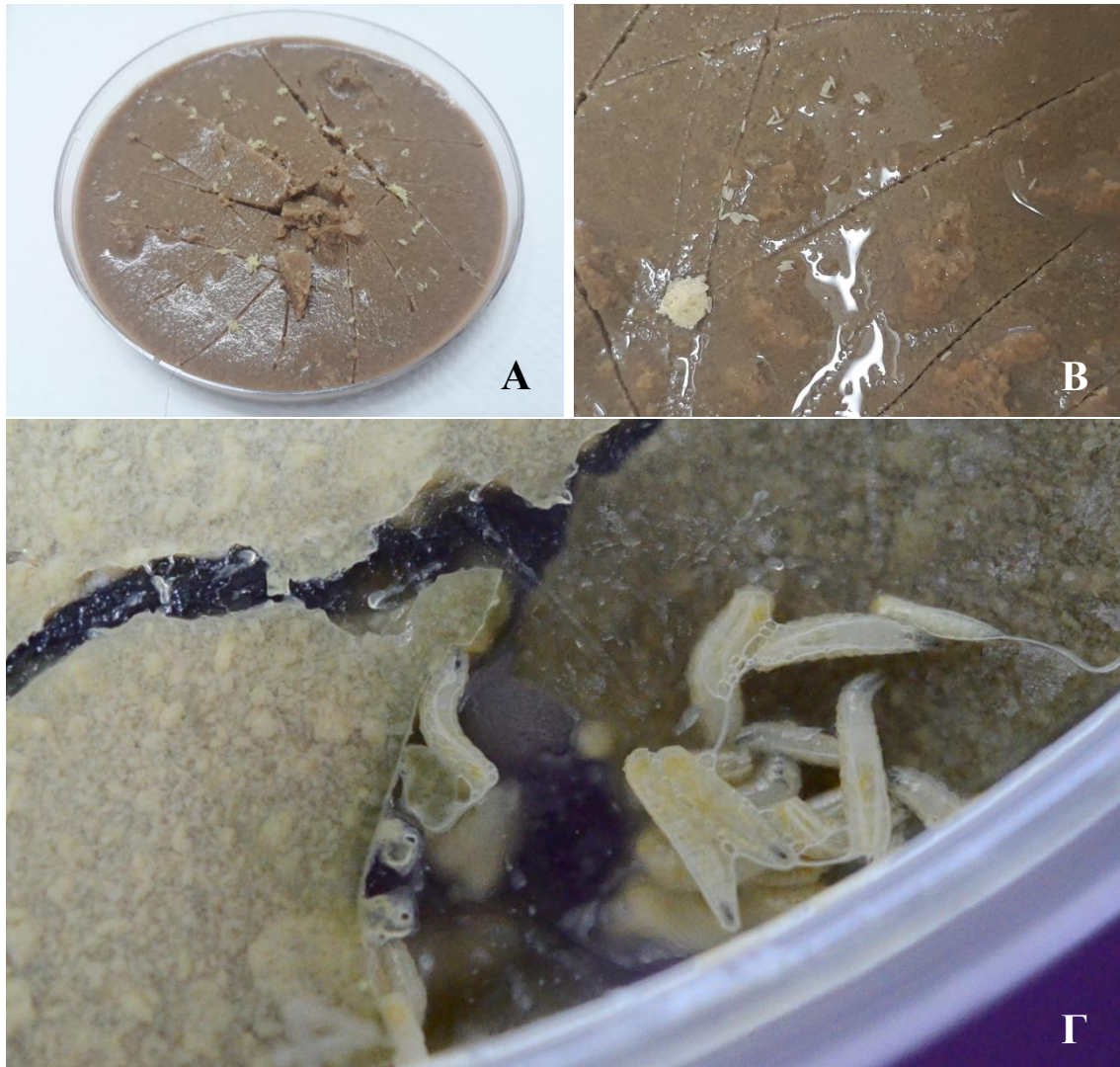
5.8 Φωτογραφικό Υλικό

- Από τα τρυβλία και τους μυς λήφθηκαν εικόνες με ψηφιακή φωτογραφική μηχανή Nikon D5100 με προσαρμοσμένο φακό Nikon Nikkor AF-S Micro 60 mm f/2.8 G ED, SWMED IF Aspherical.
- Από τα σωληνάρια λήφθηκαν εικόνες με τη χρήση κάμερας κινητού τηλεφώνου Samsung Galaxy J7 (2017) με χαρακτηριστικά 13 MP, f/1.7, autofocus, LED flash.
- Η επεξεργασία των εικόνων έγινε με το πρόγραμμα ImageJ (bundled with 64-bit Java 1.8.0_112).

5.9 Στατιστική επεξεργασία

Για τη διαχείριση και τη στατιστική ανάλυση των δεδομένων από τις μετρήσεις των επιπέδων γλυκόζης χρησιμοποιήθηκε το πακέτο στατιστικής ανάλυσης IBM SPSS Statistics 25.0.

5.10 Πίνακας εικόνων ωών και προνυμφών



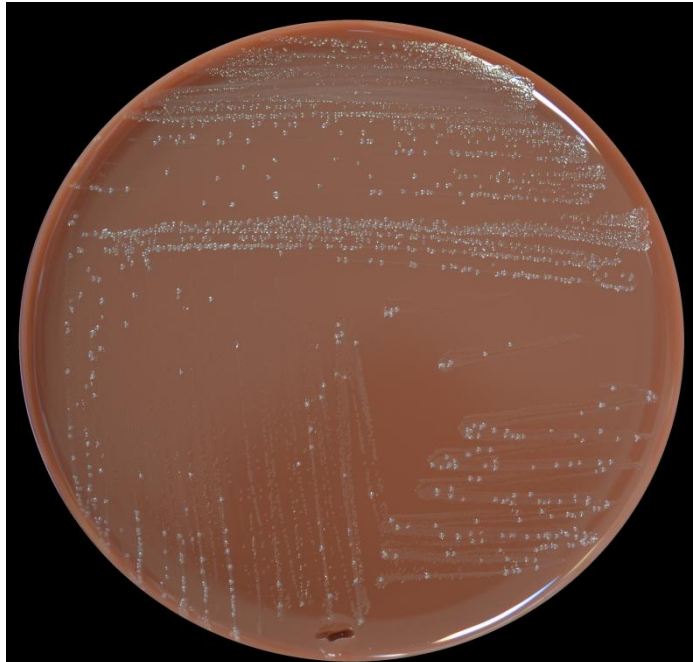
Πίνακας: διασπορά ωών σε θρεπτικό μέσο (τρυβλίο Petri 9 cm) (A), ωά σε συστάδα αλλά και κατά μόνας (B), προνύμφες σε θρεπτικό μέσο (Γ)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

6. Αποτελέσματα

6.1 Επικύρωση μεθόδου χρήσεως δοχείου κεριού

(A)



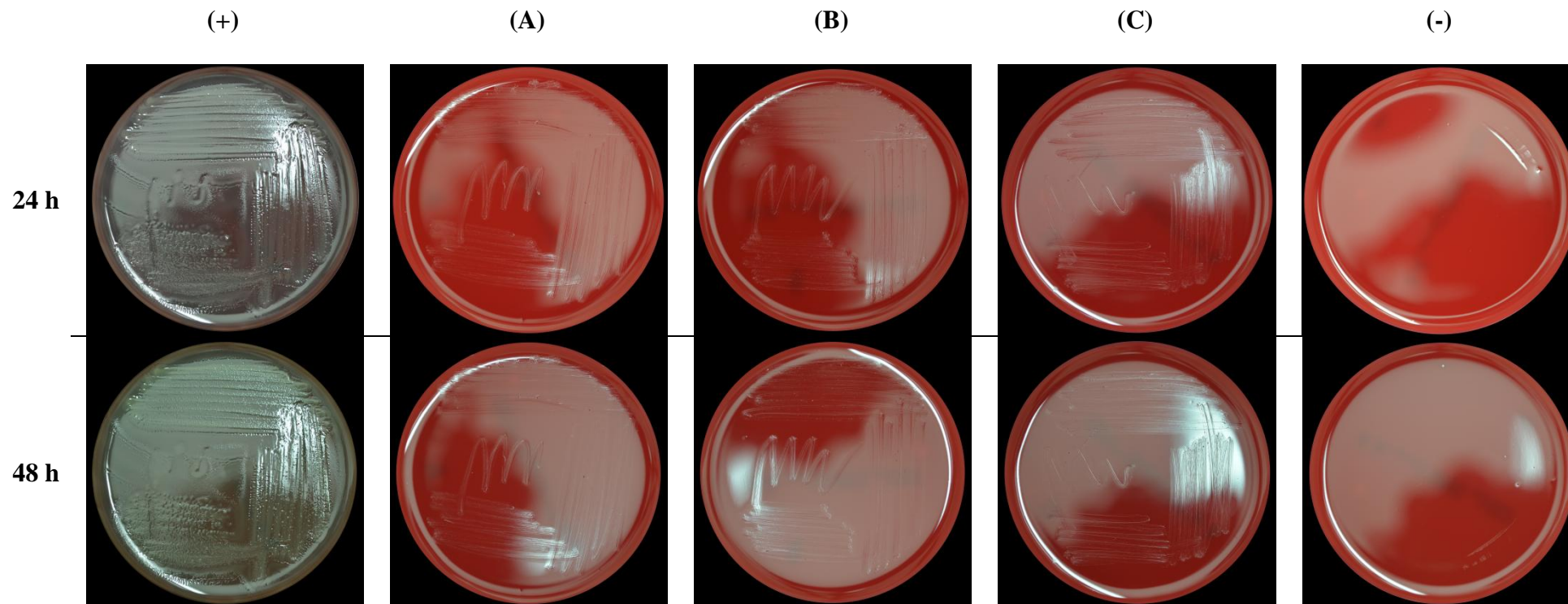
(B)



Πίνακας 6.1: καλλιέργεια *Neisseria gonorrhoeae* σε Σοκολατόχρωμο Άγαρ

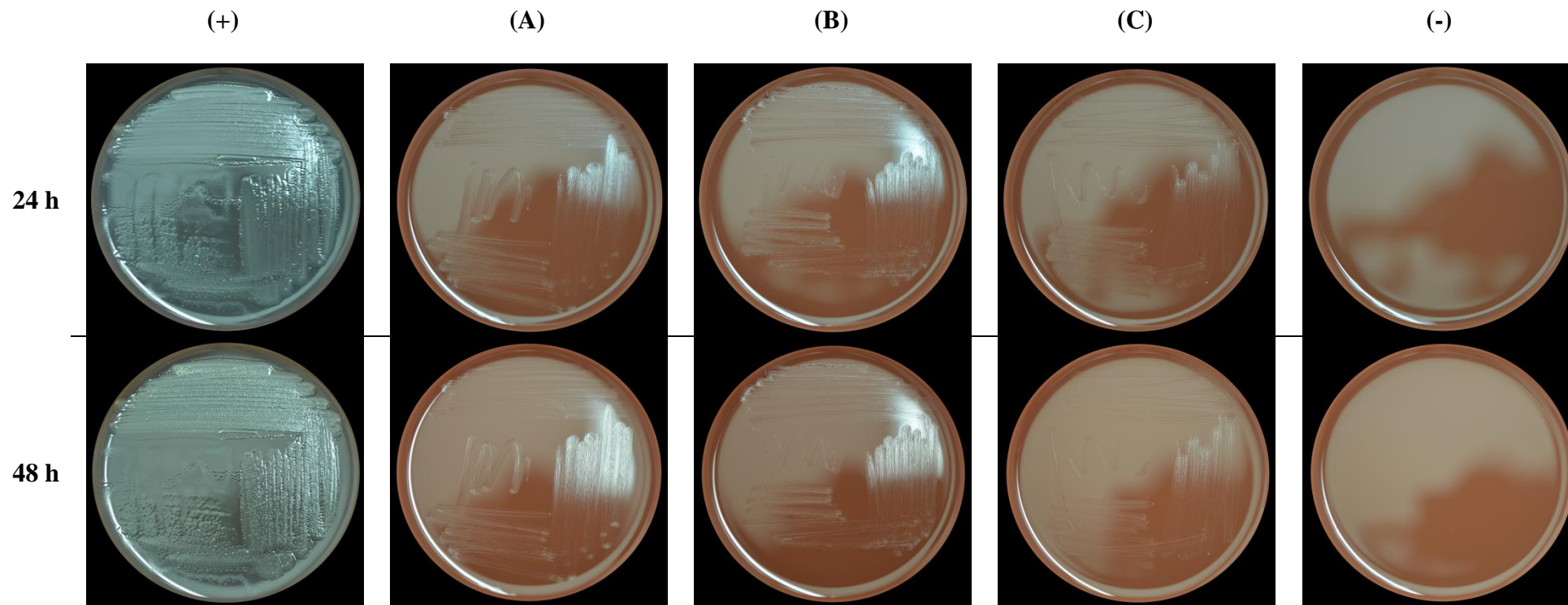
6.2 Έλεγχος 1^{ης} δοκιμασίας αποστείρωσης (20 h) μετά την εκκόλαψη

6.2.1 Αιματούχο Άγαρ



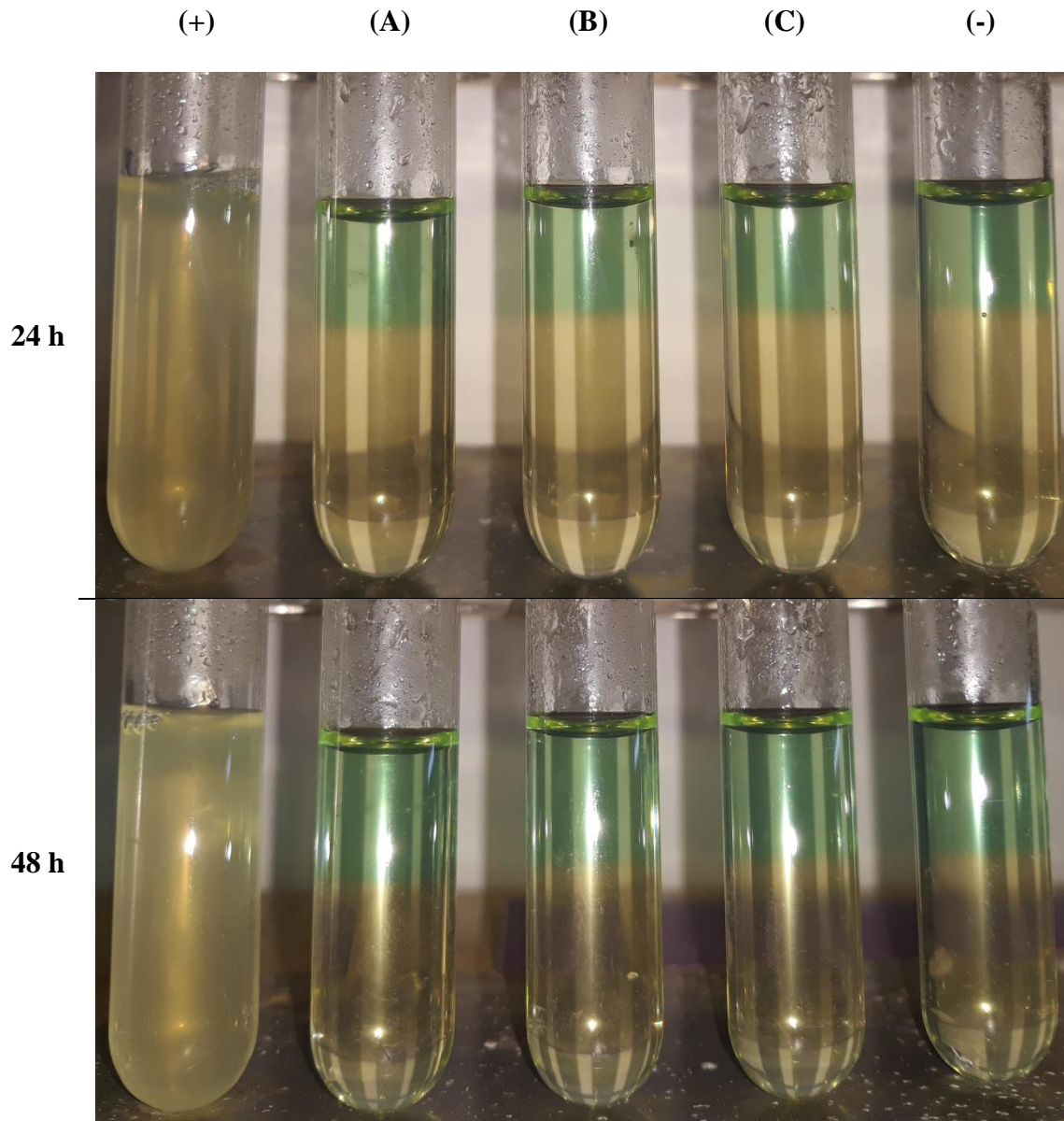
Πίνακας 6.2.1: δείγμα χωρίς τη διενέργεια αποστείρωσης (+)· δείγματα μετά τη διαδικασία της αποστείρωσης (A), (B), (C)· μη ενοφθαλμισμένο τρυβλίο (-)

6.2.2 Σοκολατόχρωμο Άγαρ



Πίνακας 6.2.2: δείγμα χωρίς τη διενέργεια αποστείρωσης (+)· δείγματα μετά τη διαδικασία της αποστείρωσης (A), (B), (C)· μη ενοφθαλισμένο τρυβλίο (-)

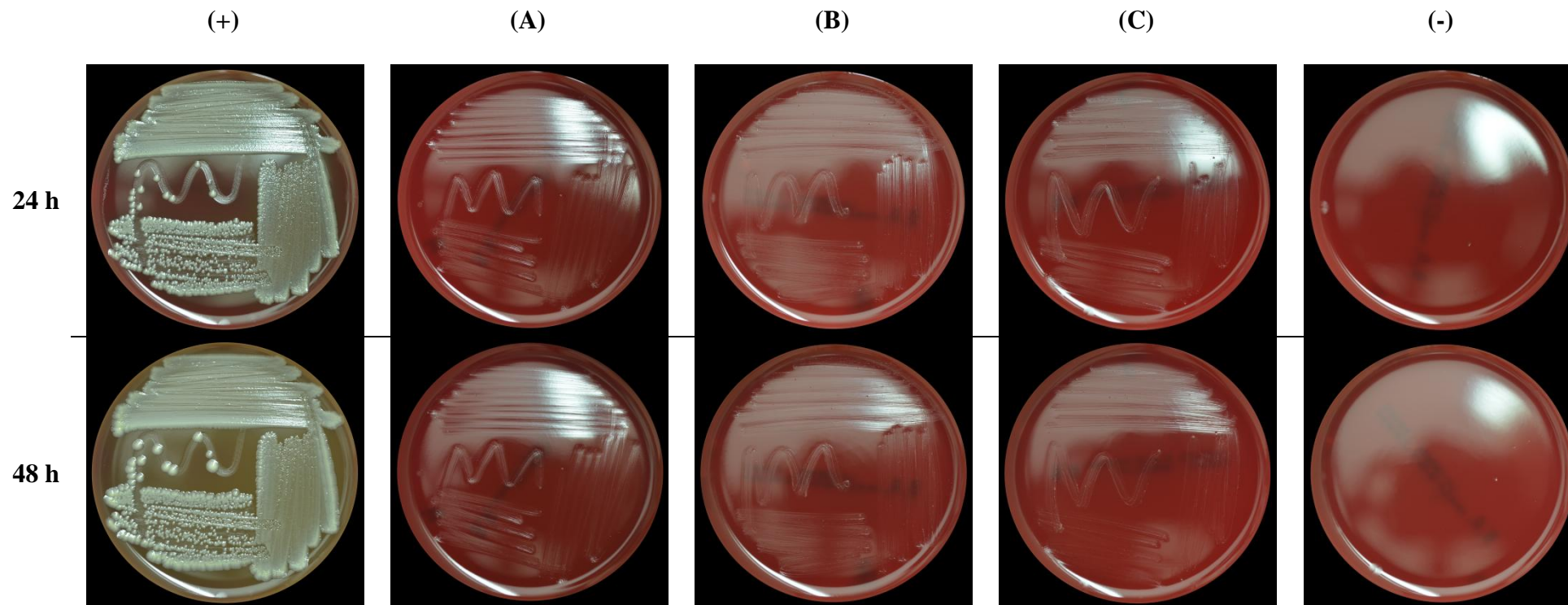
6.2.3 Θειογλυκολικός Ζωμός



Πίνακας 6.2.3: δείγμα χωρίς τη διενέργεια αποστείρωσης (+)· δείγματα μετά τη διαδικασία της αποστείρωσης (A), (B), (C)· μη εμβολιασμένο σωληνάριο (-)

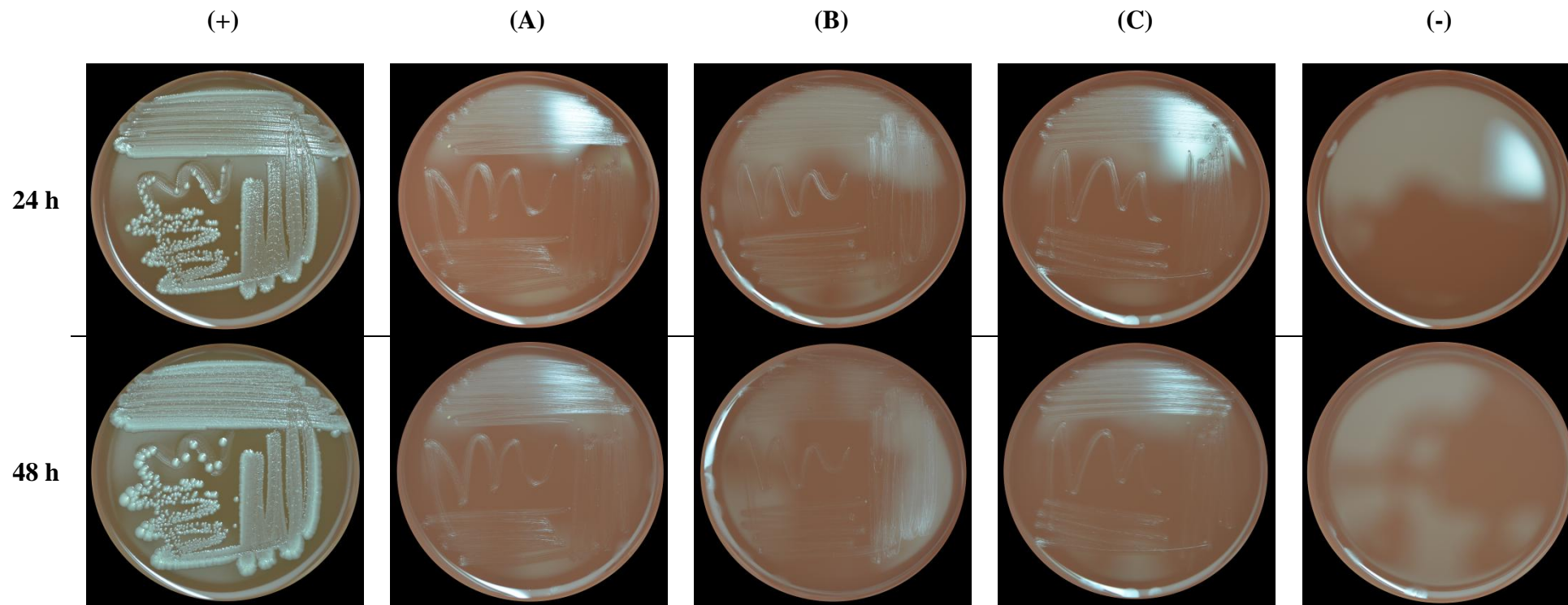
6.3 Έλεγχος 2^{ης} δοκιμασίας αποστείρωσης (8 h) μετά την εκκόλαψη

6.3.1 Αιματούχο Άγαρ



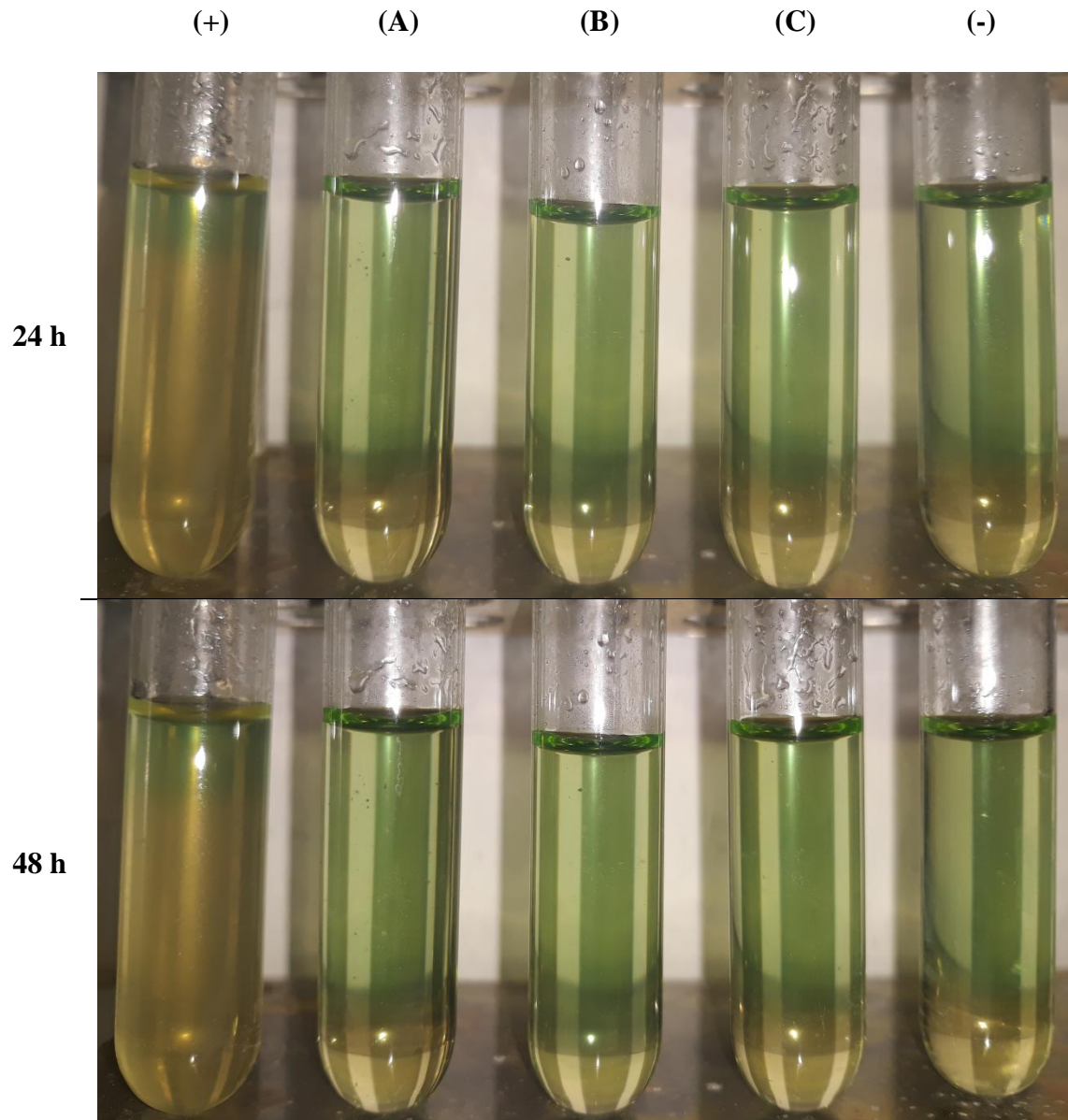
Πίνακας 6.3.1: δείγμα χωρίς τη διενέργεια αποστείρωσης (+)· δείγματα μετά τη διαδικασία της αποστείρωσης (A), (B), (C)· μη ενοφθαλμισμένο τρυβλίο (-)

6.3.2 Σοκολατόχρωμο Άγαρ



Πίνακας 6.3.2: δείγμα χωρίς τη διενέργεια αποστείρωσης (+)· δείγματα μετά τη διαδικασία της αποστείρωσης (A), (B), (C)· μη ενοφθαλμισμένο τρυβλίο (-)

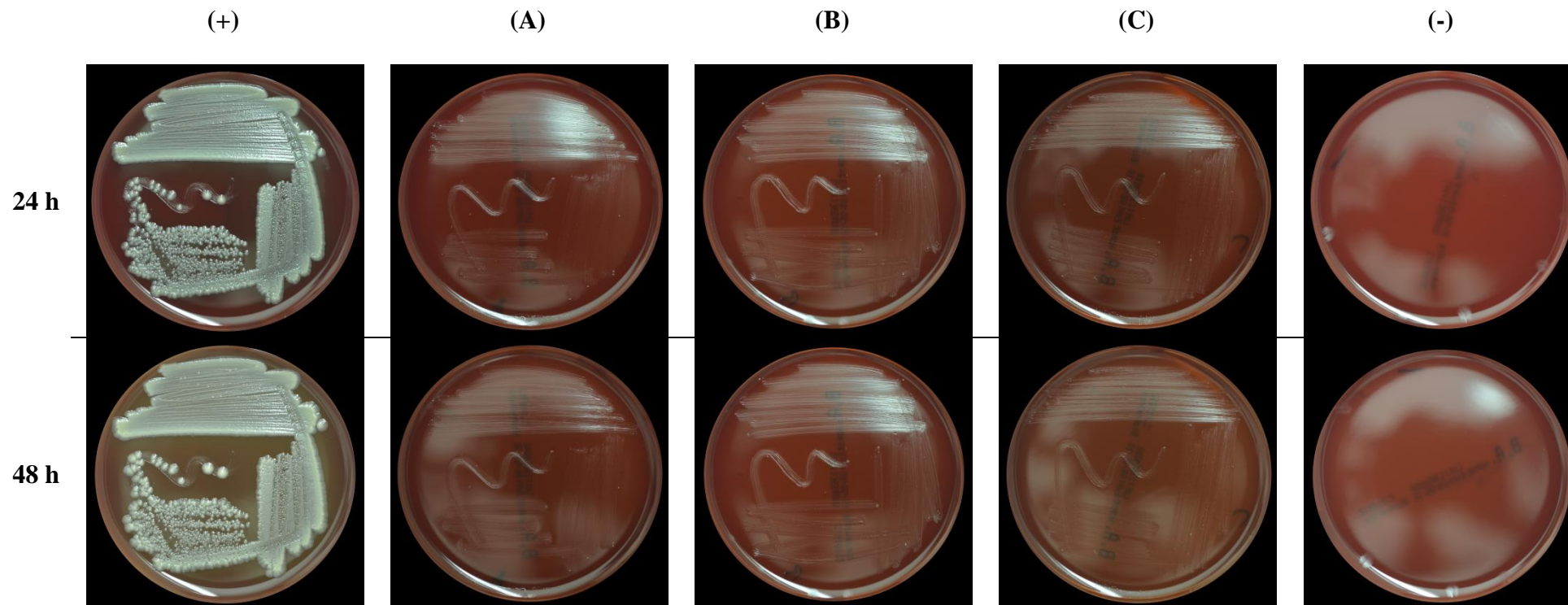
6.3.3 Θειογλυκολικός Ζωμός



Πίνακας 6.3.3: δείγμα χωρίς τη διενέργεια αποστείρωσης (+)· δείγματα μετά τη διαδικασία της αποστείρωσης (A), (B), (C)· μη εμβολιασμένο σωληνάριο (-)

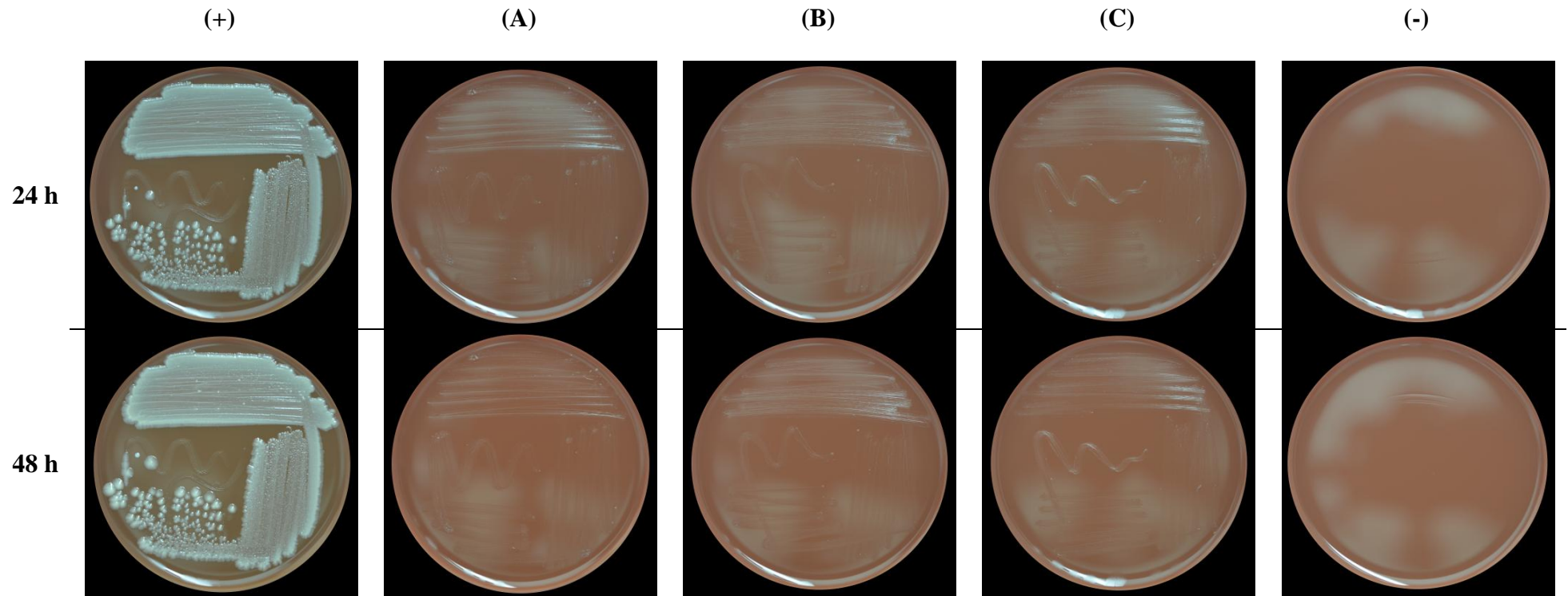
6.4 Έλεγχος 3ης δοκιμασίας αποστείρωσης (4 h) μετά την εκκόλαψη

6.4.1 Αιματούχο Άγαρ



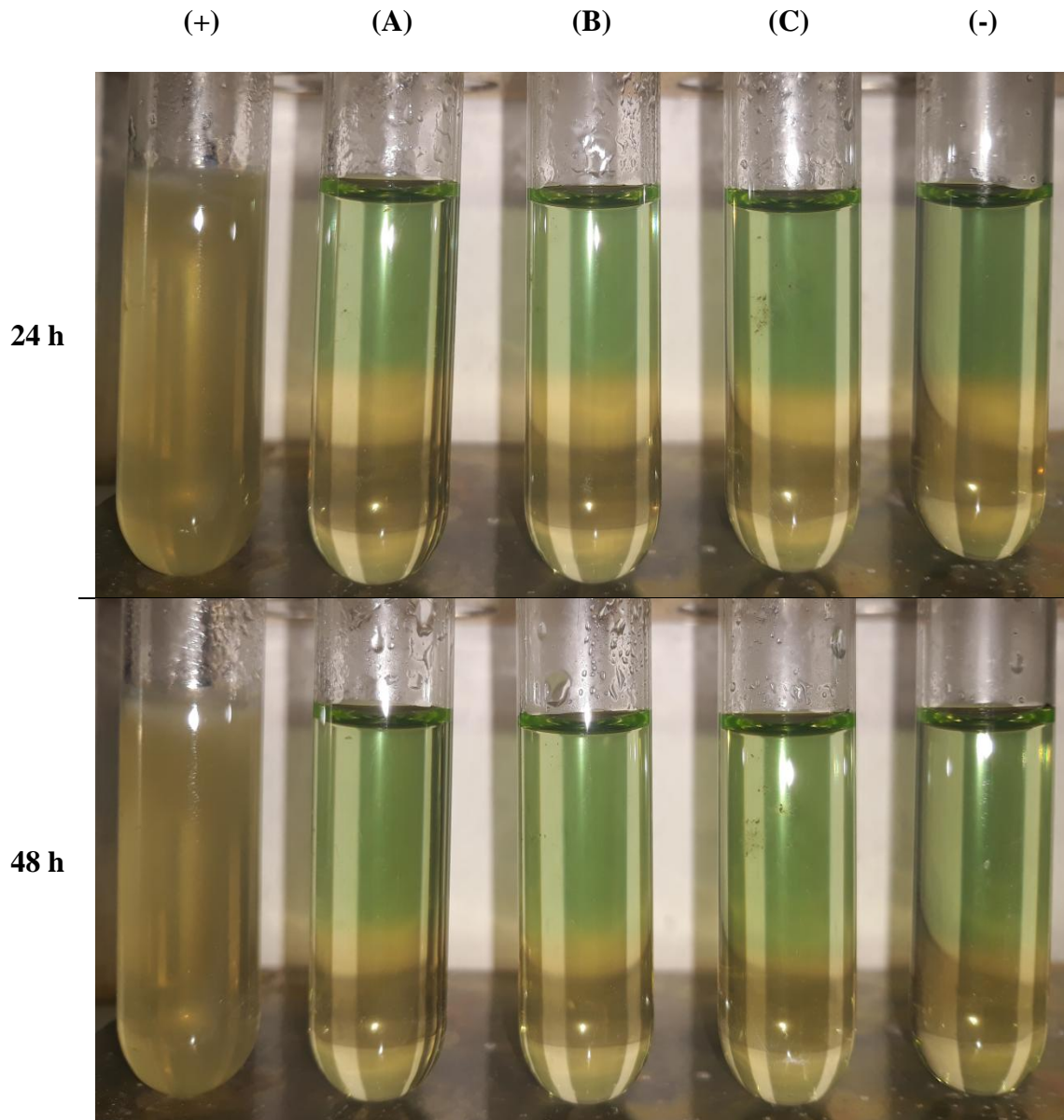
Πίνακας 6.4.1: δείγμα χωρίς τη διενέργεια αποστείρωσης (+)· δείγματα μετά τη διαδικασία της αποστείρωσης (A), (B), (C)· μη ενοφθαλμισμένο τρυβλίο (-)

6.4.2 Σοκολατόχρωμο Άγαρ



Πίνακας 6.4.2: δείγμα χωρίς τη διενέργεια αποστείρωσης (+)· δείγματα μετά τη διαδικασία της αποστείρωσης (A), (B), (C)· μη ενοφθαλμισμένο τρυβλίο (-)

6.4.3 Θειογλυκολικός Ζωμός

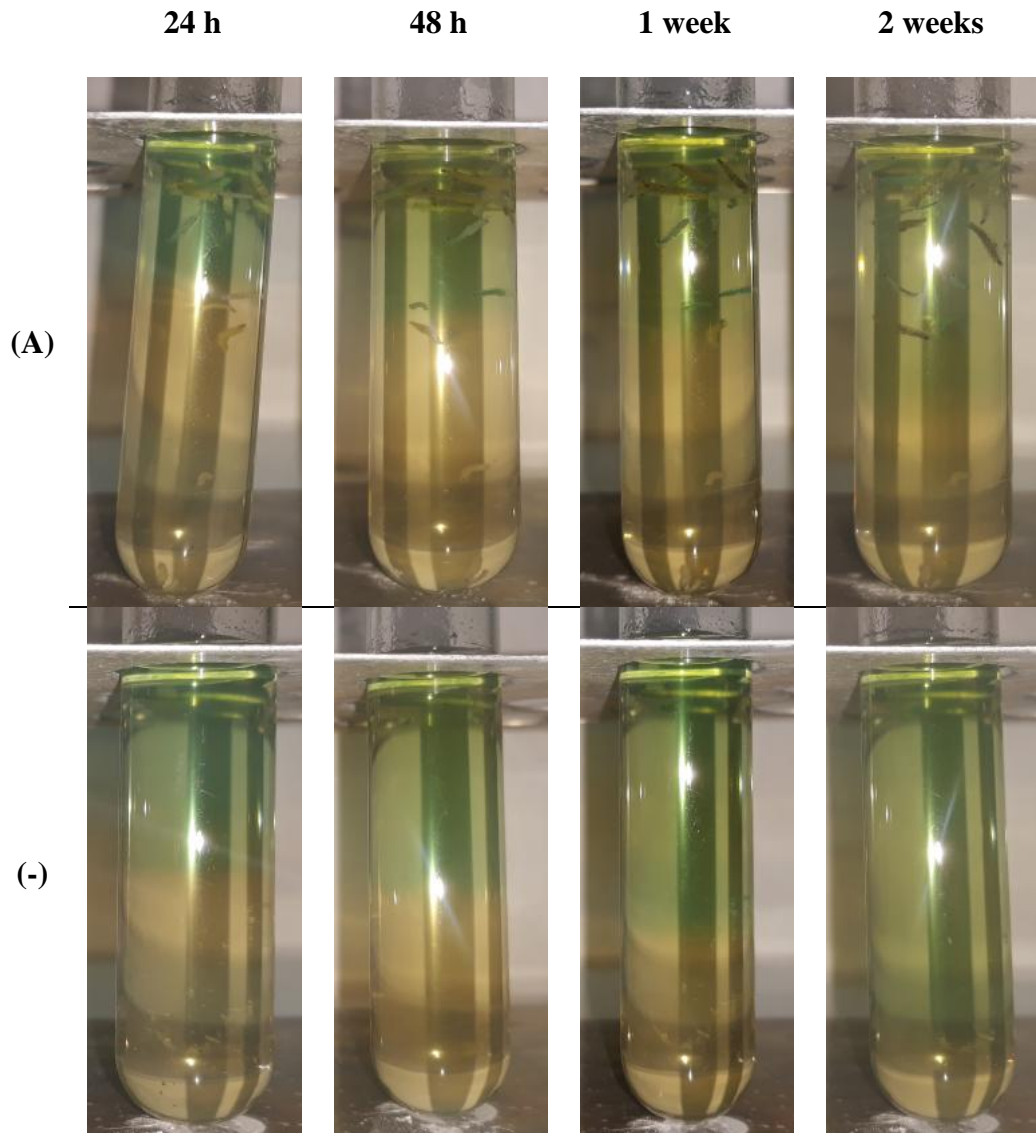


Πίνακας 6.4.3: δείγμα χωρίς τη διενέργεια αποστείρωσης (+)· δείγματα μετά τη διαδικασία της αποστείρωσης (A), (B), (C)· μη εμβολιασμένο σωληνάριο (-)

6.5 Έλεγχος 4^{ης} δοκιμασίας αποστείρωσης (4 h) μετά την εκκόλαψη

6.5.1 Προδοκιμαστικός έλεγχος στειρότητας προνυμφών που συλλέχθηκαν από το μέσο

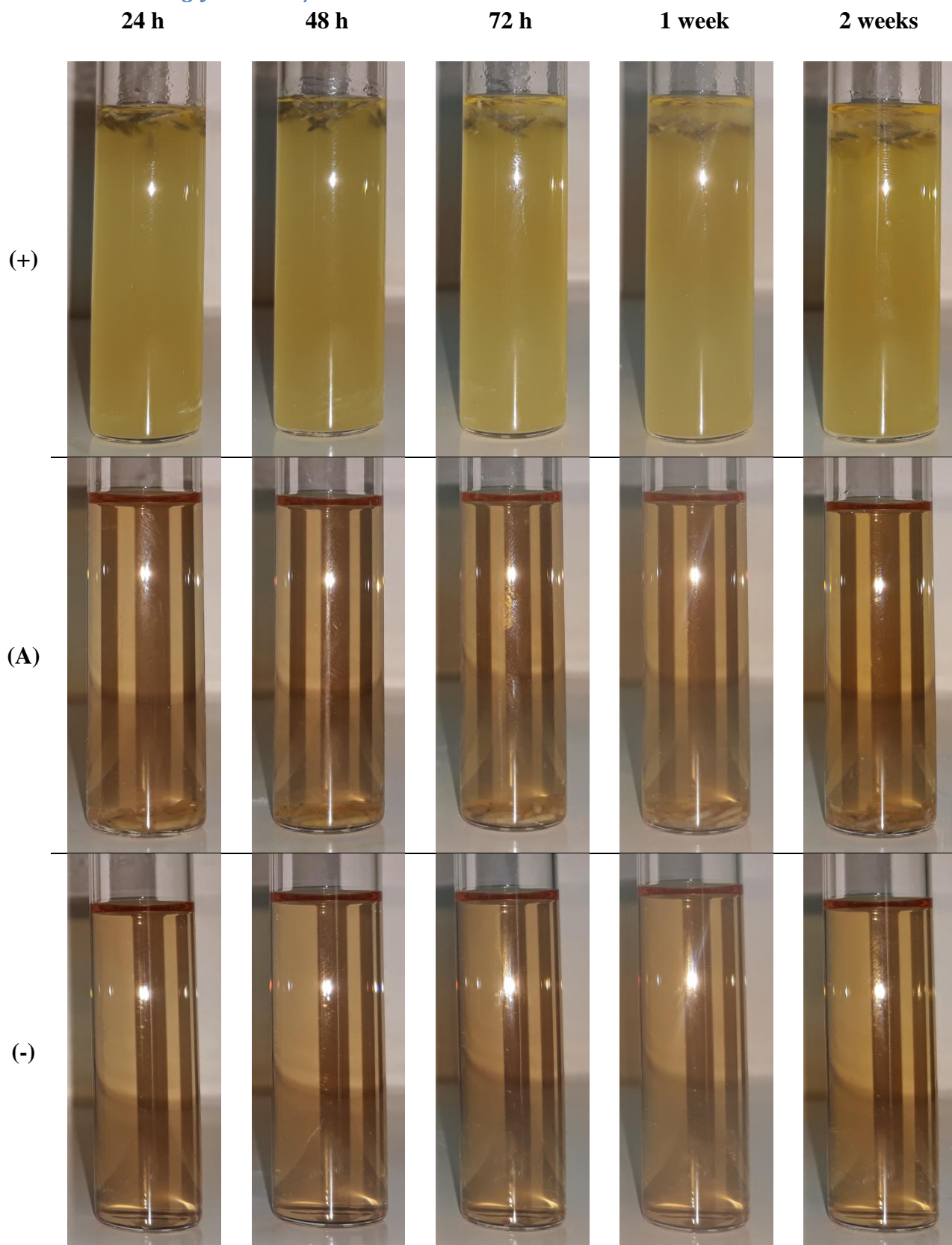
Θειογλυκολικός Ζωμός



Πίνακας 6.5.1: σωληνάριο με προνύμφες μετά τη διαδικασία παραλαβής τους από το θρεπτικό μέσο (A), μη εμβολιασμένο σωληνάριο (-)

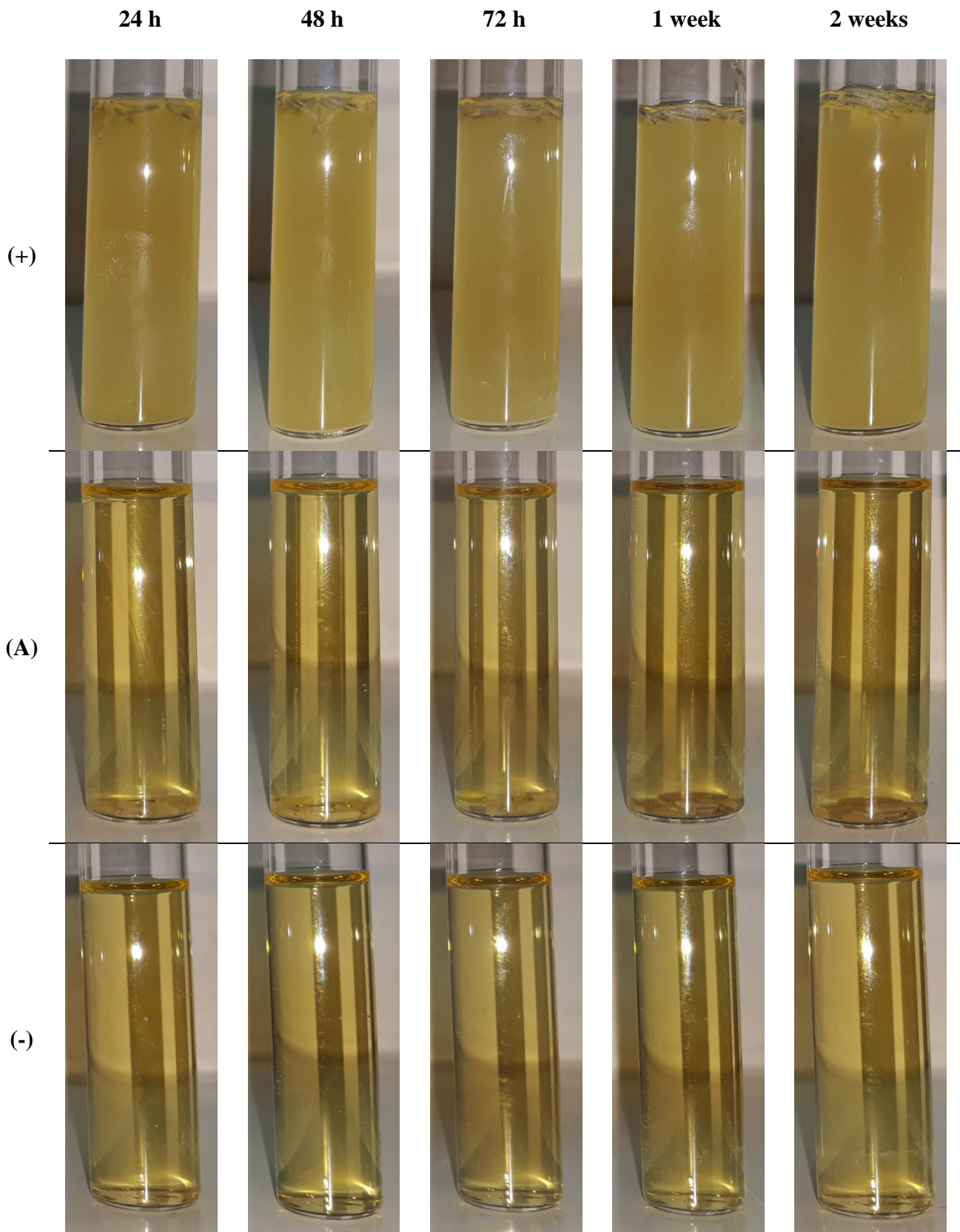
6.5.2 Έλεγχος στειρότητας προνυμφών που συλλέχθηκαν από το μέσο κατά τα πρότυπα της Ευρωπαϊκής Φαρμακοποιίας

6.5.2.1 Thioglycollate W/Resazurin



Πίνακας 6.5.2.1: σωληνάριο με προνύμφες χωρίς τη διενέργεια αποστείρωσης (+), σωληνάριο με προνύμφες μετά την παραλαβή τους από το θρεπτικό μέσο (A), μη εμβολιασμένο σωληνάριο (-)

6.5.2.2 Tryptone Soy Broth



Πίνακας 6.5.2.2: σωληνάριο με προνύμφες χωρίς τη διενέργεια αποστείρωσης (+), σωληνάριο με προνύμφες μετά την παραλαβή τους από το θρεπτικό μέσο (A), μη εμβολιασμένο σωληνάριο (-)

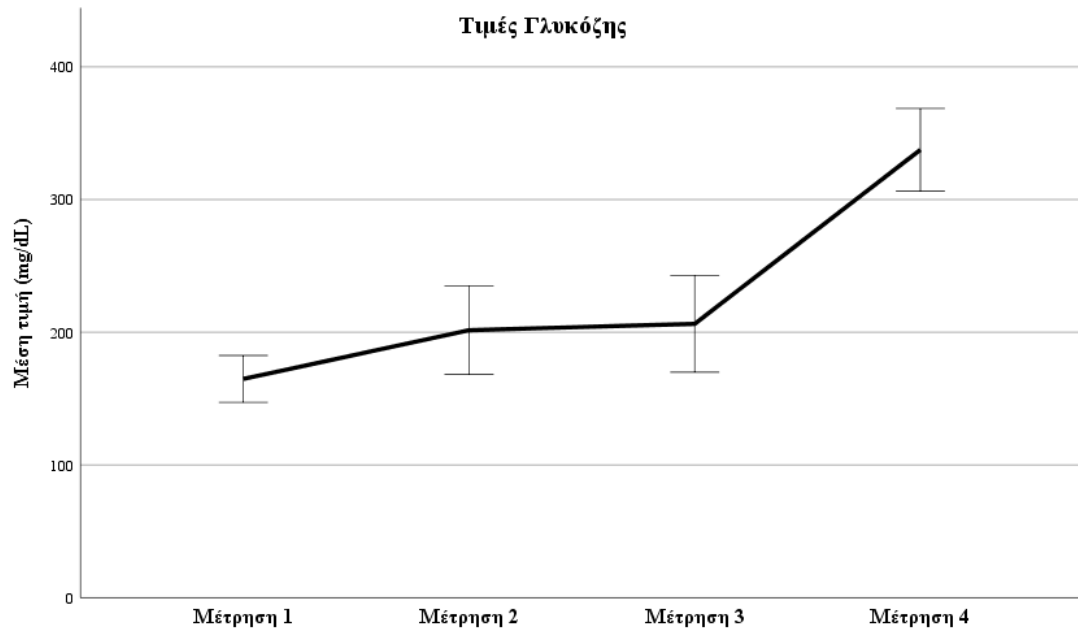
6.6 Μετρήσεις των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα των μυών μετά τις ενέσεις στρεπτοζοτοκίνης (STZ)

6.6.1 Τιμές μετρήσεων επιπέδων γλυκόζης σε 40 μυσ

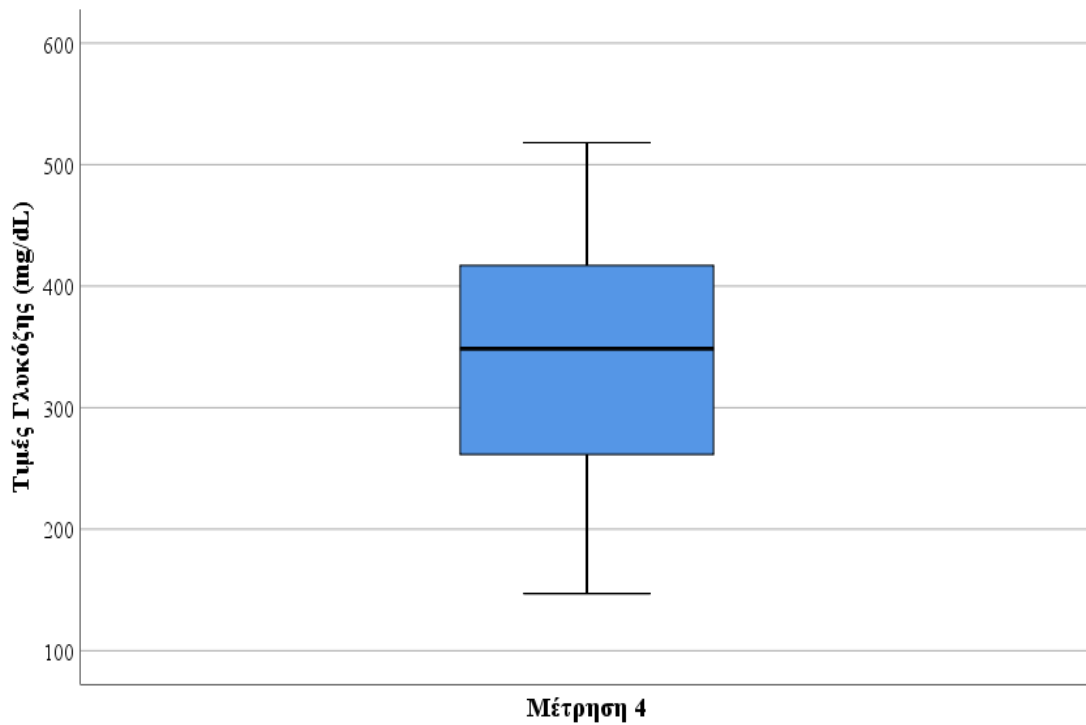
# Μυός	Μέτρηση 1	Μέτρηση 2	Μέτρηση 3	Μέτρηση 4
1	145	162	176	194
2	171	322	372	516
3	154	257	295	399
4	281	473	400	429
5	192	186	172	259
6	112	154	180	218
7	131	213	118	322
8	203	354	470	448
9	168	168	154	364
10	143	139	156	306
11	139	171	132	419
12	294	600	580	518
13	136	169	163	348
14	132	211	145	271
15	174	207	170	264
16	230	264	277	372
17	176	205	171	298
18	128	164	143	147
19	165	285	236	342
20	102	127	113	198
21	230	270	248	349
22	137	123	115	209
23	188	153	150	351
24	261	189	165	458
25	157	196	151	353
26	124	157	165	419
27	119	123	110	223
28	125	124	135	346
29	138	115	134	311
30	173	156	169	364
31	139	111	111	217
32	123	88	91	163
33	140	105	143	415
34	119	136	227	394
35	107	85	102	219
36	138	133	126	342
37	353	339	393	416
38	185	218	376	426
39	151	265	365	476
40	110	145	154	418
Mean	164,83	201,55	206,33	337,53
SD	55,22	103,65	113,97	97,08

Πίνακας 6.6.1: επίπεδα γλυκόζης σε mg/dL

- Μέτρηση 1: 14 ημέρες μετά την τελευταία ένεση του 1^{ου} κύκλου ενέσεων
- Μέτρηση 2: 21 ημέρες μετά την τελευταία ένεση του 1^{ου} κύκλου ενέσεων
- Μέτρηση 3: 30 ημέρες μετά την τελευταία ένεση του 1^{ου} κύκλου ενέσεων
- Μέτρηση 4: 14 ημέρες μετά την τελευταία ένεση του 2^{ου} κύκλου ενέσεων (44 ημέρες μετά την τελευταία ένεση του 1^{ου} κύκλου ενέσεων)



Διάγραμμα 6.6.1: επίπεδα γλυκόζης (Mean \pm SD)



Διάγραμμα 6.6.2: Box-and-Whisker Plot για την ανίχνευση εξωκειμένων παρατηρήσεων

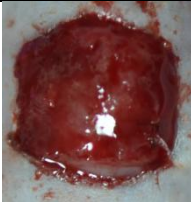
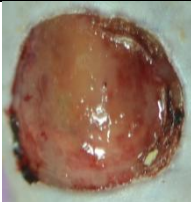
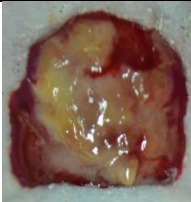

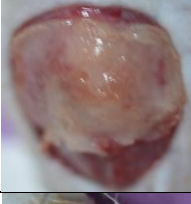
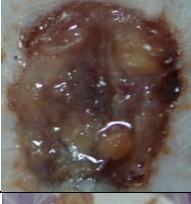



Μέτρηση 4	Kolmogorov-Smirnov			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
	,118	40	,166	,967	40	,298

Πίνακας 6.6.2: Έλεγχος Κανονικότητας στις τιμές της Μέτρησης 4

Μέτρηση 3 - Μέτρηση 4	Paired Samples Test		
	Mean	df	Sig. (2-tailed)
	-131,200	39	,000

Πίνακας 6.6.3: Paired Sample T-Test μεταξύ των τιμών της Μετρησης 3 και της Μέτρησης 4

6.7 Προδοκιμαστική εφαρμογή προνυμφών της μύιας *L. sericata* σε μυς

Ημέρα	# Μυός		
	1	2	3
6			
7			
7 – Επίθεμα			

Πίνακας 6.7

- Ημέρα 0: δημιουργία ελλειμμάτων
- **Ημέρα 6:** φωτογράφιση μετά την αφαίρεση του ξηρού νεκρωτικού ιστού με λαβίδα πριν την εφαρμογή των προνυμφών
- **Ημέρα 7:** φωτογράφιση μετά την αφαίρεση των προνυμφών



Εικόνα 6.7: προνύμφες μετά την αφαίρεσή τους από τον μυ #2 την Ημέρα 7

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

7. Συζήτηση

7.1 Επικύρωση μεθόδου χρήσεως δοχείου κεριού

Η έλλειψη κλιβάνου CO₂ οδήγησε στην επιλογή της χρήσης δοχείου κεριού για τον έλεγχο της ανάπτυξης καπνοφίλων βακτηρίων (υποενότητα 5.3.2.1). Η μέθοδος αυτή εφαρμόστηκε για πρώτη φορά στο συγκεκριμένο εργαστήριο γι' αυτό και κρίθηκε απαραίτητο να επικυρωθεί ώστε να μην υπάρχει η αμφιβολία της λήψης ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων.

Στον πίνακα 6.1.1 φαίνεται ξεκάθαρα η ανάπτυξη αποικιών *Neisseria gonorrhoeae* και στα δύο τρυβλία με σοκολατόχρωμο άγαρ που τοποθετήθηκαν για επώαση εντός του δοχείου κεριού, 24 h μετά τον ενοφθαλμισμό τους με δείγμα καθαρής καλλιέργειας του βακτηρίου. Το γεγονός αυτό κατέστησε πλέον σαφές ότι οι συνθήκες CO₂ εντός του δοχείου κεριού είναι οι ενδεδειγμένες για τον έλεγχο της βακτηριακής ανάπτυξης των καπνοφίλων.

7.2 Έλεγχος 1^{ης} δοκιμασίας αποστείρωσης (20 h) μετά την εκκόλαψη

7.2.1 Αιματούχο Άγαρ

Μετά την προσεκτική οπτική παρατήρηση των τρυβλίων του πίνακα 6.2.1, τόσο στις 24 h όσο και στις 48 h, φαίνεται ότι τα τρυβλία (A), (B), (C) τα οποία ενοφθαλμίστηκαν με δείγμα προνυμφών μετά τη διαδικασία της αποστείρωσης, παρουσιάζουν πανομοιότυπη εικόνα με το (-) το οποίο δεν έχει ενοφθαλμιστεί με κάποιο δείγμα. Αντίθετα, το (+) το οποίο ενοφθαλμίστηκε με δείγμα προνυμφών οι οποίες δεν πέρασαν από τη διαδικασία της αποστείρωσης εμφανίζει ξεκάθαρη αλλοίωση του χρώματος του μέσου που οφείλεται σε ανάπτυξη αποικιών βακτηρίων. Πρέπει εδώ να αναφερθεί ότι υπήρξε μεγάλη διαφορά και στην οσμή των τρυβλίων όπου το τρυβλίο (+) εμφάνισε χαρακτηριστική δυσάρεστη οσμή σε αντίθεση με τα υπόλοιπα 4 τρυβλία.

7.2.2 Σοκολατόχρωμο Άγαρ

Ομοίως με ανωτέρω, μετά την προσεκτική οπτική παρατήρηση των τρυβλίων του πίνακα 6.2.2, τόσο στις 24 h όσο και στις 48 h, φαίνεται ότι τα τρυβλία (A), (B), (C) τα οποία ενοφθαλμίστηκαν με δείγμα προνυμφών μετά τη διαδικασία της αποστείρωσης, παρουσιάζουν πανομοιότυπη εικόνα με το (-) το οποίο δεν έχει

ενοφθαλμιστεί με κάποιο δείγμα σε αντίθεση με το (+) στο οποίο η ανάπτυξη των βακτηρίων είναι καταφανής.

7.2.3 Θειογλυκολικός Ζωμός

Από τον πίνακα 6.2.3 φαίνεται ότι το σωληνάριο με την επισήμανση (+) παρουσιάζει θόλωμα από τις πρώτες 24 h. Αντίθετα, τα σωληνάρια (A), (B) και (C) παραμένουν διαυγή στις 48 h. Δεν φαίνεται ανάπτυξη μικροοργανισμών τόσο στην επιφάνεια των σωληναρίων όπου η οξείδωση του δείκτη φανερώνει την παρουσία οξυγόνου όσο και στον πυθμένα όπου διατηρείται η αναεροβίωση

Τελικά σε κανένα από τα τρία μέσα στα οποία είχε εφαρμοστεί δείγμα από προνύμφες μετά τη διαδικασία της αποστείρωσης δεν παρουσιάστηκε βακτηριακή ανάπτυξη. Το γεγονός αυτό καταδεικνύει ότι 20 h μετά την εκκόλαψη των προνυμφών (χρονικό σημείο λήψης των δειγμάτων), η στείρωση εντός των τρυβλίων του αποστειρωμένου θρεπτικού μέσου όπου και αναπτύσσεται το έντομο, διατηρείται.

7.3 Έλεγχος 2^{ης} δοκιμασίας αποστείρωσης (8 h) μετά την εκκόλαψη

Όπως και στον προηγούμενο έλεγχο, από τους πίνακες 6.3.1, 6.3.2 και 6.3.3 φαίνεται ότι τα τρυβλία και τα σωληνάρια με ένδειξη (A), (B) και (C) τα οποία είχαν εμβολιαστεί με δείγμα αποστειρωμένων προνυμφών δεν παρουσίασαν σημεία βακτηριακής ανάπτυξης μετά από 48 h επώασης στους 37 °C. Αντιθέτως, τα τρυβλία και το σωληνάριο με δείγμα από μη αποστειρωμένες προνύμφες (+) εμφάνισαν μεγάλο βακτηριακό φορτίο από τις πρώτες 24 h.

Το γεγονός αυτό καταδεικνύει ότι 8 h μετά την εκκόλαψη των προνυμφών (χρονικό σημείο λήψης των δειγμάτων), η στείρωση εντός των τρυβλίων του αποστειρωμένου θρεπτικού μέσου όπου και αναπτύσσεται το έντομο, διατηρείται.

7.4 Έλεγχος 3^{ης} δοκιμασίας αποστείρωσης (4 h) μετά την εκκόλαψη

Ομοίως με τους δύο προαναφερθέντες ελέγχους, από τους πίνακες 6.4.1, 6.4.2, 6.4.3 φαίνεται ότι τα τρυβλία και τα σωληνάρια με ένδειξη (A), (B) και (C) τα οποία είχαν εμβολιαστεί με δείγμα αποστειρωμένων προνυμφών δεν παρουσίασαν σημεία βακτηριακής ανάπτυξης μετά από 48 h επώασης στους 37 °C. Αντιθέτως, τα τρυβλία και το σωληνάριο με δείγμα από μη αποστειρωμένες προνύμφες (+) εμφάνισαν μεγάλο βακτηριακό φορτίο από τις πρώτες 24 h.

Καταδεικνύεται λοιπόν ότι ακόμη και μόλις 4 h μετά την εκκόλαψη των προνυμφών (χρονικό σημείο λήψης των δειγμάτων), εντός των τρυβλίων του

αποστειρωμένου θρεπτικού μέσου όπου και αναπτύσσεται το έντομο υπάρχουν στείρες συνθήκες. Το γεγονός αυτό καθιστά τις προνύμφες κατάλληλες για εφαρμογή.

Από τους τρεις αυτούς ελέγχους των δοκιμασιών αποστείρωσης, καθίσταται πλέον σαφές ότι τα τρυβλία που περιέχουν τις αποστειρωμένες προνύμφες, διατηρούν τη στείρότητά τους εντός ενός εύρους της τάξης των 4 h - 20 h τουλάχιστον, από τη στιγμή της εκκόλαψης. Αξίζει να σημειωθεί ότι εντός αυτού του χρονικού πλαισίου το μέγεθος των προνυμφών αυξάνεται ραγδαία.

7.5 Έλεγχος 4^{ης} δοκιμασίας αποστείρωσης (4 h) μετά την εκκόλαψη

7.5.1 Προδοκιμαστικός έλεγχος στείρότητας προνυμφών που συλλέχθηκαν από το μέσο

Στον πίνακα 6.5.1 φαίνεται ότι το σωληνάριο (A) παραμένει διαυγές κατά τη διάρκεια των δύο εβδομάδων του ελέγχου. Το σωληνάριο περιέχει περίπου 30 προνύμφες η οποίες συλλέχθηκαν από το θρεπτικό μέσο με βάση το αντίστοιχο πρωτόκολλο και θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για MDT.

Με τον προδοκιμαστικό αυτό έλεγχο λήφθηκε μια πρώτη εικόνα της επάρκειας του πρωτοκόλλου συλλογής των προνυμφών από το θρεπτικό μέσο και της κατάστασής τους λίγο πριν την εφαρμογή. Εκτός της διατήρησης των συνθηκών στείρότητας, σημαντικό είναι και το γεγονός ότι η βιωσιμότητά τους διατηρείται σε απόλυτο βαθμό.

7.5.2 Έλεγχος στείρότητας προνυμφών που συλλέχθηκαν από το μέσο κατά τα πρότυπα της Ευρωπαϊκής Φαρμακοποιίας

Για τη διεξαγωγή του ελέγχου στείρότητας κατά τα πρότυπα της Ευρωπαϊκής Φαρμακοποιίας επιλέχθηκε η μέθοδος του απευθείας εμβολιασμού των ζωμών με το προς εξέταση υλικό.

7.5.2.1 Thioglycollate W/Resazurin

Από τον πίνακα 6.5.2.1 φαίνεται ότι το σωληνάριο το οποίο έχει εμβολιαστεί με 20 αποστειρωμένες προνύμφες 2^{ov} instar παρουσιάζει εικόνα ταυτόσημη με το μη εμβολιασμένο σωληνάριο καθ' όλη τη διάρκεια των 14 ημερών του ελέγχου. Δεν παρατηρείται θολερότητα ούτε σχηματισμός ιζήματος. Στον πυθμένα φαίνονται οι προνύμφες που εισήχθησαν προς έλεγχο.

7.5.2.2 Tryptone Soy Broth

Ομοίως και για το 2^ο μέσο που ορίζει η Ευρωπαϊκή Φαρμακοποιία, από τον πίνακα 6.5.2.2 φαίνεται ότι δεν αναπτύσσεται βακτηριακό φορτίο 14 ημέρες μετά τον εμβολιασμό των προνυμφών. Αντίθετα στο σωληνάριο που χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας (+) εμφανίζεται θολερότητα από τις πρώτες 24 h, σαφής ένδειξη της ανάπτυξης μικροοργανισμών.

Και τα δύο μέσα που ορίζει η Ευρωπαϊκή Φαρμακοποιία για τον έλεγχο των στείρων προϊόντων δεν εμφάνισαν σημεία βακτηριακής ανάπτυξης 14 ημέρες μετά την εισαγωγή των προνυμφών. Το γεγονός αυτό αποτελεί ισχυρή ένδειξη της καταλληλότητας των προνυμφών που συλλέγονται από το θεραπευτικό μέσο και ταυτόχρονα της επάρκειας των μεθόδων που εφαρμόζονται για τη διαχείρισή τους ώστε να παραμείνουν ασφαλείς πριν τη θεραπεία.

7.6 Μετρήσεις των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα των μυών μετά τις ενέσεις στρεπτοζοτοκίνης (STZ)

Από το διάγραμμα 6.6.1 φαίνεται ότι οι τιμές της γλυκόζης σταθεροποιούνται μεταξύ της Μέτρησης 2 και της Μέτρησης 3. Το γεγονός αυτό μπορεί να οφείλεται σε μηχανισμούς αυτοϊασης με τους οποίους ο οργανισμός των μυών ανταποκρίνεται στην καταστροφή των β-κυττάρων από τη STZ.

Εφόσον 21 ημέρες μετά την ολοκλήρωση των ενέσεων της STZ τα επίπεδα γλυκόζης όχι μόνο δεν ήταν ικανοποιητικά αλλά και δεν εμφάνιζαν ανοδική τάση, ακολούθησε 2^η σειρά ενέσεων. Έτσι, κατά τη Μέτρηση 4, 14 ημέρες μετά, τα επίπεδα γλυκόζης εμφάνισαν σαφή άνοδο. Στο γεγονός αυτό συνηγορεί και η γενικότερη εικόνα των μυών με εμφανή πλέον σημεία εκδήλωσης σακχαρώδους διαβήτη όπως πολυδιψία, πολουρία, ξηροδερμία και απώλεια βάρους.

Από το διάγραμμα 6.6.2 φαίνεται πως δεν υπάρχουν εξωκείμενες παρατηρήσεις (outlier) στις τιμές της Μέτρησης 4 ενώ κατόπιν ελέγχου με το στατιστικό τεστ των Shapiro-Wilk προέκυψε Sig.= 29,8% > 5% (πίνακας 6.6.2). Συμπεραίνουμε λοιπόν ότι η κατανομή είναι, προσεγγιστικά κανονική. Τέλος, μετά από σύγκριση των τιμών της Μέτρησης 3 (πριν τη 2^η σειρά ενέσεων) με αυτές της Μέτρησης 4 (μετά τη 2^η σειρά ενέσεων) μέσω Paired Sample T-Test, παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές (πίνακας 6.6.3), γεγονός που επιβεβαίωσε την ανάγκη επανάληψης των ενέσεων μετά τη Μέτρηση 3.

Σε παλαιότερες μελέτες του εργαστηρίου σχετικά με την πρόκληση σακχαρώδους διαβήτη τύπου 1 σε μύς SKH-hr2 δεν υπήρξε ανάγκη επανάληψης της σειράς των ενέσεων STZ. Αυτό χρειάστηκε να συμβεί μόνο όταν χρησιμοποιήθηκαν μεγαλύτερα σε ηλικία ζώα.

7.7 Προδοκιμαστική εφαρμογή προνυμφών της μύϊας *L. sericata* σε μυς

Στον Μυ #1 την Ημέρα 7 δε βρέθηκε καμία από τις 10 προνύμφες που είχαν εφαρμοστεί την Ημέρα 6. Στην περιοχή του ελλείμματος όπως φαίνεται και από τον πίνακα 6.7 δεν είχε σχηματιστεί κιτρινωπός νεκρωτικός ιστός με αποτέλεσμα να μην υπάρχει τροφή για τις προνύμφες ενώ η ταυτόχρονη έλλειψη υγρασίας από την πληγή οδήγησε την αποξήρανσή τους. Στον ίδιο πίνακα φαίνεται το επίθεμα κατά την αφαίρεσή του την Ημέρα 7 όπου παρουσιάζεται τελείως στεγνό.

Στον Μυ #2 την Ημέρα 7 βρέθηκαν 4 από τις 10 προνύμφες που είχαν εφαρμοστεί την Ημέρα 6. Στην περιοχή του ελλείμματος όπως φαίνεται και από τον πίνακα 6.7 είχε σχηματιστεί μικρή σχετικά ποσότητα κιτρινωπού νεκρωτικού ιστού η οποία δεν ήταν επαρκής για τη διατήρηση της βιωσιμότητας του συνόλου των προνυμφών. Χαρακτηριστική είναι η εικόνα του επιθέματος του μυός την Ημέρα 7 όπου φαίνεται πως έχει διαβραχεί από τις εκκρίσεις/απεκκρίσεις τους κατά τη διαδικασία ρευστοποίησης του νεκρωτικού ιστού.

Στον Μυ #3 την Ημέρα 7 βρέθηκαν 7 από τις 10 προνύμφες που είχαν εφαρμοστεί την Ημέρα 6. Στην περιοχή του ελλείμματος όπως φαίνεται και από τον πίνακα 6.7 είχε σχηματιστεί μεγαλύτερη ποσότητα κιτρινωπού νεκρωτικού ιστού η οποία επέτρεψε τη διατήρηση της βιωσιμότητας περισσότερων προνυμφών. Και σε αυτήν την περίπτωση το επίθεμα είχε διαβραχεί σε σημαντικό βαθμό.

Το γεγονός της διαβροχής των επιθεμάτων δεν θα πρέπει να αγνοηθεί γιατί μπορεί να προκαλέσει βλάβη στο υγιές δέρμα που περιβάλλει την περιοχή της πληγής.

Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι όπως φαίνεται και στην εικόνα 6.7, μετά την απομάκρυνση των επιθεμάτων την ημέρα 7, οι προνύμφες διέφεραν σημαντικά σε μέγεθος παρά το γεγονός ότι τοποθετήθηκαν ταυτόχρονα στον πυθμένα του έλκους.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

- Το χρονικό πλαίσιο των 4 h - 20 h από τη στιγμή της εκκόλαψης των προνυμφών εντός του οποίου διατηρείται η στειρότητά τους αποτελεί ικανό διάστημα για τη χρησιμοποίησή τους.
- Τα πρωτόκολλα που εφαρμόστηκαν οδήγησαν στην παραλαβή από το θρεπτικό μέσο, αποστειρωμένων προνυμφών χωρίς τη διακύβευση της βιωσιμότητάς τους.
- Οι μύες τύπου SKH-hr1 φαίνεται πως αναπτύσσουν δυσκολότερα σακχαρώδη διαβήτη τύπου 1 σε σχέση με τους μυς τύπου SKH-hr2. Η προχωρημένη ηλικία των μυών φαίνεται πως δυσχεραίνει την κατάσταση.
- Σε αντίθεση με τον ξηρό νεκρωτικό ιστό, ο κίτρινος ινώδης ιστός που αναπτύσσεται στον πυθμένα του έλκους φαίνεται ότι αποτελεί το ιδανικό υπόστρωμα για τη διατήρηση της βιωσιμότητας των προνυμφών στην περιοχή.
- Θα πρέπει να ληφθεί μέριμνα για την αντιμετώπιση της έντονης διαβροχής των επιθεμάτων μετά τις πρώτες 24 h εφαρμογής.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Αντωνίου, Χ., Κατσάμπας, Α. (2015). *Δερματολογία Αφροδισιολογία*. Αθήνα: Π.Χ. Πασχαλίδης.
- Καζάκος, Κ. (1995). *Το διαβητικό Πόδι*. Ελληνικά Διαβητολογικά Χρονικά 8:1:22-32.
- Παπαϊωάννου, Γ.Θ. (2006). *Κοσμητολογία : συστατικά, παρασκευή, χρήση καλλυντικών*. Αθήνα: Γ. Γκέλμπεσης.
- Στούκας, Β., Μιχαλοδημητράκης, Μ. (2008). *Ιατροδικαστική Εντομολογία Οι μύγες και τα σκαθάρια στην υπηρεσία του νόμου*. [online] Available at: <http://www.mednet.gr/archives/2008-2/pdf/217.pdf> [Accessed 21 Jun. 2018].
- Χανιώτης Φ., Χανιώτης Δ., (2009). *Φυσιολογία*. Αθήνα: Ιατρικές Εκδόσεις Λίτσας.
- Adler, A. I., Boyko, E. J., Ahroni, J. H., & Smith, D. G. (1999). Lower-extremity amputation in diabetes. The independent effects of peripheral vascular disease, sensory neuropathy, and foot ulcers. *Diabetes care*, 22(7), 1029-1035.
- Ahn, C., & Mulligan, P. (2008). Smoking-the bane of wound healing: biomedical interventions and social influences. *Advances in skin & wound care*, 21(5), 227-236.
- Amazon, K., Robinson, M. J., & Rywlin, A. M. (1980). Ferrugination caused by Monsel's solution. Clinical observations and experimentations. *The American Journal of Dermatopathology*, 2(3), 197-205.
- Anaya, D. A., & Dellinger, E. P. (2006). The obese surgical patient: a susceptible host for infection. *Surgical infections*, 7(5), 473-480.
- Anderson, G. S. (2001). Insect succession on carrion and its relationship to determining time of death. *Forensic entomology: the utility of arthropods in legal investigations*, 143, 76.
- Armstrong, D. G., Salas, P., Short, B., Martin, B. R., Kimbriel, H. R., Nixon, B. P., & Boulton, A. J. (2005). Maggot therapy in "lower-extremity hospice" wound care: fewer amputations and more antibiotic-free days. *Journal of the American Podiatric Medical Association*, 95(3), 254-257.
- Arnold, M. Barbul, A. (2006). Nutrition and wound healing. *Plast Reconstr Surg* 117(7 Suppl):42S-58S.
- Assal, J. P., Mehnert, H., Tritschler, H. J., Sidorenko, A., & Keen, H. (2002). On your feet! Workshop on the Diabetic Foot. *Journal of diabetes and its complications*, 16(2), 183-194.
- Aye, M., Masson, E. A. (2002). Dermatological care of diabetic foot. *Am J Clin Dermatol* 3:463-474.
- Ayello, E. A., & Cuddigan, J. E. (2004). Debridement: controlling the necrotic/cellular burden. *Advances in skin & wound care*, 17(2), 66-75.
- Baer, W. S. (1931). The treatment of chronic osteomyelitis with the maggot (larva of the blow fly). *JBJS*, 13(3), 438-475.
- Bakker, K., Apelqvist, J., Lipsky, B. A., Van Netten, J. J., Schaper, N. C., & International Working Group on the Diabetic Foot (IWGDF). (2016). The 2015 IWGDF guidance documents on prevention and management of foot problems in diabetes: development of an evidence-based global consensus. *Diabetes/metabolism research and reviews*, 32, 2-6.
- Baum, C. L., & Arpey, C. J. (2005). Normal cutaneous wound healing: clinical correlation with cellular and molecular events. *Dermatologic surgery*, 31(6), 674-686.
- Bay Area Lyme Foundation (2015, November 30). *Straight talk about biofilms: a new answer for treating Lyme disease?*. [online] Available at: <https://www.bayarealyme.org/blog/straight-talk-biofilms-new-answer-treating-lyme-disease/> [Accessed 21 Jun. 2018].
- Bedoya, F. J., Solano, F., & Lucas, M. (1996). N-monomethyl-arginine and nicotinamide prevent streptozotocin-induced double strand DNA break formation in pancreatic rat islets. *Experientia*, 52(4), 344-347.
- Beldon, P. (2010). Basic science of wound healing. *Surgery-Oxford International Edition*, 28(9), 409-412.
- Bender, D., Botham, K. M., & Kennelly, P. J. (2012). *Harpers Illustrated Biochemistry 29th Edition*. McGraw Hill Professional.

- Bera, S., Zhanel G. G., & Schweizer F. (2010). Antibacterial activities of aminoglycoside antibiotics-derived cationic amphiphiles. Polyol-modified neomycin B-, kanamycin A-, amikacin-, and neamine-based amphiphiles with potent broad spectrum antibacterial activity. *Journal of medicinal chemistry*, 53(9), 3626-3631.
- Bexfield, A., Bond, A. E., Morgan, C., Wagstaff, J., Newton, R. P., Ratcliffe, N. A., ... & Nigam, Y. (2010). Amino acid derivatives from *Lucilia sericata* excretions/secretions may contribute to the beneficial effects of maggot therapy via increased angiogenesis. *British Journal of Dermatology*, 162(3), 554-562.
- Bexfield, A., Nigam, Y., Thomas, S., & Ratcliffe, N. A. (2004). Detection and partial characterisation of two antibacterial factors from the excretions/secretions of the medicinal maggot *Lucilia sericata* and their activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Microbes and infection*, 6(14), 1297-1304.
- Bhushan, B., Tang, W., & Ge, S. (2010). Nanomechanical characterization of skin and skin cream. *Journal of microscopy*, 240(2), 135-144.
- Biomonde® (2016). *Sizing ordering and care guide*. [online] Available at: <http://biomonde.com/en/hcp/product/larvae100-200> [Accessed 21 Jun. 2018].
- Bioprepate®, (2018a). *blood agar horse blood*. [online] Available at: <https://www.bioprepate.gr/el/technics.html?start=20> [Accessed 21 Jun. 2018].
- Bioprepate®, (2018b). *chocolate agar horse blood*. [online] Available at: <https://www.bioprepate.gr/el/technics.html?start=40> [Accessed 21 Jun. 2018].
- Bioprepate®, (2018c). *thioglycollate medium (brewer)*. [online] Available at: <https://www.bioprepate.gr/el/technics.html?start=190> [Accessed 21 Jun. 2018].
- Bioprepate®, (2018d). *thioglycollate w/resazurin (usp)*. [online] Available at: <https://www.bioprepate.gr/el/technics.html?start=190> [Accessed 21 Jun. 2018].
- Bioprepate®, (2018e). *tryptone soy broth (usp)*. [online] Available at: <https://www.bioprepate.gr/el/technics.html?start=200> [Accessed 21 Jun. 2018].
- Bishop, A. (2008). Role of oxygen in wound healing. *Journal of wound care*, 17(9), 399-402.
- Bjarnsholt, T., Kirketerp-Møller, K., Jensen, P. Ø., Madsen, K. G., Phipps, R., Kroghfelt, K., ... & Givskov, M. (2008). Why chronic wounds will not heal: a novel hypothesis. *Wound repair and regeneration*, 16(1), 2-10.
- Blake, F. A., Abromeit, N., Bubenheim, M., Li, L., & Schmelzle, R. (2007). The biosurgical wound debridement: experimental investigation of efficiency and practicability. *Wound repair and regeneration*, 15(5), 756-761.
- Boada, A. (2012). Skin lesions in the diabetic foot. *Actas Dermo-Sifiliográficas (English Edition)*, 103(5), 348-356.
- Boron, F.W., Boulpaep, L.E. (2005). *Ιατρική φυσιολογία: Κοτταρική και μοριακή προσέγγιση*. Επιμ. Μ. Κουτσιλιέρης. Αθήνα: Π.Χ. Πασχαλίδης. 2006.
- Boulton, A. J. M. (2004). The diabetic foot: from art to science. The 18th Camillo Golgi lecture. *Diabetologia*, 47(8), 1343-1353.
- Boulton, A. J. M., Kubrusly, D. B., Bowker, J. H., Gadia, M. T., Quintero, L., Becker, D. M., ... & Sosenko, J. M. (1986). Impaired vibratory perception and diabetic foot ulceration. *Diabetic medicine*, 3(4), 335-337.
- Boulton, A. J., Vileikyte, L., Ragnarson-Tennvall, G., & Apelqvist, J. (2005). The global burden of diabetic foot disease. *The Lancet*, 366(9498), 1719-1724.
- Bowling, F. L., Salgami, E. V., & Boulton, A. J. (2007). Larval therapy: a novel treatment in eliminating methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from diabetic foot ulcers. *Diabetes Care*, 30(2), 370-371.
- Boyapati, L., & Wang, H. L. (2007). The role of stress in periodontal disease and wound healing. *Periodontology 2000*, 44(1), 195-210.
- Brand, P. W. (1988). Repetitive stress in the development of diabetic foot ulcers. *The diabetic foot*, 83-90.
- Brem, H., Jacobs, T., Vileikyte, L., Weinberger, S., Gibber, M., Gill, K. et al., (2003). Wound-healing protocols for diabetic foot and pressure ulcers. *Surg Technol Int*. 11: 85–92.
- Brewer, J. H. (1940). Clear liquid mediums for the aerobic cultivation of anaerobes. *Journal of the American Medical Association*, 115(8), 598-600.

- Broughton, G., Janis, J.E., Attinger, C.E., (2006), Woundhealing: an overview. *PlastReconstrSurg.* 117(7suppl): 1e-S-32E-S.
- Brown, A., Horobin, A., Blount, D. G., Hill, P. J., English, J., Rich, A., ... & Pritchard, D. I. (2012). Blow fly *Lucilia sericata* nuclease digests DNA associated with wound slough/eschar and with *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. *Medical and veterinary entomology*, 26(4), 432-439.
- Brown, C. D., & Zitelli, J. A. (1993). A review of topical agents for wounds and methods of wounding. *The Journal of dermatologic surgery and oncology*, 19(8), 732-737.
- Burgess, C. (2008). Topical vitamins. *J Drugs Dermatol* 7(7 Suppl):s2-s6.
- Burns, D. A., Breathnach, S. M., Cox, N., Griffiths, C.E. (2013). *Rook's Text-book of Dermatology*. New York, N.Y.: Wiley-Blackwell.
- Calabro, P., & Yeh, E. T. (2007). Obesity, Inflammation, and Vascular Disease. In *Inflammation in the Pathogenesis of Chronic Diseases* (pp. 63-91). Springer, Dordrecht.
- Campobasso, C. P., Gherardi, M., Caligara, M., Sironi, L., & Introna, F. (2004). Drug analysis in blowfly larvae and in human tissues: a comparative study. *International journal of legal medicine*, 118(4), 210-214.
- Campos, A. C., Groth, A. K., Branco, A.B. (2008). Assessment and nutritional aspects of wound healing. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 11:281-288.
- Caputo, G. M., Cavanagh, P. R., Ulbrecht, J. S., Gibbons, G. W., & Karchmer, A. W. (1994). Assessment and management of foot disease in patients with diabetes. *New England Journal of Medicine*, 331(13), 854-860.
- Cazander, G., van de Veerdonk, M. C., Vandenbroucke-Grauls, C. M., Schreurs, M. W., & Jukema, G. N. (2010). Maggot excretions inhibit biofilm formation on biomaterials. *Clinical Orthopaedics and Related Research*®, 468(10), 2789-2796.
- Cazander, G., van Veen, K. E., Bouwman, L. H., Bernards, A. T., & Jukema, G. N. (2009). The influence of maggot excretions on PAO1 biofilm formation on different biomaterials. *Clinical orthopaedics and related research*, 467(2), 536-545.
- Čeřovský, V., Žďárek, J., Fučík, V., Monincová, L., Voburka, Z., & Bém, R. (2010). Lucifensin, the long-sought antimicrobial factor of medicinal maggots of the blowfly *Lucilia sericata*. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67(3), 455-466.
- Chambers, L., Woodrow, S., Brown, A. P., Harris, P. D., Phillips, D., Hall, M., ... & Pritchard, D. I. (2003). Degradation of extracellular matrix components by defined proteinases from the greenbottle larva *Lucilia sericata* used for the clinical debridement of non-healing wounds. *British Journal of Dermatology*, 148(1), 14-23.
- Chatzigeorgiou, A., Halapas, A., Kalafatakis, K., & Kamper, E. (2009). The use of animal models in the study of diabetes mellitus. *In Vivo*, 23(2), 245-258.
- Chiang, J. L., Kirkman, M. S., Laffel, L. M., & Peters, A. L. (2014). Type 1 diabetes through the life span: a position statement of the American Diabetes Association. *Diabetes care*, 37(7), 2034-2054.
- Choudhary, V., Choudhary, M., Pandey, S., Chauhan, V. D., & Hasnani, J. J. (2016). Maggot debridement therapy as primary tool to treat chronic wound of animals. *Veterinary world*, 9(4), 403.
- Čičková, H., Čambal, M., Kozánek, M., & Takáč, P. (2013). Growth and survival of bagged *Lucilia sericata* maggots in wounds of patients undergoing maggot debridement therapy. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013.
- Clancy, N. T., Nilsson, G. E., Anderson, C. D., & Leahy, M. J. (2010). A new device for assessing changes in skin viscoelasticity using indentation and optical measurement. *Skin Research and Technology*, 16(2), 210-228.
- Clark, R. A. (1993). Regulation of fibroplasia in cutaneous wound repair. *The American journal of the medical sciences*, 306(1), 42-48.
- Contreras-Ruiz, J., Arroyo-Escalante, S., Fuentes-Suarez, Adominguez-Cherit, J., Sosa-de-Martinez, C., Maravilla-Franco, E. (2015). "Maggot therapy and infection control in venous ulcers: a comparative study," in *Proceedings of the Symposium on AdvancedWoundCare (SAWC'05)*, San Diego, Calif, USA, April 2005.
- Cooke, D. W., & Plotnick, L. (2008). Type 1 diabetes mellitus in pediatrics. *Pediatr Rev*, 29(11), 374-84.

- Cross, S. E. (2007). 16 Topical Therapeutic Agents Used in Wound Care. *Dermatologic, Cosmeceutic, and Cosmetic Development: Therapeutic and Novel Approaches*, 267.
- Da Costa, M. A., Campos, A. C., Coelho, J. C., de Barros, A. M., & Matsumoto, H. M. (2003). Oral glutamine and the healing of colonic anastomoses in rats. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 27(3), 182-185.
- Dadour, I. R., Cook, D. F., Fissioli, J. N., & Bailey, W. J. (2001). Forensic entomology: application, education and research in Western Australia. *Forensic science international*, 120(1-2), 48-52.
- Dallavecchia, D. L., da Silva Filho, R. G., & Aguiar, V. M. (2014). Sterilization of *Chrysomya putoria* (Insecta: Diptera: Calliphoridae) eggs for use in biotherapy. *Journal of Insect Science*, 14(1).
- Davis, S. C., Ricotti, C., Cazzaniga, A., Welsh, E., Eaglstein, W. H., & Mertz, P. M. (2008). Microscopic and physiologic evidence for biofilm-associated wound colonization in vivo. *Wound repair and Regeneration*, 16(1), 23-29.
- de Mello, V. D., Kolehmainen, M., Schwab, U., Mager, U., Laaksonen, D. E., Pulkkinen, L., ... & Uusitupa, M. (2008). Effect of weight loss on cytokine messenger RNA expression in peripheral blood mononuclear cells of obese subjects with the metabolic syndrome. *Metabolism-Clinical and Experimental*, 57(2), 192-199.
- Demidova-Rice, T. N., Hamblin, M. R., & Herman, I. M. (2012). Acute and impaired wound healing: pathophysiology and current methods for drug delivery, part 1: normal and chronic wounds: biology, causes, and approaches to care. *Advances in skin & wound care*, 25(7), 304.
- Derby City PCT (2012). [online] Available at: <http://www.derbyhospitals.nhs.uk/EasysiteWeb/getresource.axd?AssetID=7106&type=full&servicetype=Attachment> [Accessed 21 Jun. 2018].
- Diegelmann, R. F., & Evans, M. C. (2004). Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Front Biosci*, 9(1), 283-289.
- Dong, Y. L., Fleming, R. Y., Yan, T. Z., Herndon, D. N., & Waymack, J. P. (1993). Effect of ibuprofen on the inflammatory response to surgical wounds. *The Journal of trauma*, 35(3), 340-343.
- Dumville, J. C., Soares, M. O., O'meara, S., & Cullum, N. (2012). Systematic review and mixed treatment comparison: dressings to heal diabetic foot ulcers. *Diabetologia*, 55(7), 1902-1910.
- Dumville, J. C., Worthy, G., Bland, J. M., Cullum, N., Dowson, C., Iglesias, C., ... & Torgerson, D. J. (2009). Larval therapy for leg ulcers (VenUS II): randomised controlled trial. *Bmj*, 338, b773.
- Dvivedi, S., Tiwari, S. M., & Sharma, A. (1997). Effect of ibuprofen and diclofenac sodium on experimental wound healing. *Indian journal of experimental biology*, 35(11), 1243-1245.
- Emery, C. F., Kiecolt-Glaser, J. K., Glaser, R., Malarkey, W. B., & Frid, D. J. (2005). Exercise accelerates wound healing among healthy older adults: a preliminary investigation. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, 60(11), 1432-1436.
- Eming, S. A., Martin, P., & Tomic-Canic, M. (2014). Wound repair and regeneration: mechanisms, signaling, and translation. *Science translational medicine*, 6(265), 265sr6-265sr6.
- Endo, K., Suzuki, N., Yoshida, O., Sato, H., & Fujikura, Y. (2007). The barrier component and the driving force component of transepidermal water loss and their application to skin irritant tests. *Skin Research and Technology*, 13(4), 425-435.
- Ennis, W. J., & Meneses, P. (2000). Wound healing at the local level: the stunned wound. *Ostomy/wound management*, 46(1A Suppl), 39S-48S.
- Enoch, S., & Harding, K. (2003). Wound bed preparation: the science behind the removal of barriers to healing. *Wounds*, 15(7), 213-229.
- Enoch, S., & Leaper, D. J. (2005). Basic science of wound healing. *Surgery-Oxford International Edition*, 23(2), 37-42.
- Epstein, E. (1986). Effects of tissue-destructive technics on wound healing. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 14(6), 1098-1099.

- Erdmann, G. R., & Khalil, S. K. W. (1986). Isolation and identification of two antibacterial agents produced by a strain of *Proteus mirabilis* isolated from larvae of the screwworm (*Cochliomyia hominivorax*) (Diptera: Calliphoridae). *Journal of medical entomology*, 23(2), 208-211.
- Erzinclioglu, Z. (1996). *The Biology of Blowflies*. Naturalist's Handbook 23: Blowflies. Richmond Publishing, Slough.
- European Medicines Agency (2010). *Larvae of Lucilia sericata*. Available at: http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/pips/EMEA-000714-PIP01-09/pip_000362.jsp&mid=WC0b01ac058001d129 [Accessed 21 Jun. 2018].
- Everett, J. S., & Sommers, M. S. (2013). Skin viscoelasticity: physiologic mechanisms, measurement issues, and application to nursing science. *Biological research for nursing*, 15(3), 338-346.
- Falanga, V. (1998). Wound healing chronic wounds. *J CUTAN Med Surg*, 3(suppl 1): 1S-5S.
- Falanga, V. (2002). Wound bed preparation and the role of enzymes: a case for multiple actions of therapeutic agents. *Wounds*, 14, 47-57.
- Falanga, V. (2005). Wound healing and its impairment in the diabetic foot. *The Lancet*, 366(9498), 1736-1743.
- Falanga, V., Brem, H., Ennis, W. J., Wolcott, R., Gould, L. J., & Ayello, E. A. (2008). Maintenance debridement in the treatment of difficult-to-heal chronic wounds. Recommendations of an expert panel. *Ostomy/wound management*, 2-13.
- Farahmand, S., Tien, L., Hui, X., & Maibach, H. I. (2009). Measuring transepidermal water loss: a comparative in vivo study of condenser-chamber, unventilated-chamber and open-chamber systems. *Skin Research and Technology*, 15(4), 392-398.
- Flanagan, M. (2000). The physiology of wound healing. *Journal of wound care*, 9(6), 299-300.
- Fleischmann, W., & Thoener, B. (2000, June). Biobag: a live wound-dressing containing maggots. In *Fifth International Conference on Biotherapy, Wurzburg, Germany, June* (p. 8).
- Fleischmann, W., Grassberger, M., & Sherman, R. (2004). *Maggot therapy: a handbook of maggot-assisted wound healing*. Georg Thieme Verlag.
- Fletcher, J. (2008). Differences between acute and chronic wounds and the role of wound bed preparation. *Nursing Standard (through 2013)*, 22(24), 62.
- Fontana, L., Eagon, J. C., Colonna, M., & Klein, S. (2007). Impaired mononuclear cell immune function in extreme obesity is corrected by weight loss. *Rejuvenation research*, 10(1), 41-46.
- Food and Drug Administration (2004). *Maggots, Medical*. [online] Available at: <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/devicesatfda/index.cfm?db=pmn&id=K033391> [Accessed 21 Jun. 2018].
- Franz, M. G., Steed, D. L., & Robson, M. C. (2007). Optimizing healing of the acute wound by minimizing complications. *Current problems in surgery*, 44(11), 691-763.
- Furman, B. L. (2015). Streptozotocin-induced diabetic models in mice and rats. *Current protocols in pharmacology*, 5-47.
- Ganz, T. (1993). Macrophage function. *New Horiz*. 1: 23-27.
- Gardner, D. G., Shoback, D., & Greenspan, F. S. (2007). *Greenspan's basic & clinical endocrinology*. McGraw-Hill Medical.
- Garrigue, E., Martini, J., Cousty-Pech, F., Rouquier, A., & Degouy, A. (2011). Evaluation of the moisturizer Pédimed® in the foot care of diabetic patients. *Diabetes & metabolism*, 37(4), 330-335.
- Giannone, G., Dubin-Thaler, B. J., Döbereiner, H. G., Kieffer, N., Bresnick, A. R., & Sheetz, M. P. (2004). Periodic lamellipodial contractions correlate with rearward actin waves. *Cell*, 116(3), 431-443.
- Gilliver, S.C., Ashworth, J.J., Ashcroft, G.S. (2007). The hormonal regulation of cutaneous wound healing. *Clin Dermatol* 25:56-62.
- Glaser, R., & Kiecolt-Glaser, J. K. (2005). Stress-induced immune dysfunction: implications for health. *Nature Reviews Immunology*, 5(3), 243.

- Glat, P.M., Longaker, M.T. (1997). *Wound healing*. In: *Grabb and Smith's Plastic Surgery*. Philadelphia: Lippincott-Raven.
- Godbout, J. P., & Glaser, R. (2006). Stress-induced immune dysregulation: implications for wound healing, infectious disease and cancer. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, 1(4), 421-427.
- Gogia, P. P. (1995). Physiology of wound healing. In: *Clinical wound management*. Gogia PP, editor. Thorofare, NJ: Slack Incorporated, pp 8-12.
- Goodridge, D., Trepman, E., Sloan, J., Guse, L., Strain, L. A., McIntyre, J., & Embil, J. M. (2006). Quality of life of adults with unhealed and healed diabetic foot ulcers. *Foot & ankle international*, 27(4), 274-280.
- Gosain, A., DiPietro, L.A. (2004). Aging and wound healing. *World J Surg* 28:321-326.
- Gottrevitch, A., Hunt G. A., & Lein J. (1958). Antibacterial activity of Kanamycin. *Antibiotics & Chemotherapy*, 8(3), 149-59.
- Gottrup, F., Apelqvist, J., Bjarnsholt, T., Cooper, R., Moore, Z., Peters, E. J., & Probst, S. (2014). Antimicrobials and Non-Healing Wounds. Evidence, controversies and suggestions—key messages. *Journal of wound care*, 23(10), 477-482.
- Grassberger, M., & Fleischmann, W. (2002). The biobag—a new device for the application of medicinal maggots. *Dermatology*, 204(4), 306-306.
- Grassberger, M., & Reiter, C. (2001). Effect of temperature on *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae) development with special reference to the isomegalen-and isomorphen-diagram. *Forensic Science International*, 120(1-2), 32-36.
- Grassberger, M., Sherman, R. A., Gileva, O., Kim, C., & Mumcuoglu, K. Y. (2013). Biotherapy-History, Principles and Practice. *Springer Dordrecht Heidelberg New York London*, 37, 38-39.
- Greco III, J. A., Castaldo, E. T., Nanney, L. B., Wendel, J. J., Summitt, J. B., Kelly, K. J., ... & Shack, R. B. (2008). The effect of weight loss surgery and body mass index on wound complications after abdominal contouring operations. *Annals of plastic surgery*, 61(3), 235-242.
- Greenberg, B. (1968). Model for destruction of bacteria in the midgut of blow fly maggots. *Journal of Medical Entomology*, 5(1), 31-38.
- Greenberg, B. (1973). Flies through history. In: *Flies and Disease* (ed. Greenberg, B.), Princeton University Press, Princeton.
- Greenhalgh, D.G. (2005). Models of wound healing. *J Burn Care Rehabil.* 26:293-305.
- Guo, S. A., & DiPietro, L. A. (2010). Factors affecting wound healing. *Journal of dental research*, 89(3), 219-229.
- Gurtner, G. C., & Evans, G. R. (2000). Advances in head and neck reconstruction. *Plastic and reconstructive surgery*, 106(3), 672-682.
- Harding, K. G., & Edwards, R. (2004). *Bacteria and wound healing* vol. 17.
- Hardman, M. J., & Ashcroft, G. S. (2008). Estrogen, not intrinsic aging, is the major regulator of delayed human wound healing in the elderly. *Genome biology*, 9(5), R80.
- Harris, L. G., Bexfield, A., Nigam, Y., Rohde, H., Ratcliffe, N. A., & Mack, D. (2009). Disruption of *Staphylococcus epidermidis* biofilms by medicinal maggot *Lucilia sericata* excretions/secretions. *The International journal of artificial organs*, 32(9), 555-564.
- Hart, J. (2002). Inflammation 1: its role in the healing of acute wounds. *Journal of wound care*, 11(6), 205-209.
- Hayes, E. J., Wall, R., & Smith, K. E. (1999). Mortality rate, reproductive output, and trap response bias in populations of the blowfly *Lucilia sericata*. *Ecological entomology*, 24(3), 300-307.
- Hess, C.T. (2000). Skin care basics. *Adv Skin Wound Care.* 13(3 pt 1): 127-128.
- Heyman, H., Van De Looverbosch, D. E. J., Meijer, E. P., & Schols, J. M. G. A. (2008). Benefits of an oral nutritional supplement on pressure ulcer healing in long-term care. *journal of wound care*, 17(11), 476-480.
- Hofman, D., Moore, K., Cooper, R., Eagle, M., & Cooper, S. (2007). Use of topical corticosteroids on chronic leg ulcers. *Journal of wound care*, 16(5), 227-230.

- Holly, S. P., Larson, M. K., & Parise, L. V. (2000). Multiple roles of integrins in cell motility. *Experimental cell research*, 261(1), 69-74.
- Horobin, A. J., Shakesheff, K. M., & Pritchard, D. I. (2005). Maggots and wound healing: an investigation of the effects of secretions from *Lucilia sericata* larvae upon the migration of human dermal fibroblasts over a fibronectin-coated surface. *Wound repair and regeneration*, 13(4), 422-433.
- Horobin, A. J., Shakesheff, K. M., Woodrow, S., Robinson, C., & Pritchard, D. I. (2003). Maggots and wound healing: an investigation of the effects of secretions from *Lucilia sericata* larvae upon interactions between human dermal fibroblasts and extracellular matrix components. *British Journal of Dermatology*, 148(5), 923-933.
- Huberman, L., Gollop, N., Mumcuoglu, K. Y., Block, C., & Galun, R. (2007a). Antibacterial properties of whole body extracts and haemolymph of *Lucilia sericata* maggots. *Journal of wound care*, 16(3), 123-127.
- Huberman, L., Gollop, N., Mumcuoglu, K. Y., Breuer, E., Bhusare, S. R., Shai, Y., & Galun, R. (2007b). Antibacterial substances of low molecular weight isolated from the blowfly, *Lucilia sericata*. *Medical and veterinary entomology*, 21(2), 127-131.
- Hunt, T.K., Hopf, H., Hussain, Z. (2000). Physiology of wound healing. *Adv Skin Wound Care* 13:6-11.
- IBS Newsletter #6. (2002). [online] Available at: <http://biotherapysociety.org/newsletter/> [Accessed 21 Jun. 2018].
- IDF (2017). *IDF Diabetes Atlas – 8th Edition*. [online] Available at: <http://www.diabetesatlas.org/> [Accessed 21 Jun. 2018].
- Imhof, R. E., De Jesus, M. E. P., Xiao, P., Ciortea, L. I., & Berg, E. P. (2009). Closed-chamber transepidermal water loss measurement: microclimate, calibration and performance. *International journal of cosmetic science*, 31(2), 97-118.
- Imokawa, G., Kuno, H., & Kawai, M. (1990). Stratum corneum lipids serve as a bound-water modulator. *Journal of investigative dermatology*, 96(6), 845-851.
- Ionescu-Tirgoviste, C., Gagniuc, P. A., Gubceac, E., Mardare, L., Popescu, I., Dima, S., & Militaru, M. (2015). A 3D map of the islet routes throughout the healthy human pancreas. *Scientific reports*, 5, 14634.
- Jacinto, A., Martinez-Arias, A., & Martin, P. (2001). Mechanisms of epithelial fusion and repair. *Nature cell biology*, 3(5), E117.
- Jacobi, J., Jang, J. J., Sundram, U., Dayoub, H., Fajardo, L. F., & Cooke, J. P. (2002). Nicotine accelerates angiogenesis and wound healing in genetically diabetic mice. *The American journal of pathology*, 161(1), 97-104.
- James, W. D., Berger, T. G., Elston, D. M., Odom, R. B. (2006). *Andrews' Diseases of the Skin: Clinical Dermatology*. Philadelphia: Saunders Elsevier.
- Jeffcoate, W. J., & Harding, K. G. (2003). Diabetic foot ulcers. *The lancet*, 361(9368), 1545-1551.
- Jelinek, J. E. (1993). The skin in diabetes. *Diabet Med*. 10:201-13.
- Jensen, J.A., Goodson, W.H., Hopf, H.W., Hunt, T.K. (1991). Cigarette smoking decreases tissue oxygen. *Arch Surg* 126:1131-1134.
- Jovanovic, A., Ermis, R., Mewaldt, R., Shi, L., & Carson, D. (2012). The influence of metal salts, surfactants, and wound care products on enzymatic activity of collagenase, the wound debriding enzyme. *Wounds*, 24(9), 242.
- Jude, E. B., & Boulton, A. J. M. (1999). End-stage complications of diabetic neuropathy. *Diabetes Reviews*, 7(4), 395-410.
- Juge-Aubry, C. E., Henrichot, E., & Meier, C. A. (2005). Adipose tissue: a regulator of inflammation. *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism*, 19(4), 547-566.
- Kahl, M., Gökçen, A., Fischer, S., Bäumer, M., Wiesner, J., Lochnit, G., ... & Preissner, K. T. (2015). Maggot excretion products from the blowfly *Lucilia sericata* contain contact phase/intrinsic pathway-like proteases with procoagulant functions. *Thrombosis and haemostasis*, 114(02), 277-288.
- Katzung, B.G., Staff, L. (2000). *Basic and clinical pharmacology*. New York, N.Y.: Lange Medical Books/McGraw-Hill.
- Kennedy, L., & Baynes, J. W. (1984). Non-enzymatic glycosylation and the chronic complications of diabetes: an overview. *Diabetologia*, 26(2), 93-98.

- Kerridge, A., Lappin-Scott, H., & Stevens, J. R. (2005). Antibacterial properties of larval secretions of the blowfly, *Lucilia sericata*. *Medical and veterinary entomology*, 19(3), 333-337.
- Keylock, K. T., Vieira, V. J., Wallig, M. A., DiPietro, L. A., Schrementi, M., & Woods, J. A. (2008). Exercise accelerates cutaneous wound healing and decreases wound inflammation in aged mice. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 294(1), R179-R184.
- Khoosal, D., & Goldman, R. D. (2006). Vitamin E for treating children's scars. Does it help reduce scarring?. *Canadian family physician*, 52(7), 855-856.
- Kiecolt-Glaser, J. K., Marucha, P. T., Mercado, A. M., Malarkey, W. B., & Glaser, R. (1995). Slowing of wound healing by psychological stress. *The Lancet*, 346(8984), 1194-1196.
- Kočiřová, A., Pisl, J., Link, R., Čonková, E., & Goldova, M. (2006). Maggot debridement therapy in the treatment of footrot and foot scald in sheep. *Acta Veterinaria Brno*, 75(2), 277-281.
- Kottner, J., Lichterfeld, A., & Blume-Peytavi, U. (2013). Transepidermal water loss in young and aged healthy humans: a systematic review and meta-analysis. *Archives of dermatological research*, 305(4), 315-323.
- Krischak, G. D., Augat, P., Claes, L., Kinzl, L., & Beck, A. (2007). The effects of non-steroidal anti-inflammatory drug application on incisional wound healing in rats. *Journal of wound care*, 16(2), 76-78.
- Kruglikova, A. A., & Chernysh, S. I. (2011). Antimicrobial compounds from the excretions of surgical maggots, *Lucilia sericata* (Meigen)(Diptera, Calliphoridae). *Entomological review*, 91(7), 813-819.
- Kwa, A. L., Tam, V. H., & Falagas, M. E. (2008). Polymyxins: a review of the current status including recent developments. *Ann Acad Med Singapore*, 37(10), 870-883.
- Kwa, A., Kasiakou, S. K., Tam, V. H., & Falagas, M. E. (2007). Polymyxin B: similarities to and differences from colistin (polymyxin E). *Expert review of anti-infective therapy*, 5(5), 811-821.
- Lantis, J. I., & Gordon, I. (2017). Clostridial Collagenase for the Management of Diabetic Foot Ulcers: Results of Four Randomized Controlled Trials. *Wounds: a compendium of clinical research and practice*, 29(10), 297-305.
- Larson, P. O. (1988). Topical hemostatic agents for dermatologic surgery. *The Journal of dermatologic surgery and oncology*, 14(6), 623-632.
- Lau, K., Paus, R., Tiede, S., Day, P., & Bayat, A. (2009). Exploring the role of stem cells in cutaneous wound healing. *Experimental dermatology*, 18(11), 921-933.
- Lawrence, W. T., Talbot, T. L., & Norton, J. A. (1986). Preoperative or postoperative doxorubicin hydrochloride (adriamycin): which is better for wound healing?. *Surgery*, 100(1), 9-13.
- Lawrence, W.T., (1998). Physiology of the acute wound. *Clin.Plast.Surg.* 25: 321-340.
- Lazarus, G. S., Cooper, D. M., Knighton, D. R., Margolis, D. J., Percoraro, R. E., Rodeheaver, G., & Robson, M. C. (1994). Definitions and guidelines for assessment of wounds and evaluation of healing. *Wound Repair and Regeneration*, 2(3), 165-170.
- Lepage, O. M., Doumbia, A., Perron-Lepage, M. F., & Gangl, M. (2012). The use of maggot debridement therapy in 41 equids. *Equine veterinary journal*, 44(S43), 120-125.
- Levin, J., & Maibach, H. (2005). The correlation between transepidermal water loss and percutaneous absorption: an overview. *Journal of controlled release*, 103(2), 291-299.
- Li, S., Huang, N. F., & Hsu, S. (2005). Mechanotransduction in endothelial cell migration. *Journal of cellular biochemistry*, 96(6), 1110-1126.
- Liao, H., Zakhaleva, J., & Chen, W. (2009). Cells and tissue interactions with glycated collagen and their relevance to delayed diabetic wound healing. *Biomaterials*, 30(9), 1689-1696.
- Lio, P. A., & Kaye, E. T. (2004). Topical antibacterial agents. *Infectious disease clinics of North America*, 18(3), 717-33.
- MacFaddin, J. F. (1985). *Media for isolation-cultivation-identification-maintenance of medical bacteria*. Williams & Wilkins.
- Mahajan, S., Koranne, R. V., & Sharma, S. K. (2003). Cutaneous manifestation of diabetes melitus. *Indian Journal of Dermatology, Venereology, and Leprology*, 69(2), 105.

- Martin, P. (1997). Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. *Science*, 276(5309), 75-81.
- Martini F.H., Nath J.L., Bartholomew E.F. (1998). *Fundamentals of Anatomy and Physiology*. New Jersey, N.J.: Prentice Hall.
- Marucha, P. T., Kiecolt-Glaser, J. K., & Favagehi, M. (1998). Mucosal wound healing is impaired by examination stress. *Psychosomatic medicine*, 60(3), 362-365.
- Mathieu, D., Linke, J. C., & Wattel, F. (2006). Non-healing wounds. In *Handbook on hyperbaric medicine* (pp. 401-428). Springer, Dordrecht.
- McCallon, S. K., Weir, D., & Lantis, J. C. (2014). Optimizing wound bed preparation with collagenase enzymatic debridement. *Journal of the American College of Clinical Wound Specialists*, 6(1), 14-23.
- McDaniel, J. C., Belury, M., Ahijevych, K., & Blakely, W. (2008). Omega-3 fatty acids effect on wound healing. *Wound Repair and Regeneration*, 16(3), 337-345.
- McGuckin, M., Goldman, R., Bolton, L., & Salcido, R. (2003). The clinical relevance of microbiology in acute and chronic wounds. *Advances in skin & wound care*, 16(1), 12-23.
- McMaster, S. K., Paul-Clark, M. J., Walters, M., Fleet, M., Anandarajah, J., Sriskandan, S., & Mitchell, J. A. (2008). Cigarette smoke inhibits macrophage sensing of Gram-negative bacteria and lipopolysaccharide: relative roles of nicotine and oxidant stress. *British journal of pharmacology*, 153(3), 536-543.
- Menke, N. B., & Diegelmann, R. F. (2006). Biochemical Pathways of Wound Healing: Implications for Development of Disease-Specific Diagnostics. *Advances in clinical chemistry*, 41, 167.
- Menke, N. B., Ward, K. R., Witten, T. M., Bonchev, D. G., & Diegelmann, R. F. (2007). Impaired wound healing. *Clinics in dermatology*, 25(1), 19-25.
- Mid Essex CCG (2018). *Clinical Guidelines for Larval Therapy (Maggots)*. [online] Available at: <https://midessexccg.nhs.uk/your-health-services/medicines-optimisation/clinical-pathways-and-medication-guidelines/chapter-13-skin-3?format=html> [Accessed 21 Jun. 2018].
- Miller, S. J., Burke, E. M., Rader, M. D., Coulombe, P. A., & Lavker, R. M. (1998). Re-epithelialization of porcine skin by the sweat apparatus. *Journal of Investigative Dermatology*, 110(1), 13-19.
- Milne, C. T., Ciccarelli, A. O., & Lassy, M. (2010). A comparison of collagenase to hydrogel dressings in wound debridement. *Wounds*, 22(11), 270-274.
- Monarch Labs (2017). *Medical Maggots™*. [online] Available at: <http://www.monarchlabs.com/pi> [Accessed 21 Jun. 2018].
- Morimoto, N., Takemoto, S., Kawazoe, T., & Suzuki, S. (2008). Nicotine at a low concentration promotes wound healing. *Journal of Surgical Research*, 145(2), 199-204.
- Mumcuoglu, K. Y. (2001). Clinical applications for maggots in wound care. *American journal of clinical dermatology*, 2(4), 219-227.
- Mumcuoglu, K. Y., Ingber, A., Gilead, L., Stessman, J., Friedmann, R., Schulman, H., & Bichucher, H. (1999). Maggot therapy for the treatment of intractable wounds. *International journal of dermatology*, 38(8), 623-627.
- Mumcuoglu, K. Y., Miller, J., Mumcuoglu, M., Friger, M., & Tarshis, M. (2001). Destruction of bacteria in the digestive tract of the maggot of *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae). *Journal of medical entomology*, 38(2), 161-166.
- Nakai, K., Yoneda, K., Ishihara, Y., Ohmori, K., Moriue, T., Igarashi, J., ... & Kubota, Y. (2011). Lipid peroxidation-induced VEGF expression in the skin of KKAY obese mice. *Experimental dermatology*, 20(5), 388-393.
- Naylor, E. C., Watson, R. E., & Sherratt, M. J. (2011). Molecular aspects of skin ageing. *Maturitas*, 69(3), 249-256.
- Ngo, B. T., Hayes, K. D., DiMiao, D. J., Srinivasan, S. K., Huerter, C. J., & Rendell, M. S. (2005). Manifestations of cutaneous diabetic microangiopathy. *American journal of clinical dermatology*, 6(4), 225-237.
- Nieman, D. C., Henson, D. A., Nehlsen-Cannarella, S. L., Ekkens, M., Utter, A. C., Butterworth, D. E., & Fagoaga, O. R. (1999). Influence of obesity on immune function. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*, 99(3), 294-299.
-

- Nigam, Y., Dudley, E., Bexfield, A., Bond, A. E., Evans, J., & James, J. (2010). The physiology of wound healing by the medicinal maggot, *Lucilia sericata*. In *Advances in insect physiology* (Vol. 39, pp. 39-81). Academic Press.
- Nishijima, A., Yamamoto, N., Yoshida, R., Yanagibayashi, S., Takikawa, M., Hayasaka, R., ... & Sekido, M. (2017). Maggot debridement therapy with a direct dressing can cause compression injuries in patients with chronic limb ischemia. *Case Reports in Plastic Surgery and Hand Surgery*, 4(1), 84-88.
- Nuesch, R., Rahm, G., Rudin, W., Steffen, I., Frei, R., Rufli, T., & Zimmerli, W. (2002). Clustering of bloodstream infections during maggot debridement therapy using contaminated larvae of *Protophormia terraenovae*. *Infection*, 30(5), 306-309.
- Pavlović, M. D., Milenković, T., Dinić, M., Mišović, M., Daković, D., Todorović, S., ... & Doder, R. (2007). The prevalence of cutaneous manifestations in young patients with type 1 diabetes. *Diabetes care*, 30(8), 1964-1967.
- Payne, W. G., Salas, R. E., Ko, F., Naidu, D. K., Donate, G., Wright, T. E., & Robson, M. C. (2008). Enzymatic debriding agents are safe in wounds with high bacterial bioburdens and stimulate healing. *Eplasty*, 8.
- Peck, G. W., & Kirkup, B. C. (2014). Biocompatibility of antimicrobials to maggot debridement therapy: medical maggots *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae) exhibit tolerance to clinical maximum doses of antimicrobials. *Journal of medical entomology*, 49(5), 1137-1143.
- Pecoraro, R. E., Reiber, G. E., & Burgess, E. M. (1990). Pathways to diabetic limb amputation: basis for prevention. *Diabetes care*, 13(5), 513-521.
- Petrakis, I., Kyriopoulos, I. J., Ginis, A., & Athanasakis, K. (2017). Losing a foot versus losing a dollar; a systematic review of cost studies in diabetic foot complications. *Expert review of pharmacoeconomics & outcomes research*, 17(2), 165-180.
- Ph. Eur. Sterility. (2005). European Pharmacopoeia 5.0, 2.6. Biological Tests, 2.6.1. Sterility. [online] Available at: <http://www.tailingood.com/en/download.php?15/36> [Accessed 21 Jun. 2018].
- Phillips, T. J., Dover, J. S. (1991). Leg ulcers. *J Am Acad Dermatol* 25:965-87.
- Pierce, G. F., Mustoe, T. A., Altmann, B. W., Deuel, T. F., & Thomason, A. (1991). Role of platelet-derived growth factor in wound healing. *Journal of cellular biochemistry*, 45(4), 319-326.
- Pieringer, H., Stuby, U., & Biesenbach, G. (2007, April). Patients with rheumatoid arthritis undergoing surgery: how should we deal with antirheumatic treatment?. In *Seminars in arthritis and rheumatism* (Vol. 36, No. 5, pp. 278-286). Elsevier.
- Plessis, J. D., Stefaniak, A., Eloff, F., John, S., Agner, T., Chou, T. C., ... & Holness, L. (2013). International guidelines for the in vivo assessment of skin properties in non-clinical settings: Part 2. transepidermal water loss and skin hydration. *Skin Research and Technology*, 19(3), 265-278.
- Polat, E., Cakan, H., Aslan, M. et al. (2012). "Detection of antileishmanial effect of the *Lucilia sericata* larval secretions in vitro and in vivo on *Leishmania tropica*: first work" , *Experimental Parasitology*, vol. 132, no. 2, pp. 129-134.
- Pomposelli, F. B., Jepsen, S. J., Gibbons, G. W., Campbell, D. R., Freeman, D. V., Miller, A., & LoGerfo, F. W. (1990). Efficacy of the dorsal pedal bypass for limb salvage in diabetic patients: short-term observations. *Journal of vascular surgery*, 11(6), 745-752.
- Pöppel, A. K., Koch, A., Kogel, K. H., Vogel, H., Kollwe, C., Wiesner, J., & Vilcinskis, A. (2014). Lucimycin, an antifungal peptide from the therapeutic maggot of the common green bottle fly *Lucilia sericata*. *Biological chemistry*, 395(6), 649-656.
- Price, P., Fogh, K., Glynn, C., Krasner, D. L., Osterbrink, J., & Sibbald, R. G. (2007). Why combine a foam dressing with ibuprofen for wound pain and moist wound healing?. *International wound journal*, 4, 1-3.
- Pritchard, D. I., Telford, G., Diab, M., & Low, W. (2012). Expression of a cGMP compatible *Lucilia sericata* insect serine proteinase debridement enzyme. *Biotechnology progress*, 28(2), 567-572.
- Profyris, C., Tziotzios, C., & Do Vale, I. (2012). Cutaneous scarring: Pathophysiology, molecular mechanisms, and scar reduction therapeutics: Part I. The molecular basis of scar formation. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 66(1), 1-10.
- Prost-Squarcioni, C. (2006). Histology of skin and hair follicle. *Medecine sciences: M/S*, 22(2), 131-137.
-

- Pubchem.ncbi.nlm.nih.gov. (2018a). *streptozotocin*. [online] Available at: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5300#section=Top> [Accessed 21 Jun. 2018].
- Pubchem.ncbi.nlm.nih.gov. (2018b). *polymyxin B sulfate*. [online] Available at: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5300#section=Top> [Accessed 21 Jun. 2018].
- Pubchem.ncbi.nlm.nih.gov. (2018c). *kanamycin sulfate salt*. [online] Available at: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5300#section=Top> [Accessed 21 Jun. 2018].
- Ramasastry, S. S. (2005). Acute wounds. *Clinics in plastic surgery*, 32(2), 195-208.
- Ramsey, S. D., Newton, K., Blough, D., McCulloch, D. K., Sandhu, N., Reiber, G. E., & Wagner, E. H. (1999). Incidence, outcomes, and cost of foot ulcers in patients with diabetes. *Diabetes care*, 22(3), 382-387.
- Ramundo, J., & Gray, M. (2009). Collagenase for enzymatic debridement: a systematic review. *Journal of Wound Ostomy & Continence Nursing*, 36(6S), S4-S11.
- Rathur, H. M., & Boulton, A. J. (2007). The diabetic foot. *Clinics in dermatology*, 25(1), 109-120.
- Reiber, G. E., & Ledoux, W. R. (2002). Epidemiology of diabetic foot ulcers and amputations: evidence for prevention. *The evidence base for diabetes care*, 641-665.
- Reinke, J. M., & Sorg, H. (2012). Wound repair and regeneration. *European Surgical Research*, 49(1), 35-43.
- Richardson, M. (2004). Acute wounds: an overview of the physiological healing process. *Nurs Times*. 100: 50-53.
- Rijal, N. (2016, October 6). *Thioglycollate broth: Principle, Composition, Preparation and Uses*. [online] Available at: <https://microbeonline.com/thioglycollate-broth-principle-composition-preparation-uses/> [Accessed 21 Jun. 2018].
- Robinson, W. (1935). Stimulation of healing in non-healing wounds: by allantoin occurring in maggot secretions and of wide biological distribution. *JBJS*, 17(2), 267-271.
- Robson, M. C. (1997). Wound infection: a failure of wound healing caused by an imbalance of bacteria. *Surgical Clinics*, 77(3), 637-650.
- Robson, M. C., Steed, D. L., & Franz, M. G. (2001). Wound healing: biologic features and approaches to maximize healing trajectories. *Current problems in surgery*, 38(2), 72-140.
- Rodriguez, P. G., Felix, F. N., Woodley, D. T., & Shim, E. K. (2008). The role of oxygen in wound healing: a review of the literature. *Dermatologic surgery*, 34(9), 1159-1169.
- Rogiers, V. (2001). EEMCO guidance for the assessment of transepidermal water loss in cosmetic sciences. *Skin Pharmacology and Physiology*, 14(2), 117-128.
- Roh, C., & Lyle, S. (2006). Cutaneous stem cells and wound healing. *Pediatric research*, 59(S4), 100R.
- Rosique, R. G., Rosique, M. J., Junior, F., & Jayme, A. (2015). Curbing inflammation in skin wound healing: a review. *International journal of inflammation*, 2015.
- Rother, K. I. (2007). Diabetes treatment-bridging the divide. *The New England journal of medicine*, 356(15), 1499.
- Rowan, M. P., Cancio, L. C., Elster, E. A., Burmeister, D. M., Rose, L. F., Natesan, S., ... & Chung, K. K. (2015). Burn wound healing and treatment: review and advancements. *Critical care*, 19(1), 243.
- Rowlatt, U. (1979). Intrauterine wound healing in a 20 week human fetus. *Virchows Archiv A*, 381(3), 353-361.
- Sakai, S., Endo, Y., Ozawa, N., Sugawara, T., Kusaka, A., Sayo, T., ... & Tagami, H. (2003). Characteristics of the epidermis and stratum corneum of hairless mice with experimentally induced diabetes mellitus. *Journal of investigative dermatology*, 120(1), 79-85.
- Sakai, S., Kikuchi, K., Satoh, J., Tagami, H., & Inoue, S. (2005). Functional properties of the stratum corneum in patients with diabetes mellitus: similarities to senile xerosis. *British Journal of Dermatology*, 153(2), 319-323.
- Samuels, P., Tan, A.K. (1999). Fetal scarless wound healing. *J Otolaryngol*. 28: 296-302.
- Sanei-Dehkordi, A., Khamesipour, A., Akbarzadeh, K., Akhavan, A. A., Mohammadi, A. M. A., Mohammadi, Y., ... & Rafinejad, J. (2016). Anti Leishmania activity of *Lucilia sericata* and *Calliphora vicina* maggots in laboratory models. *Experimental parasitology*, 170, 59-65.
- Santyl (2012). *Collagenase Ointment*. [package insert]. Fort Worth, TX: Healthpoint Biotherapeutics.

- Schmidtchen, A., Wolff, H., Rydengard, V., & Hansson, C. (2003). Detection of serine proteases secreted by *Lucilia sericata* in vitro and during treatment of a chronic leg ulcer. *Acta dermato-venereologica*, 83(4), 310-311.
- Seeley, W. W., Crawford, R., Rascovsky, K., Kramer, J. H., Weiner, M., Miller, B. L., & Gorno-Tempini, M. L. (2008). Frontal paralimbic network atrophy in very mild behavioral variant frontotemporal dementia. *Archives of neurology*, 65(2), 249-255.
- Seirafi, H., Farsinejad, K., Firooz, A., Davoudi, S. M., Robati, R. M., Hoseini, M. S., ... & Sadr, B. (2009). Biophysical characteristics of skin in diabetes: a controlled study. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 23(2), 146-149.
- Seité, S., Khemis, A., Rougier, A., & Ortonne, J. P. (2011). Importance of treatment of skin xerosis in diabetes. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 25(5), 607-609.
- Serup, J., Grove, G. L., & Jemec, G. B. (2006). *Handbook of non-invasive methods and the skin*. CRC press.
- Servold, S.A. (1991). Growth factor impact on woundhealing. *ClinPodiatr Med Surg*, 8: 937-953.
- Shepherd, A. A. (2003). Nutrition for optimum wound healing. *Nurs Stand* 18:55-58.
- Sherman, R. A. (1997). A new dressing design for use with maggot therapy. *Plastic and reconstructive surgery*, 100(2), 451-456.
- Sherman, R. A. (1998). Maggot therapy in modern medicine. *Infect Med*, 15, 651-656.
- Sherman, R. A. (2002). Maggot versus conservative debridement therapy for the treatment of pressure ulcers. *Wound Repair and regeneration*, 10(4), 208-214.
- Sherman, R. A. (2003). Maggot therapy for treating diabetic foot ulcers unresponsive to conventional therapy. *Diabetes care*, 26(2), 446-451.
- Sherman, R. A. (2009). Maggot therapy takes us back to the future of wound care: new and improved maggot therapy for the 21st century. *Journal of diabetes science and technology*, 3(2), 336-344.
- Sherman, R. A. (2014). Mechanisms of maggot-induced wound healing: what do we know, and where do we go from here?. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2014.
- Sherman, R. A., & Shimoda, K. J. (2004). Presurgical maggot debridement of soft tissue wounds is associated with decreased rates of postoperative infection. *Clinical infectious diseases*, 39(7), 1067-1070.
- Sherman, R. A., & TRAN, J. M. T. (1995). A simple, sterile food source for rearing the larvae of *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae). *Medical and Veterinary Entomology*, 9(4), 393-398.
- Sherman, R. A., Hall, M. J. R., & Thomas, S. (2000). Medicinal maggots: an ancient remedy for some contemporary afflictions. *Annual review of entomology*, 45(1), 55-81.
- Sherman, R. A., Morrison, S., & Ng, D. (2007). Maggot debridement therapy for serious horse wounds—a survey of practitioners. *The Veterinary Journal*, 174(1), 86-91.
- Sherman, R. A., Wyle, F., & Vulpe, M. (1995). Maggot therapy for treating pressure ulcers in spinal cord injury patients. *The journal of spinal cord medicine*, 18(2), 71-74.
- Shingel, K. I., Faure, M. P., Azoulay, L., Roberge, C., & Deckelbaum, R. J. (2008). Solid emulsion gel as a vehicle for delivery of polyunsaturated fatty acids: implications for tissue repair, dermal angiogenesis and wound healing. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, 2(7), 383-393.
- Siana, J. E., Rex, S., & Gottrup, F. (1989). The effect of cigarette smoking on wound healing. *Scandinavian Journal of Plastic and Reconstructive Surgery*, 23(3), 207-209.
- Sieggreen, M.Y. (1987). Healing of physical wounds. *NursClin North Am*. 22:439-447.
- Singh, B., Crippen, T. L., Zheng, L., Fields, A. T., Yu, Z., Ma, Q., ... & Tarone, A. M. (2015). A metagenomic assessment of the bacteria associated with *Lucilia sericata* and *Lucilia cuprina* (Diptera: Calliphoridae). *Applied microbiology and biotechnology*, 99(2), 869-883.
- Singh, N. M., Bhatia, S. K., & Singh, G. (2014). Maggots therapy in facilitating wound debridement: Present status. *Medical Journal of Dr. DY Patil Vidyapeeth*, 7(5), 639.
- Skover, G. R. (1991). Cellular and biochemical dynamics of wound repair. Wound environment in collagen regeneration. *Clinics in podiatric medicine and surgery*, 8(4), 723-756.

- Smith, K. G. V. (1986). *A Manual of Forensic Entomology*. Cornell University Press, Ithaca, New York.
- Smith, R. G. (2005). A critical discussion of the use of antiseptics in acute traumatic wounds. *Journal of the American Podiatric Medical Association*, 95(2), 148-153.
- Snyder, R. J., & Hanft, J. R. (2009). Diabetic foot ulcers—effects on quality of life, costs, and mortality and the role of standard wound care and advanced-care therapies in healing: a review. *Ostomy/wound management*, 55(11), 28.
- Sørensen, L. T., Jørgensen, S., Petersen, L. J., Hemmingsen, U., Bülow, J., Loft, S., & Gottrup, F. (2009). Acute effects of nicotine and smoking on blood flow, tissue oxygen, and aerobic metabolism of the skin and subcutis. *Journal of Surgical Research*, 152(2), 224-230.
- Sosenko, J. M., Kato, M., Soto, R., & Bild, D. E. (1990). Comparison of quantitative sensory-threshold measures for their association with foot ulceration in diabetic patients. *Diabetes care*, 13(10), 1057-1061.
- Spravchikov, N., Sizyakov, G., Gartsbein, M., Accili, D., Tennenbaum, T., & Wertheimer, E. (2001). Glucose effects on skin keratinocytes: implications for diabetes skin complications. *Diabetes*, 50(7), 1627-1635.
- Stacey, M. C., Mata, S. D., Trengove, N. J., & Mather, C. A. (2000). Randomised double-blind placebo controlled trial of topical autologous platelet lysate in venous ulcer healing. *European journal of vascular and endovascular surgery*, 20(3), 296-301.
- Stansly, P. G., Shepherd, R. G., & White, H. J. (1947). Polymyxin: a new chemotherapeutic agent. *Bulletin of the Johns Hopkins Hospital*, 81(1), 43.
- Steed, D. L. (2006). Clinical evaluation of recombinant human platelet-derived growth factor for the treatment of lower extremity ulcers. *Plastic and reconstructive surgery*, 117(7S), 143S-149S.
- Steed, D. L., Attinger, C., Colaizzi, T., Crossland, M., Franz, M., Harkless, L., ... & Sheehan, P. (2006). Guidelines for the treatment of diabetic ulcers. *Wound Repair and Regeneration*, 14(6), 680-692.
- Steenvoorde, P., Jacobi, C. E., & Oskam, J. (2005). Maggot debridement therapy: free-range or contained? An in-vivo study. *Advances in skin & wound care*, 18(8), 430-435.
- Steenvoorde, P., Jacobi, C. E., Van Doorn, L., & Oskam, J. (2007). Maggot debridement therapy of infected ulcers: patient and wound factors influencing outcome—a study on 101 patients with 117 wounds. *The Annals of The Royal College of Surgeons of England*, 89(6), 596-602.
- Stern, D. M., Du Yan, S., Yan, S. F., & Schmidt, A. M. (2002). Receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) and the complications of diabetes. *Ageing research reviews*, 1(1), 1-15.
- Sternberg, E. M. (2006). Neural regulation of innate immunity: a coordinated nonspecific host response to pathogens. *Nature Reviews Immunology*, 6(4), 318.
- Sternberg, M., Cohen-Forterre, L., & Peyroux, J. (1985). Connective tissue in diabetes mellitus: biochemical alterations of the intercellular matrix with special reference to proteoglycans, collagens and basement membranes. *Diabete & metabolisme*, 11(1), 27-50.
- Stevens, A., & Lowe J. (2005). *Ιστολογία*. Επιμ. Χ. Κίττας. Αθήνα: Π.Χ. Πασχαλίδης. 2007.
- Swift, M. E., Kleinman, H. K., & DiPietro, L. A. (1999). Impaired wound repair and delayed angiogenesis in aged mice. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 79(12), 1479-1487.
- Szkudelski, T. (2001). The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiological research*, 50(6), 537-546.
- Szpila, K., Hall, M. J. R., Pape, T., & Grzywacz, A. (2013). Morphology and identification of first instars of the European and Mediterranean blowflies of forensic importance. Part II. Luciliinae. *Medical and veterinary entomology*, 27(4), 349-366.
- Szycher, M., & Lee, S. J. (1992). Modern wound dressings: a systematic approach to wound healing. *Journal of biomaterials applications*, 7(2), 142-213.
- Takeshita, S., Zheng, L. P., Brogi, E., Kearney, M., Pu, L. Q., Bunting, S., ... & Isner, J. M. (1994). Therapeutic angiogenesis. A single intraarterial bolus of vascular endothelial growth factor augments revascularization in a rabbit ischemic hind limb model. *The Journal of clinical investigation*, 93(2), 662-670.

- Tamura, T., Cazander, G., Rooijackers, S. H., Trouw, L. A., & Nibbering, P. H. (2017). Excretions/secretions from medicinal larvae (*Lucilia sericata*) inhibit complement activation by two mechanisms. *Wound Repair and Regeneration*, 25(1), 41-50.
- Tandara, A. A., & Mustoe, T. A. (2004). Oxygen in wound healing—more than a nutrient. *World journal of surgery*, 28(3), 294-300.
- Tantawi, T. I., Gohar, Y. M., Kotb, M. M., Beshara, F. M., & El-Naggar, M. M. (2007). Clinical and microbiological efficacy of MDT in the treatment of diabetic foot ulcers. *Journal of wound care*, 16(9), 379-383.
- Tatnall, F. M., Leigh, I. M., & Gibson, J. R. (1990). Comparative study of antiseptic toxicity on basal keratinocytes, transformed human keratinocytes and fibroblasts. *Skin Pharmacology and Physiology*, 3(3), 157-163.
- Telford, G., Brown, A. P., Seabra, R. A. M., Horobin, A. J., Rich, A., English, J. S. C., & Pritchard, D. I. (2010). Degradation of eschar from venous leg ulcers using a recombinant chymotrypsin from *Lucilia sericata*. *British Journal of Dermatology*, 163(3), 523-531.
- Terra, W. R., & Ferreira, C. (1994). Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 109(1), 1-62.
- Thomas, S., Wynn, K., Fowler, T., & Jones, M. (2002). The effect of containment on the properties of sterile maggots. *British journal of nursing*, 11(Sup2), S21-S28.
- Thyssen, P. J., Nassau, M. P., Nitsche, M. J. T., & Leite, D. D. S. (2013). Sterilization of immature blowflies (*Calliphoridae*) for use in larval therapy. *Journal of Medicine and Medical Sciences*, 405-409.
- Tian, X., Liang, X. M., Song, G. M., Zhao, Y., & Yang, X. L. (2013). Maggot debridement therapy for the treatment of diabetic foot ulcers: a meta-analysis. *Journal of Wound care*, 22(9), 462-469.
- Tomizawa, Y. (2005). Clinical benefits and risk analysis of topical hemostats: a review. *Journal of Artificial Organs*, 8(3), 137-142.
- Tong, B. C., & Barbul, A. (2004). Cellular and physiological effects of arginine. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 4(8), 823-832.
- Tortora, G. J., Funke B. R., & Case C. L. (2007). *Εισαγωγή στη Μικροβιολογία*. Επιμ. Α. Τσακρής. Αθήνα: Π.Χ. Πασχαλίδης. 2009.
- Tsubery, H., Ofek, I., Cohen, S., & Fridkin, M. (2002). Structure activity relationship study of polymyxin B nonapeptide. In *The Biology and Pathology of Innate Immunity Mechanisms* (pp. 219-222). Springer, Boston, MA.
- Turkmen, A., Graham, K., & McGrouther, D. A. (2010). Therapeutic applications of the larvae for wound debridement. *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery*, 63(1), 184-188.
- Tziotzios, C., Profyris, C., & Sterling, J. (2012). Cutaneous scarring: pathophysiology, molecular mechanisms, and scar reduction therapeutics: part II. Strategies to reduce scar formation after dermatologic procedures. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 66(1), 13-24.
- van der Plas, M. J. A., van Dissel, J. T., Nibbering, P. H. (2009). Maggot secretions skew monocyte–macrophage differentiation away from a pro-inflammatory to a proangiogenic type. *PLoS ONE* 4, e8071.
- van der Plas, M. J. A., van der Does, A. M., Baldry, M., Dogterom-Ballering, H. C. M., van Gulpen, C., van Dissel, J. T., Nibbering, P. H. Jukema, G. N. (2007). Maggot excretions/secretions inhibit multiple neutrophil pro-inflammatory responses. *Microbes Infect.* 9, 507–514.
- van Emden, H. F. (2013). *Γεωργική Εντομολογία*. Μτφρ. Ε. Γ. Νικόλαος. Αθήνα: Επιστημονικές Εκδόσεις Παρισιάνου. 2014.
- Velkov, T., Roberts, K. D., Nation, R. L., Thompson, P. E., & Li, J. (2013). Pharmacology of polymyxins: new insights into an ‘old’ class of antibiotics. *Future microbiology*, 8(6), 711-724.
- Velnar, T., Bailey, T., & Smrkolj, V. (2009). The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. *Journal of International Medical Research*, 37(5), 1528-1542.
- Wagner, A. E., Huck, G., Stiehl, D. P., Jelkmann, W., & Hellwig-Bürgel, T. (2008). Dexamethasone impairs hypoxia-inducible factor-1 function. *Biochemical and biophysical research communications*, 372(2), 336-340.

- Waldron, D.R., Zimmerman-Pope, N. (2003). Superficial skin wounds. In: Textbook of small animal surgery. Slatter DH, editor. NY: Saunders, pp 260-271.
- Walters, K. A., & Roberts, M. S. (2002). The structure and function of skin. *Drugs and the pharmaceutical Sciences*, 119, 1-40.
- Wang, S. Y., Wang, K., Xin, Y., & Lv, D. C. (2010). Maggot excretions/secretions induces human microvascular endothelial cell migration through AKT1. *Molecular biology reports*, 37(6), 2719-2725.
- Waniczek, D., Kozowicz, A., Muc-Wierzgoń, M., Kokot, T., Świętochowska, E., & Nowakowska-Zajdel, E. (2013). Adjunct methods of the standard diabetic foot ulceration therapy. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013.
- Weil, G. C., Simon, R. J., & Sweadner, W. R. (1933). A biological, bacteriological and clinical study of larval or maggot therapy in the treatment of acute and chronic pyogenic infections. *The American Journal of Surgery*, 19(1), 36-48.
- Werner, S., & Grose, R. (2003). Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiological reviews*, 83(3), 835-870.
- Wertheimer, E., Trebicz, M., Eldar, T., Gartsbein, M., Nofeh-Moses, S., & Tennenbaum, T. (2000). Differential roles of insulin receptor and insulin-like growth factor-1 receptor in differentiation of murine skin keratinocytes. *Journal of Investigative Dermatology*, 115(1), 24-29.
- West, E., Simon, O. R., & Morrison, E. Y. (1996). Streptozotocin alters pancreatic beta-cell responsiveness to glucose within six hours of injection into rats. *The West Indian medical journal*, 45(2), 60-62.
- Whitaker, I. S., Twine, C., Whitaker, M. J., Welck, M., Brown, C. S., & Shandall, A. (2007). Larval therapy from antiquity to the present day: mechanisms of action, clinical applications and future potential. *Postgraduate medical journal*, 83(980), 409-413.
- Wilson, J. A., & Clark, J. J. (2004). Obesity: impediment to postsurgical wound healing. *Advances in skin & wound care*, 17(8), 426-432.
- Wilson, J. R., Mills, J. G., Prather, I. D., & Dimitrijevic, S. D. (2005). A toxicity index of skin and wound cleansers used on in vitro fibroblasts and keratinocytes. *Advances in skin & wound care*, 18(7), 373-378.
- Witte, M. B., Thornton, F. J., Tantry, U., & Barbul, A. (2002). L-Arginine supplementation enhances diabetic wound healing: involvement of the nitric oxide synthase and arginase pathways. *Metabolism-Clinical and Experimental*, 51(10), 1269-1273.
- Wolff, H., & Hansson, C. (2005). Rearing Larvae of *Lucilia sericata* for Chronic Ulcer Treatment—an Improved Method. *Acta dermato-venereologica*, 85(2).
- Wolgemuth, C. W. (2005). Lamellipodial contractions during crawling and spreading. *Biophysical journal*, 89(3), 1643-1649.
- Wollina, U., Liebold, K., Schmidt, W. D., Hartmann, M., & Fassler, D. (2002). Biosurgery supports granulation and debridement in chronic wounds—clinical data and remittance spectroscopy measurement. *International journal of dermatology*, 41(10), 635-639.
- World Health Organization (2018). *Ageing and Life Course*. [online] Available at: <http://www.who.int/ageing/en/> [Accessed 21 Jun. 2018].
- Wozniak, S. E., Gee, L. L., Wachtel, M. S., & Frezza, E. E. (2009). Adipose tissue: the new endocrine organ? A review article. *Digestive diseases and sciences*, 54(9), 1847-1856.
- Wright, J. B., Shi, L. (2003). Accuzyme[®] papain-urea debriding ointment: a historical review. *Wounds*, 15(4), 2S-12S.
- Yamaguchi, Y., & Yoshikawa, K. (2001). Cutaneous wound healing: an update. *The Journal of dermatology*, 28(10), 521-534.
- Yoon, H. S., Baik, S. H., & Oh, C. H. (2002). Quantitative measurement of desquamation and skin elasticity in diabetic patients. *Skin Research and Technology*, 8(4), 250-254.
- Zhai, B., Zhou, H., Yang, L., Zhang, J., Jung, K., Giam, C. Z., ... & Lin, X. (2010). Polymyxin B, in combination with fluconazole, exerts a potent fungicidal effect. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 65(5), 931-938.

- Zhai, H., & Maibach, H. I. (2002). Occlusion vs. skin barrier function. *Skin Research and technology*, 8(1), 1-6.
- Zhang, B., Numata, H., Mitsui, H., & Goto, S. G. (2009). A simple, heat-sterilizable artificial diet excluding animal-derived ingredients for adult blowfly, *Lucilia sericata*. *Medical and veterinary entomology*, 23(4), 443-447.
- Ziffren, S. E., Heist, H. E., May, S. C., & Womack, N. A. (1953). The secretion of collagenase by maggots and its implication. *Annals of surgery*, 138(6), 932.