



RĪGAS STRADIŅA  
UNIVERSITĀTE

Ingus Skadiņš

AR ANTIBIOTISKĀM VIELĀM  
IMPREGNĒTU KOMPOZĪTMATERIĀLU  
ANTIBAKTERIĀLĀ DARBĪBA  
*IN VITRO UN IN VIVO*

Promocijas darba kopsavilkums  
medicīnas doktora zinātniskā grāda iegūšanai

Specialitāte – mikrobioloģija

Rīga, 2016

Promocijas darbs izstrādāts Rīgas Stradiņa universitātē (RSU) Bioloģijas un mikrobioloģijas katedrā.

Darba zinātniskās vadītājas:

*Dr. med.* profesore **Juta Kroiča**,  
RSU Bioloģijas un mikrobioloģijas katedra, Latvija  
*Dr. med.* docente **Ilze Šalma**,  
RSU Sejas žokļu ķirurģijas katedra, Latvija

Oficiālie recenzenti:

*Dr. habil. med.* profesors **Jānis Vētra**,  
Rīgas Stradiņa universitāte, Latvija  
*Dr. habil. biol.* profesors **Aleksandrs Rapoportis**,  
Latvijas Universitāte  
*Dr. habil. sc. eng.* profesors **Gundars Mežinskis**,  
Rīgas Tehniskā universitāte, Latvija

Promocijas darba aizstāvēšana notiks 2016. gada 7. novembrī plkst. 15.00 Rīgas Stradiņa universitātes Medicīnas promocijas padomes atklātā sēdē Rīgā, Dzirciema ielā 16, Hipokrāta auditorijā.

Ar promocijas darbu var iepazīties RSU bibliotēkā un RSU mājas lapā:  
[www.rsu.lv](http://www.rsu.lv)

Promocijas padomes sekretārs:

*Dr. med.* profesors **Andris Juntiņš**

# SATURS

<b>Darbā lietotie saīsinājumi</b> .....	4
<b>1. Ievads</b> .....	5
<b>2. Materiāls un metodes</b> .....	9
2.1. Biomateriālu paraugi.....	9
2.1.1. HAp/PLLA+cipro un HAp/PLLA+genta .....	9
2.1.2. CDHAp/PCL+cipro, CDHAp/PCL+genta, CDHAp/PLLA+ cipro un CDHAp/PLLA+genta.....	10
2.2. Antibakteriālo īpašību noteikšana <i>in vitro</i> .....	11
2.2.1. Antibakteriālo īpašību noteikšana baktēriju suspensijā .....	11
2.2.2. Antibakteriālo īpašību noteikšana ar disku difūzijas metodi.....	12
2.3. Izmeklējamās baktēriju kultūras un to jutība pret gentamicīnu un ciprofloksacīnu.....	13
2.4. Iekaisuma intensitātes noteikšana <i>in vivo</i> .....	13
2.4.1. Eksperimentā izmantotie dzīvnieki.....	13
2.4.2. Operācijas gaita .....	13
2.4.3. Izmeklējamais materiāls .....	15
2.5. Statistikas metodes.....	15
<b>3. Rezultāti</b> .....	16
3.1. Antibiotisko vielu minimāli inhibējošā koncentrācija.....	16
3.2. HAp/PLLA+genta un HAp/PLLA+cipro antibakteriālā efektivitāte <i>in vitro</i> .....	16
3.3. CDHAp/PLLA+genta un CDHAp/PLLA+cipro antibakteriālā efektivitāte <i>in vitro</i> .....	21
3.4. CDHAp/PCL+genta un CDHAp/PCL+cipro antibakteriālā efektivitāte <i>in vitro</i> .....	24
3.5. IL-10 intensitāte <i>in vivo</i> .....	27
3.6. TNF- $\alpha$ intensitāte <i>in vivo</i> .....	29
3.7. Beta-defensīna-2 intensitāte <i>in vivo</i> .....	31
<b>4. Diskusija</b> .....	33
4.1. Kompozītmateriālu efektivitāte <i>in vitro</i> .....	33
4.2. Iekaisuma citokīnu ekspresija <i>in vivo</i> .....	44
<b>5. Secinājumi</b> .....	46
<b>6. Publikācijas un prezentācijas par pētījuma tēmu</b> .....	47
<b>7. Izmantotā literatūra</b> .....	52

## DARBĀ LIETOTIE SAĪSINĀJUMI

Saīsinājums	Nosaukums angļu valodā	Nosaukums latviešu valodā
BAI	<i>biomaterial associated infections</i>	biomateriālu saistītās infekcijas
CD	<i>calcium deficient</i>	kalcija deficīts
Cipro	<i>ciprofloxacin</i>	ciprofloksacīns
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>	enzīmu saistošā imūnabsorbcijas metode
Genta	<i>gentamicin</i>	gentamicīns
HAp	<i>hydroxyapatite</i>	hidroksiapatīts
MRSA	<i>methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i>	meticilīnrezistentais <i>Staphylococcus aureus</i>
MIC	<i>minimum inhibitory concentration</i>	minimāli inhibējošā koncentrācija
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>	fosfāta buferšķīdums
PCL	<i>polycaprolactone</i>	polikaprolaktons
PLGA	<i>poly(lactic-co-glycolic acid)</i>	polipien-ko-glikolskābe
PLLA	<i>polylactic acid</i>	polipienskābe
SEM	<i>canning electron microscope</i>	skenējošā elektronmikroskopija
TCP	<i>tricalcium phosphate</i>	trikalcija fosfāts
TNF- $\alpha$	<i>tumor necrosis factor</i>	tumora nekrozes faktors
TSA	<i>trypticase soy agar</i>	triptikāzes sojas agars
TSB	<i>trypticase soy broth</i>	triptikāzes sojas buljons
UV	<i>ultraviolet</i>	ultravioletais starojums

## IEVADS

Biomateriāli tiek izmantoti visās medicīnas nozarēs, lai aizvietotu cilvēka orgānus vai orgānu daļas, tādējādi uzlabojot pacientu dzīves kvalitāti un paildzinot dzīvildzi. Ortopēdijā biomateriālus izmanto, lai aizvietotu locītavas vai kaulus un to daļas, stomatoloģijā – kā zobu implantus, kardioloģijā – kā mākslīgos sirds vārstus vai kardiostimulatorus. Visās medicīnas nozarēs ļoti plaši tiek izmantoti tādi biomedicīniskie implantāti kā intravenozie katetri, urīnpūšļa katetri, intubācijas aprīkojums un citi biomateriālu veidotie medicīniskie aprīkojumi. Šo uzskaiti var turpināt ilgi un plaši, kas tikai apstiprina biomateriālu būtisko nozīmi mūsdienās (*Huebsch et al.*, 2009).

Ar biomateriālu izmantošanu diemžēl samērā bieži ir saistītas dažādas komplikācijas, un viena no tām ir bakteriāli ierosinātas BAI. Lai gan pirms un pēc biomateriālu implantācijas operācijām tiek veikti profilakses pasākumi, nodrošinot operāciju sterilitāti, kā arī citi profilaktiski pasākumi, lai samazinātu BAI risku un infekcijas attīstības plašumu. Kaut arī ortopēdisko implantātu infekciju attīstības risks ir tikai 1–3%, šo infekciju rezultātā pacientu letalitātes risks ir augsts (*Darouiche et al.*, 2001), kā arī palielinās kopējās ārstniecības izmaksas, kas saistīts ar ortopēdiskā implantāta aizvietošanu un ilgāku hospitalizācijas laiku (*Haenle et al.*, 2012).

BAI ir lokāla infekcija, kas var rasties pēc bakteriālas kontaminācijas operācijas laikā, pēcoperācijas periodā vai hematogēnas diseminācijas veidā no kāda cita cilvēka organisma infekcijas perēkļa. Ņemot vērā lokālās infekcijas īpatnības, efektīvākā BAI profilakse ir ar antibiotiskajām vielām apstrādātu biomateriālu lietošana, lai mazinātu bakteriālo adhēziju pie biomateriāliem un biofilmu veidošanos (*van de Belt et al.*, 2001).

Lai mazinātu BAI infekcijas risku, lokālai antibiotisko vielu izdalei no biomateriāla ir virkne priekšrocību, salīdzinot ar sistēmisku antibiotisko vielu lietošanu. Lokālā antibiotisko vielu izdale no biomateriāla ļauj samazināt

blakusparādību rašanās risku, kas rodas, sistēmiski lietojot antibiotiskās vielas (*Campoccia et al.*, 2010). Biežākās no šīm blakusparādībām ir alerģiskas reakcijas, toksicitāte un disbakteriozes.

Lietojot kompozītmateriālus ar antibiotiskajām vielām un to savienojumu ar bionoārdāmu polimēru, tiek panākta antibiotisko vielu vadāma, kontrolēta un ilglaicīga izdala, kas paildzina biomateriāla antibakteriālās īpašības (*Leprêtre et al.*, 2009).

Biomateriāla virsmai jāspēj ne tikai samazināt BAI risku, bet tai ir jābūt arī biosaderīgai ar apkārtējiem cilvēka audiem. To gan nosaka biomateriāla izmantošanas mērķis, jo neatkarīgi no biomateriāla sintēzes veida un pielietojuma tas tomēr cilvēka organismam ir svešķermenis (*Franz et al.*, 2011).

### **Darba mērķis**

*In vitro* un *in vivo* pētījumā noskaidrot, kāda kompozītmateriāliem ar antibiotiskajām vielām un ar biodegradējamu polimēru ir antibakteriālā efektivitāte pret biežākajiem pēcoperācijas infekciju ierosinātājiem – *P. aeruginosa* un *S. epidermidis*.

### **Darba hipotēzes**

- 1) Kompozītmateriāli ar biodegradējamu polimēru un antibiotiskajām vielām var būtiski samazināt pēcoperācijas infekcijas risku pēc implantātu izmantošanas.
- 2) Kompozītmateriāli ar biodegradējamu polimēru un antibiotiskām vielām var būtiskāk ietekmēt antibakteriālās īpašības, salīdzinot ar tādiem pašiem biomateriāliem bez polimēra pārklājuma.

- 3) PLLA un PCL atšķirīgi ietekmē kompozītmateriālu ar biodegradējamu polimēru un antibiotiskajām vielām antibakteriālo efektivitāti pret *S. epidermidis* un *P. aeruginosa*.
- 4) Iekaisuma citokīnu un antibakteriālo peptīdu ekspresija audos ap biomateriālu ir intensīvāka, implantējot antibiotiskās vielas nesaturošu biomateriālu.

### **Darba uzdevumi**

- 1) Izvērtēt dažādu kompozītmateriālu antibakteriālo efektivitāti pret *P. aeruginosa* un *S. epidermidis in vitro*.
- 2) Pētīt, kā biodegradējamais polimērs ietekmē biomateriālu antibakteriālo efektivitāti *in vitro*.
- 3) Salīdzināt PCL un PLLA ietekmi uz biomateriālu antibakteriālās darbības laiku.
- 4) Noteikt kompozītmateriālu ietekmi uz iekaisuma citokīna IL-10 un TNF- $\alpha$  un antibakteriālā peptīda  $\beta$ -defensīna-2 ekspresiju *in vivo*.
- 5) Izvērtēt kompozītmateriālu porainības līmeņa ietekmi uz biomateriālu antibakteriālās darbības laiku.

### **Darba novitāte**

Darbā pētītie biomateriāli ir Latvijā oriģināli sintezēti pēc jaunākajām un līdz šim neizmantotām metodēm. Pirmo reizi tiek detalizēti pētīta šāda veida biomateriālu antibakteriālā darbība *in vitro* un to biosaderība *in vivo*, nosakot iekaisuma citokīnus un antibakteriālos peptīdus. Biosaderība pētīta, izmantojot ELISA metodi. Metode iekaisuma procesa izvērtēšanai apkārtējos audos tieši pēc biomateriāla implantācijas Latvijā tiek izmantota pirmo reizi.

## **Materiāli tehniskais nodrošinājums**

Rīgas Stradiņa universitātes Bioloģijas un mikrobioloģijas katedra nodrošināja pētījuma *in vitro* realizāciju, kā arī ELISA kompleksus pētījumam *in vivo*. Pētījums *in vivo* tika veikts Rīgas Stradiņa universitātes eksperimenta dzīvnieku audzētavā. Pērtie biomateriāli tika oriģināli sintezēti Rīgas Tehniskās universitātes Rūdolfa Cimdiņa Rīgas biomateriālu inovāciju un attīstības centrā.

## **Darba ētiskie aspekti**

Pētījumam *in vivo* tika saņemta atļauja no Valsts Pārtikas un veterinārā dienesta, atļaujas Nr. 24 (sk. pielikumā).

## **Personīgais ieguldījums**

Autors pats ir veicis visus *in vitro* un *in vivo* pētījumus, patstāvīgi veicis ķirurģiskās operācijas eksperimentālajiem dzīvniekiem, audu paraugu savākšanu un izmeklēšanu, izmantojot molekulārās diagnostikas metodes.

## **Darba struktūra**

Zinātniskais darbs uzrakstīts uz 106 lapaspusēm, ietver šādas nodaļas: ievads, literatūras apskats, materiāls un metodes, rezultāti, diskusija, secinājumi, literatūras saraksts, pielikumi. Darbā iekļautas 9 tabulas un 69 attēli. Izmantoti 210 literatūras avoti.



# 1. MATERIĀLS UN METODEDES

## 1.1. Biomateriālu paraugi

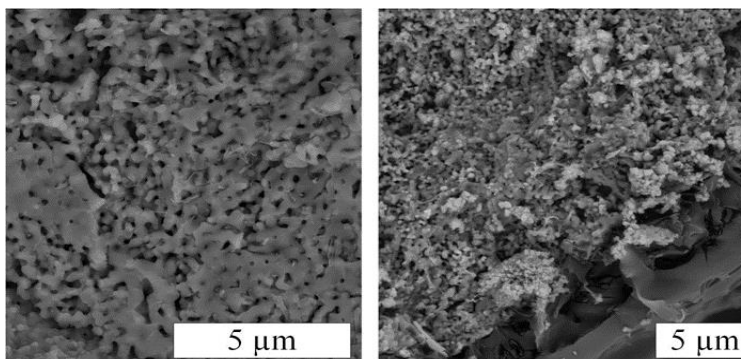
### 1.1.1. HAp/PLLA+cipro un HAp/PLLA+genta

Hidroksiapatīta pulveris tika sagatavots ar slapjās ķīmiskās nogulsnešanas metodi no kalcija oksīda (*Sigma-Aldrich, UK*,  $\geq 97\%$ ) un ortofosforskābes (*Sigma-Aldrich, UK*) šķīduma (*Sokolova et al.*, 2014). Iegūtie jaunsintezētie pulveri tika sapsēti tabletēs ( $d = 10$ ,  $H = 3$  mm). Visi paraugi tika termiski apstrādāti  $1100\text{ }^{\circ}\text{C}$  temperatūrā 1 stundu ilgi. Pirms HAp paraugu piesūci-nāšanas ar antibiotiskajām vielām gentamicīns (koncentrācija 40 mg/ml) vai ciprofloksacīns (koncentrācija 100 mg/10 ml) tika izšķīdināts dejonizētā ūdenī. HAp paraugi tika piesūcināti ar ūdens-zāļu šķīdumu istabas temperatūrā atmosfēras spiedienā, pēc tam žāvēti  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  temperatūrā. Daļa no sagatavo-tajiem paraugiem tika izmantoti pārklāšanai ar PLLA. PLLA pārklājums HAp paraugiem tika pagatavots no 10 wt% poli(L-pienskābes) (*Nature Works LLC*,  $M_w = 110$  kDa) šķīduma ar dihlorometānu (DCM) (*Sigma-Aldrich, UK*). PLLA tika izšķīdināts DCM šķīdumā, to maisot 2 stundas istabas temperatūrā. Polimēra šķīdums tika infiltrēts HAp biokeramikas paraugos, izmantojot vakuuma impregnēšanas metodi 500 mbar spiedienā 15 minūtes. Pārklātie paraugi tika žāvēti istabas temperatūrā 24 stundas ilgi.

Atvērtā un kopējā porainība tika noteikta ar Arhimēda metodi, kas balstīta uz to, ka pielietotais spēks ir vienāds ar pārvietotā šķīduma masu (*Locs et al.*, 2013). Atvērtās porainības līmenis ir 34%, bet kopējā porainība – 36%. Ar SEM izmeklējot pārklāto paraugu šķērsriezumu, bija redzams, ka HAp/PLLA paraugi, kas pārklāti ar 10 wt% PLLA, ir poraina mikrostruktūra ar poru izmēru diapazonu no 200 līdz 500 nm (1.1. attēls, kreisā puse). Tika iegūti paraugi ar PLLA pārklājumu, kas ir 2–5  $\mu\text{m}$  biezi (1.1. attēls, labā puse). Lai

izvērtētu, vai PLLA piemīt antibakteriālas īpašības, tika pagatavoti HAp/PLLA paraugi bez antibiotiskajām vielām.

Pēc šādas pašas metodikas tika pagatavoti  $\downarrow$ HAp/PLLA+cipro,  $\downarrow$ HAp+cipro un  $\downarrow$ HAp/PLLA paraugi ( $\downarrow$  – turpmāk darbā apzīmē kompozītmateriālus ar samazinātu porainības līmeni), kuriem atvērtā un kopējā porainība ir zemāka, respektīvi, 15% – atvērtā porainība un 19% – kopējā porainība. Paraugi sintezēti, lai noskaidrotu, kā porainības līmenis ietekmē antibakteriālas darbības laiku. Katrai kompozītmateriālu grupai pret abu baktēriju kultūrām tika izgatavoti 8 paralēlie sērijas paraugi.



1.2. attēls. HAp/PLLA šķērsgriezums (SEM)

### 1.1.2. CDHAp/PCL+cipro, CDHAp/PCL+genta, CDHAp/PLLA+cipro un CDHAp/PLLA+genta

Kalcija deficīta hidroksiapatīta pulveri ieguva, izmantojot slapjās ķīmiskās nogulsnesšanas metodi. Tika izmantoti šādi reaģenti: kalcija oksīds, iegūts no marmora (*Sigma-Aldrich, UK*,  $\geq 97\%$ , ortofosforskābe (*Sigma-Aldrich, UK*,  $\geq 85\%$  un dejonizēts ūdens. Kompozīta veidošanas procesā tika izvērtēti vairāki faktori, piemēram, pH, suspensijas temperatūra un skābe (*Sokolova et al.*, 2014).

PCL un CDHAp kompozīti ar biopolimēra sastāvu 20 wt% un PLLA un CDHAp kompozīti ar biopolimēra sastāvu 30 wt% tika sintezēti, izmantojot jaunu šķīdro/cieto suspensiju tehnoloģiju.

Gentamicīns 40 mg/ml koncentrācijā, bet ciprofloksacīns 100 mg/10 ml koncentrācijā tika izšķīdināts dejonizētā ūdenī. Iegūtos šķīdumus sajauc ar dažādiem CDHAp/PCL un CDHAp/PLLA pulveriem. Iegūtos pulvera maisījumus žāvēja istabas temperatūrā 24 stundas. Izzāvētie kompozīti tika sapresēti tabletēs (d = 12,5 mm, H = 2,2 mm). CDHAp/PCL un CDHAp/PLLA tablešu porainību noteica ar ģeometrisku metodi.

Lai izvērtētu, vai PLLA un PCL piemīt antibakteriālas īpašības, tika pagatavoti CDHAp/PCL un CDHAp/PLLA paraugi bez antibiotiskām vielām. Katrai kompozītmateriālu grupai pret abu baktēriju kultūrām tika izgatavoti 8 paralēlie sērijas paraugi. Kompozītmateriālos ar antibiotiskajām vielām vidējais antibiotisko vielu daudzums sasniedza 30 mg uz 0,5 g parauga. Paraugu vidējā masa bija 0,4 g.

Kalcija deficīta kompozītmateriāli pētījumā tika iekļauti, balstoties uz to, ka HAp/PLLA kompozītmateriāliem piemīt vājas kaulaudu atjaunošanas spējas, jo šūnas, kuras ir atbildīgas par kaulaudu atjaunošanos, nevar piesaistīties pie biomateriāla līdz PLLA pilnīgai biodegradācijai (Armentano *et al.*, 2010).

## **1.2. Antibakteriālo īpašību noteikšana *in vitro***

### **1.2.1. Antibakteriālo īpašību noteikšana baktēriju suspensijā**

Baktēriju suspensija tika pagatavota sterilos apstākļos no 1 ml TSB (*Oxoid, UK*) un 1 ml baktēriju ar optisko blīvumu 0,5 pēc Makfārlenda (*McFarland*) standarta. Pirms biomateriālu paraugu ievietošanas baktēriju suspensijā tie visi – katrs atsevišķi – tika ievietoti 1 ml truša plazmas (*BBL, USA*) un inkubēti termostatā (*Memmert, Vācija*) 37 °C temperatūrā un 100%

relatīvā mitrumā – divas stundas. Pēc divām stundām biomateriāla paraugi ar sterilas pincetes palīdzību tika pārvietoti uz mēģeni ar baktēriju suspensiju un 24 h inkubēti 37 °C. Baktēriju suspensija bez biomateriāla tika izmantota kā kontrole, lai salīdzinātu biomateriālu antibakteriālās īpašības, un arī 24 h tika inkubēta 37 °C.

Pēc 24 h inkubācijas 0,1 ml baktēriju suspensijas tika uzsēta uz TSA (*Oxoid, UK*), lai izvērtētu pētāmo biomateriālu antibakteriālās īpašības un efektivitāti. Tajā pašā laikā tika pagatavota jauna baktēriju suspensija un ar sterilas pincetes palīdzību pētāmo grupu biomateriāli tika pārvietoti jaunā TSB un baktēriju kultūru suspensijā uz nākamajām 24 h. Darbības tika atkārtotas katras 24 h, līdz izmeklējamo biomateriālu grupās divas dienas pēc kārtas vairs netika novērotas antibakteriālās īpašības, koloniju skaits uz TSA bija vienāds ar kontroles grupas koloniju skaitu uz TSA.

### **1.2.2. Antibakteriālo īpašību noteikšana ar disku difūzijas metodi**

*Kirby-Bauer* disku difūzijas metode ir standartizēta metode, ko izmanto mikrobioloģiskajās laboratorijās, lai noteiktu baktēriju jutību pret antibiotiskajām vielām (*Bauer et al.*, 1966). Atbilstoši EUCAST (*EUCAST*, 2015) standartiem tika pagatavota baktēriju suspensija ar optisko blīvumu 0,5 pēc Makfarlenda standarta ar Makfarlenda optisko densitometru (*Biosan*, Latvija). Pagatavotā baktēriju suspensija ar sterilu vates kociņu tika uzsēta uz sterilas TSA (*Oxoid, UK*) plates. Pēc baktēriju inokulācijas ar sterilu pinceti uz TSA tika novietoti biomateriālu diski un TSA barotne 24 h tika inkubēta termostatā 37 °C temperatūrā. Pēc 24 h tika analizētas biomateriālu paraugu antibakteriālās īpašības, izmērot sterilo zonu (diāmetru) ap biomateriālu diskiem. Pēc mērījumiem tika pagatavota jauna baktēriju suspensija, ko uzsēja uz jaunas, sterilas TSA barotnes, biomateriālu diskus pārnesa no vecās TSA barotnes uz jauno TSA barotni, un jauno barotni inkubēja vēl 24 h 37 °C. Darbības tika

atkārtotas ik pēc 24 h, līdz izmeklējamā biomateriālu grupās divas dienas pēc kārtas netika novērotas antibakteriālas īpašības jeb sterila zona ap biomateriālu paraugiem.

### **1.3. Izmeklējamās baktēriju kultūras un to jutība pret gentamicīnu un ciprofloksacīnu**

Visu biomateriālu antibakteriālās īpašības tika pētītas, izmantojot *S. epidermidis* (ATCC 12228) un *P. aeruginosa* (ATCC 27853) baktēriju references kultūras. Lai noteiktu baktēriju jutību pret antibiotiskajām vielām, tika izmantota antibiotisko stripu ražotāju ieteiktā procedūra. Uz Millera-Hintona (*Mueller-Hinton*) agara (*Oxoid, UK*) ar sterilu vates kociņu tika uzsētas baktērijas pēc 0,5 Makfarlenda standarta pagatavotas suspensijas. Pēc tam tika uzlikts gentamicīna vai ciprofloksacīna antibiotiskais strips (*Liofilchem, Itālija*). Agara plātes inkubēja 37 °C temperatūrā. Rezultātus izvērtēja pēc 24 h inkubācijas.

### **1.4. Iekaisuma intensitātes noteikšana *in vivo***

#### **1.4.1. Eksperimentā izmantotie dzīvnieki**

Lai noteiktu iekaisuma citokīnu intensitāti audos ap implantēto biomateriālu, eksperimentā tika izmantoti trīs mēnešus veci trušu tēviņi. Visi izmantotie truši bija 3 kg smagi. Eksperimenta sākumā un gaitā neviens no trušiem neslimoja, tika ievēroti visi ētiskie aspekti un saņemta atļauja no Valsts Pārtikas un veterinārā dienesta

#### **1.4.2. Operācijas gaita**

Pirms operācijas tika pagatavotas *P. aeruginosa* un *S. epidermidis* baktēriju suspensijas ar optisko blīvumu 0,5 pēc Makfarlenda standarta. Trusim skausta rajonā tika noskūts apmatojums un veikta ādas apstrāde ar joda šķīdumu. Noskūtajā un ar antiseptiskajiem līdzekļiem apstrādātajā skausta

rajonā veica lokālu atsāpināšanu ar 2% lidokaīna hidrohlorīda šķīdumu. Sterilos apstākļos, ar sterilu skalpeli veica ādas incīzija, izveidojot 2,5 cm lielu brūci. Pakāpeniski ar skalpeļa palīdzību izveidoja pietiekami lielu zemādas kabatu, kurā varētu implantēt biomateriāla tableti. Pēc biomateriāla ievietošanas zemādas kabatā brūce tika inficēta ar 0,1 ml baktēriju suspensiju. Pēc brūces inficēšanas ar baktēriju suspensiju brūce tika aizšūta ar steriliem diegiem. Tika uzliktas 3 līdz 4 šuves, cieši noslēdzot brūci. Pēcoperācijas periods pagāja bez komplikācijām, eksperimenta laikā neviens trusis neslimoja un neaizgāja bojā. Biomateriālu paraugi tika izņemti pēc 4 nedēļām, kas ir vislabākais laiks iekaisuma zonas izvērtēšanai ap biomateriālu un distancēti no tā, jo ilgākā laika periodā iekaisuma process var izsīkt. Savukārt par 4 nedēļām īsākā laika periodā ir grūti izvērtēt, vai iekaisuma reakcija ir no biomateriāla kontaminācijas vai tā ir normāla organisma imūnā atbilde uz ķirurģisko iejaukšanos.

Tika implantēti HAp/PLLA+cipro, HAp+cipro, HAp/PLLA, HAp/PLLA+genta un HAp+genta, kas bija inficēti ar *P. aeruginosa* vai *S. epidermidis* (1.1. tabula).

1.1. tabula

***In vivo* pētījumā izmantoto paraugu grupas**

Paraugu grupa	HAp	PLLA	cipro	genta	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. epidermidis</i>
A grupa	X	X	X		X	
B grupa	X	X	X			X
C grupa	X	X		X	X	
D grupa	X	X		X		X
E grupa	X		X		X	
F grupa	X		X			X
G grupa	X			X	X	
H grupa	X			X		X
I grupa	X	X			X	
J grupa	X	X				X

### 1.4.3. Izmeklējamais materiāls

Lai noteiktu IL-10, TNF- $\alpha$  un beta-defensīna-2 līmeni apkārtējos audos ap implantēto biomateriālu, tika izmantota standartizētā ELISA metode ar ELISA komplektiem (*USCN life science* un *MyBioSource, USA*). Četras nedēļas pēc biomateriālu implantācijas truši tika eitanizēti. Ar sterilu skalpeli tika pārgriezta dzīvnieka āda implantētā biomateriāla vietā. Tika savākti vienāda lieluma audu paraugi: trīs audu paraugi no tieši pieguļošiem audiem ap biomateriālu, trīs audu paraugi – no ārējās zonas ap biomateriālu un trīs audu paraugi – distancēti (1,5 cm) no implantētā biomateriāla vietas. Audus pirms homogenizācijas noskaloja ar aukstu PBS (0,01 mol/l, pH 7,0–7,2), lai noskalotu asiņu atlikumus no audiem. Audi tika sagriezti smalkākos gabaliņos un homogenizēti. Iegūto audu suspensiju ievietoja ultraskaņas vannā, lai pārplēstu šūnu membrānas, pēc tam to centrifugēja 5 minūtes ar 5000 apgriezieniem minūtē. Pēc ELISA standartizētas procedūras 96 iedobīšu mikroplati analizēja ar ELISA lasītāju spektrofotometriski, viļņa garums 450 nm  $\pm$  10 nm (*TECAN, Šveice*).

### 1.5. Statistiskās metodes

Iegūto rezultātu izvērtēšanai tika izvēlētas neparametriskās statistiskās metodes. Tika izmantots Manna–Vitnija tests (*Mann et al., 1947*), lai izvērtētu, vai ir statistiski ticamas atšķirības starp pētījumā izmantoto biomateriālu grupu antibakteriālo ilgumu. Par statistiski ticamu tika pieņemts, ja  $p$  vērtība ir mazāka vai vienāda ar 0,05. Rezultāti tika ievadīti *Microsoft Excel 2014*, un statistiskā analīze tika veikta ar *SPSS 22.0* (statistical package for the social sciences).

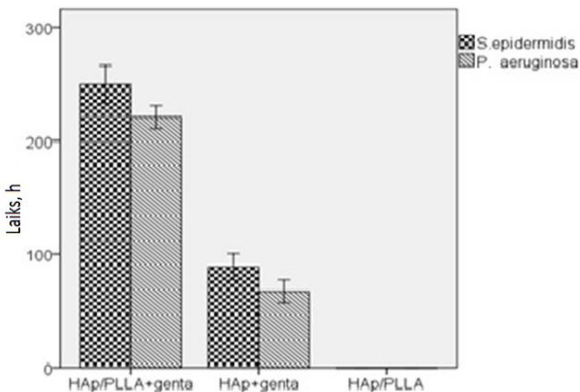
## 2. REZULTĀTI

### 2.1. Antibiotisko vielu minimāli inhibējošā koncentrācija

Izmantojot standartizēto E-testu metodi, tika noskaidrots, ka pētījumā izmantotās kultūras *P. aeruginosa* un *S. epidermidis* ir jutīgas pret pētījumā izmantotajām antibiotiskajām vielām. Ciprofloksacīna MIC pret *S. epidermidis* ir 0,094 µg/ml, pret *P. aeruginosa* – 0,125 µg/ml. Savukārt gentamicīna MIC pret *S. epidermidis* ir 0,19 µg/ml, pret *P. aeruginosa* – 1,0 µg/ml.

### 2.2. HAp/PLLA+genta un HAp/PLLA+cipro antibakteriālā efektivitāte *in vitro*

Izmantojot antibakteriālo īpašību noteikšanas metodi baktēriju suspensijā, ir redzams, ka HAp/PLLA+genta biomateriālu maksimālais antibakteriālās darbības ilgums pret *S. epidermidis* ir 264 h, bet minimālais antibakteriālais ilgums – 216 h, tādējādi vidējais antibakteriālais ilgums pret *S. epidermidis* ir 249,6 ± 16,78 h (2.1. attēls). HAp/PLLA biomateriālam antibakteriālās īpašības netika novērotas ne pret vienu no baktēriju kultūrām.



2.1.attēls. Vidējais antibakteriālais ilgums dažādiem kompozītmateriāliem ar gentamicīnu



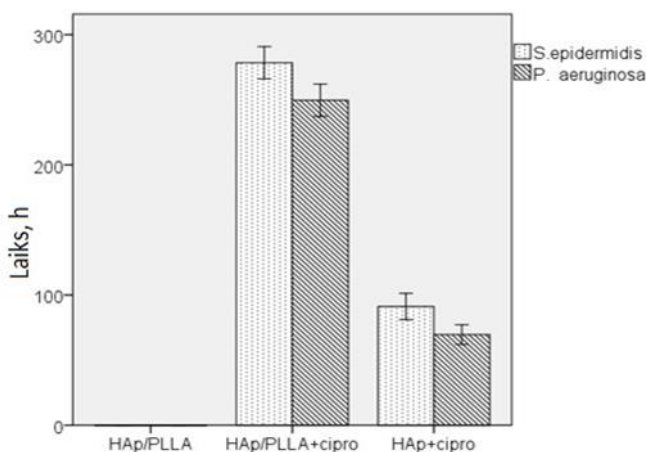
Biomateriāliem bez PLLA polimēra (HAp+genta) antibakteriālais ilgums ir ievērojami mazāks, to maksimālais antibakteriālais ilgums pret *S. epidermidis* ir 96 h, bet minimālais antibakteriālais ilgums ir 72 h, vidējais antibakteriālais ilgums ir  $88,8 \pm 11,59$  h. Izmantojot Manna–Vitnija testu, ir redzams, ka biomateriāliem ar PLLA un gentamicīnu ir statistiski ticami lielāks antibakteriālais ilgums pret *S. epidermidis* nekā biomateriāliem bez PLLA ( $p < 0,001$ ).

HAp/PLLA+genta un HAp+genta spēja inhibēt *S. epidermidis* augšanu *in vitro* kopumā ir atšķirīga, bet vienāda pirmajās trīs eksperimenta dienās, kad gandrīz visas *S. epidermidis* baktērijas tika inhibētas. Nākamajās eksperimenta dienās HAp/PLLA+genta saglabāja augstas *S. epidermidis* augšanas inhibīcijas spējas un zaudēja tās pakāpeniski, bet HAp+genta *S. epidermidis* augšanas inhibīcijas spējas zaudēja strauji.

Manna–Vitnija tests parādīja, ka starp HAp/PLLA+genta un HAp+genta biomateriālu grupām pret *P. aeruginosa* ir statistiski ticama atšķirība ( $p < 0,001$ ), un šo grupu maksimālais un vidējais antibakteriālais ilgums ir mazāks nekā pret *S. epidermidis*. Maksimālais HAp/PLLA+genta antibakteriālais ilgums pret *P. aeruginosa* ir 240 h, bet minimālais antibakteriālais ilgums – 216 h, kas ir vienāds arī pret *S. epidermidis*. HAp+genta maksimālais antibakteriālais ilgums pret *P. aeruginosa* ir 72 h, minimālais antibakteriālais ilgums – 48 h. Attiecīgi vidējais HAp/PLLA+genta antibakteriālais laiks pret *P. aeruginosa* ir  $220,8 \pm 10,11$  h, bet HAp+genta –  $67,2 \pm 10,11$  h.

HAp+genta un HAp/PLLA+genta *P. aeruginosa* augšanas inhibīcijas dinamika pirmajās 48 h statistiski ticami neatšķiras ( $p > 0,05$ ), bet, sākot ar trešo eksperimenta dienu, novēroja statistiski ticamas atšķirības ( $p < 0,001$ ) starp HAp/PLLA+genta un HAp+genta biomateriāliem pret *P. aeruginosa*. Līdzīgi kā *S. epidermidis* gadījumā, HAp/PLLA+genta biomateriāliem pret *P. aeruginosa* novēroja pakāpenisku antibakteriālo īpašību zudumu.

Līdzīgas tendences pret abām pētījumā izmantotajām baktēriju kultūrām ir gan HAp/PLLA+cipro un HAp+cipro biomateriāliem, gan HAp/PLLA+genta un HAp+genta gadījumā. HAp/PLLA+cipro maksimālais antibakteriālais laiks pret *S. epidermidis* bija 288 h, minimālais antibakteriālais laiks – 264 h. Savukārt HAp+cipro maksimālais un minimālais antibakteriālais laiks pret *S. epidermidis* bija līdzīgs kā HAp+genta un sasniedza attiecīgi 96 h un 72 h. Tādējādi vidējais antibakteriālais laiks biomateriāliem ar PLLA ir ilgāks nekā biomateriāliem bez PLLA (2.2. attēls).



## 2.2. attēls. Vidējais antibakteriālais laiks dažādiem kompozītmateriāliem ar ciprofloksacīnu

Vidējais HAp/PLLA+cipro antibakteriālais laiks pret *P. aeruginosa* ir īsāks nekā pret *S. epidermidis*. Starp HAp/PLLA+cipro un HAp+cipro pret *P. aeruginosa* tika novērota statistiski ticama atšķirība ( $p < 0,001$ ).

HAp/PLLA+cipro un HAp+cipro pilnībā inhibē *S. epidermidis* augšanu, kas pirmajās trijās eksperimenta dienās statistiski ticami neatšķiras ( $p > 0,05$ ), bet, sākot ar ceturto eksperimenta dienu – 96 stundu laika atzīmē, novēro

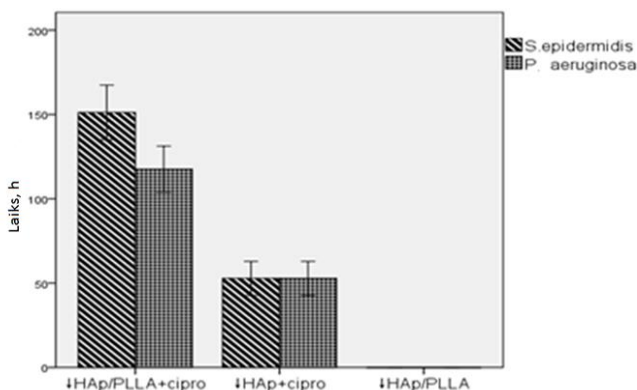
statistiski ticamas ( $p < 0,005$ ) atšķirības. Savukārt *P. aeruginosa* augšanas inhibīcijas dinamikā novēroja statistiski ticamas atšķirības ( $p < 0,05$ ) jau eksperimenta 72 h atzīmē.

Izmantojot Manna–Vitnija testu, var secināt, ka biomateriāli – HAp/PLLA+genta, HAp+genta, HAp/PLLA+cipro un HAp+cipro – nevienai no baktēriju kultūrām statistiski ticami nemaina ( $p > 0,05$ ) inhibēto baktēriju procentuālo daudzumu laika posmā no 24 h līdz 48 h.

Nosakot HAp/PLLA+cipro un HAp+cipro antibakteriālās īpašības pret abām baktēriju kultūrām ar disku difūzijas metodi, redzams, ka antibakteriālās izmeklēšanas metode neietekmē biomateriālu paraugu antibakteriālo laiku ne pret vienu no pētījumā izmantojamām baktēriju kultūrām. Tāpat neatšķiras arī *S. epidermidis* augšanas inhibīcija (3.7. attēls), jo HAp/PLLA+cipro savas antibakteriālās īpašības saglabā ilgu laika periodu un tās zaudē pakāpeniski, bet HAp+cipro savas antibakteriālās īpašības zaudē ļoti strauji, un 5 dienu laikā tās līdzinās nullei. Izmantojot disku difūzijas metodi, redzams, ka HAp+cipro biomateriāli izdala lielāku antibiotisko vielu koncentrāciju nekā HAp/PLLA+cipro, jo pirmajās eksperimenta dienās ir novērojams lielāks sterilās zonas diametrs, kas liecina par lielāku antibiotisko vielu difundēšanu no biomateriāla parauga. HAp+cipro arī pret *P. aeruginosa* izdala lielāku antibiotisko vielu daudzumu, jo sterilās zonas diametrs ir lielāks nekā HAp/PLLA+cipro.

Taču HAp/PLLA+cipro kopējais antibakteriālais laiks pret *P. aeruginosa* ir ilgāks nekā HAp+cipro, un tā antibakteriālās īpašības tika zaudētas pakāpeniski visa *in vitro* pētījuma laikā.

Biomateriāliem ar zemāku porainību – HAp/PLLA+cipro – statistiski ticami ( $p < 0,001$ ) atšķiras antibakteriālais laiks, salīdzinot ar biomateriāliem, kuriem ir augstāka porainība, – HAp/PLLA+cipro. Statistiski ticamas atšķirības ( $p < 0,001$ ) novēroja arī dažāda porainības līmeņa biomateriāliem bez PLLA ar antibiotiskām vielām (2.3. attēls).



2.3. attēls. **Vidējais antibakteriālais laiks kompozītmateriāliem ar samazinātu porainību un ciprofloksacīnu**

↓HAp+cipro *S. epidermidis* augšanas inhibīcijas spējas ir mazākas nekā HAp+cipro biomateriāliem ar augstāku porainību, kas liecina, ka no porainības līmeņa ir atkarīga biomateriālu spēja inhibēt baktēriju augšanu. Biomateriāliem ar PLLA spēja inhibēt *S. epidermidis* augšanu arī ir atkarīga no porainības līmeņa, ņemot vērā, ka HAp/PLLA+cipro antibakteriālais laiks ir ilgāks nekā ↓HAp/PLLA+cipro.

Porainības līmeņa ietekmi uz antibakteriālo laiku pierāda arī pētījums ar *P. aeruginosa* baktēriju kultūru, kurā redzams, ka zemākas porainības biomateriāliem piemīt īslaicīga *P. aeruginosa* augšanas inhibīcijas dinamika, salīdzinot ar augstākas porainības biomateriāliem.

Zemas porainības biomateriālu grupā statistiski ticamas inhibēto baktēriju procentuālās izmaiņas laikā no 24 h līdz 48 h tika novērotas ↓HAp+cipro pret *S. epidermidis* kultūru (Manna–Vitnija tests,  $p < 0,05$ ), tāpat arī statistiski ticami samazinājās pret *P. aeruginosa* kultūru ( $p < 0,05$ ).

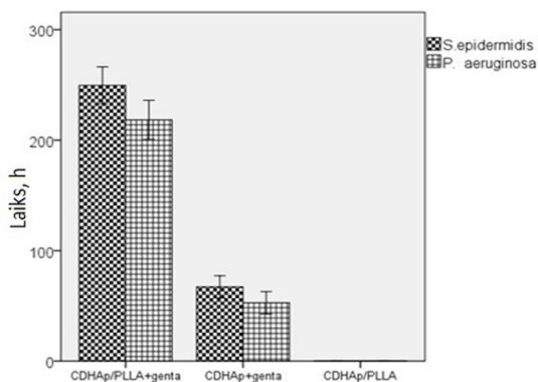
Pirmajās 24h neatkarīgi no PLLA esamības zema porainības līmeņa biomateriāliem statistiski ticamas izmaiņas netika novērotas ( $p < 0,05$ ), bet izmaiņas sāka notikt *in vitro* pētījuma 48h atskaites posmā un Manna–Vitnija

tests norādīja, ka zema porainības līmeņa biomateriāliem bez PLLA inhibēto baktēriju procentuālās izmaiņas samazinājums 48h ir statistiski ticami lielāks nekā zema porainības līmeņa biomateriāliem ar PLLA ( $p < 0,05$ ) neatkarīgi no baktēriju kultūras.

### 2.3. CDHAp/PLLA+genta un CDHAp/PLLA+cipro antibakteriālā efektivitāte *in vitro*

Izmantojot antibakteriālo īpašību noteikšanas metodi baktēriju suspensijā, tika noskaidrots, ka CDHAp/PLLA+genta maksimālais antibakteriālais laiks pret *S. epidermidis* ir 264 h, minimālais antibakteriālais laiks sasniedz 240 h, bet vidējais antibakteriālais laiks pret *S. epidermidis* ir  $249,6 \pm 16,78$  h (2.4. attēls).

CDHAp/PLLA biomateriālam pret *S. epidermidis* un *P. aeruginosa* antibakteriālās īpašības netika novērotas.



### 2.4. attēls. Vidējais antibakteriālais laiks kompozītmateriāliem ar kalcija deficītu un gentamicīnu

Ar Manna–Vitnija testu tika apstiprināts, ka CDHAp/PLLA+genta un CDHAp+genta antibakteriālie laiki pret *S. epidermidis* statistiski ticami ( $p <$

0,001) atšķiras. CDHAp/PLLA+genta pilnībā inhibēja *S. epidermidis* augšanu pētījuma pirmajās 5 dienās un pēc tam šīs spējas zaudēja pakāpeniski, savukārt CDHAp+genta pilnībā inhibēja *S. epidermidis* augšanu tikai pirmajā pētījuma dienā, bet jau otrajā dienā novēroja strauju antibakteriālo īpašību zudumu.

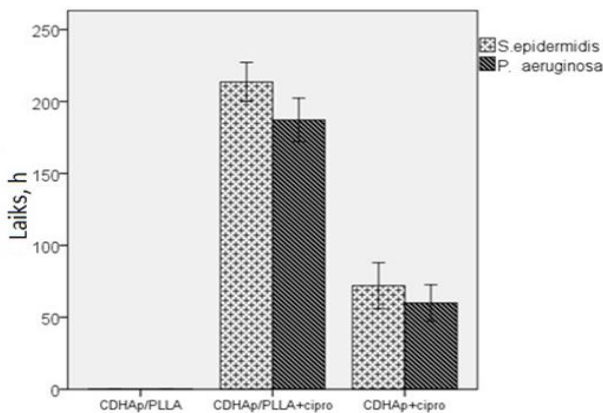
CDHAp+genta maksimālais antibakteriālais laiks pret *S. epidermidis* bija ir 72 h, un minimālais antibakteriālais laiks bija ir 48 h, veidojot vidējo antibakteriālo laiku  $67,2 \pm 10,11$  h. CDHAp/PLLA+genta un CHAp+genta spēja inhibēt *P. aeruginosa* augšanu ir līdzīga kā pret *S. epidermidis*, tikai CDHAp/PLLA+genta kopējā *P. aeruginosa* augšanas inhibīcijas dinamikā uzrāda ātrāku antibakteriālo īpašību zaudēšanu kopumā, kā arī maksimālais un minimālais antibakteriālais laiks ir atšķirīgs, un sasniedz attiecīgi 240 h un 196 h.

Statistiski ticamas izmaiņas no 24 h līdz 48 h tika novērotas CDHAp+genta pret *P. aeruginosa* baktēriju kultūru (Manna–Vitnija tests,  $p < 0,05$ ), tāpat kā statistiski ticami samazinājās pret *S. epidermidis* kultūru ( $p < 0,05$ ). Pārējiem CDHAp/PLLA+genta biomateriāliem statistiski ticamas izmaiņas netika novērotas (Manna–Vitnija tests,  $p > 0,05$ ).

Šādas statistiski ticamas izmaiņas no 24 h līdz 48 h arī nenovēroja CDHAp/PLLA+cipro un CDHAp+cipro ( $p > 0,05$ ) pret *S. epidermidis* un *P. aeruginosa*. CDHAp+cipro statistiski ticamas izmaiņas ( $p < 0,05$ ) novēroja pret abām *in vitro* pētījumā izmantotajām baktēriju grupām laika atskaites posmos no 48 h līdz 72 h, bet CDHAp/PLLA+cipro šādas statistiski ticamas izmaiņas minētajā laika posmā nenovēroja ne pret vienu no baktēriju kultūrām. CDHAp/PLLA+cipro novēroja *S. epidermidis* augšanas inhibīcijas spēju pakāpenisku zudumu, un, salīdzinot ar tās pašas grupas biomateriāliem bez PLLA (CDHAp+cipro), tā antibakteriālais laiks ir statistiski ticami ( $p < 0,001$ ) ilgāks pret *S. epidermidis*.

Ja salīdzina CDHAp/PLLA+cipro ar CDHAp/PLLA+genta antibakteriālo darbību pret *S. epidermidis*, tad var novērot, ka CDHAp/PLLA+cipro

antibakteriālais laiks ir īsāks un sasniedz  $213,6 \pm 13,62$  h (2.5. attēls). Maksimālais antibakteriālais laiks, ko spēja uzrādīt CDHAp/PLLA+cipro pret *S. epidermidis*, bija 240 h, minimālais – 192 h. CDHAp+cipro uzrādīja ilgāku antibakteriālo laiku pret *S. epidermidis* nekā CDHAp+genta, bet statistiski ticamas izmaiņas nenovēroja ( $p > 0,05$ ).



2.5. attēls. Vidējais antibakteriālais laiks kompozītmateriāliem ar ciprofloksacīnu un PLLA

CDHAp/PLLA+cipro un CDHAp+cipro saglabājas kompozītmateriāliem raksturīgas inhibīcijas spējas pret *P. aeruginosa*, jo CDHAp/PLLA+cipro gadījumā novēroja ilgstošas spējas nomākt *P. aeruginosa* baktēriju augšanu, un šīs spējas zuda pakāpeniski. CDHAp+cipro izteiktas antibakteriālās spējas novēroja pirmajās pētījuma dienās. Tika novērotas raksturīgas straujās antibakteriālo īpašību kritumu ar strauju antibiotisko vielu izdali pirmajās pētījuma dienās.

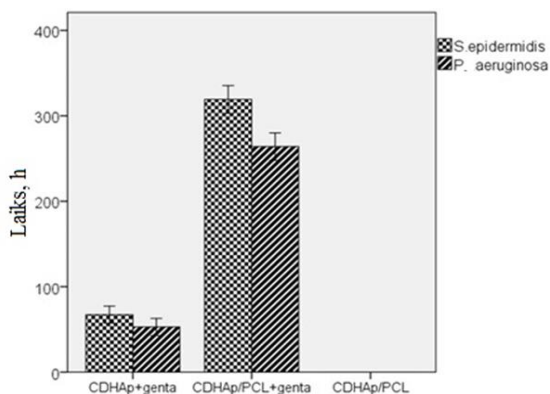
CDHAp+cipro biomateriālā statistiski ticamas inhibēto baktēriju procentuālās izmaiņas (Manna–Vitnija tests,  $p < 0,05$ ) novēroja pētījuma atskaites laika posmos no 48 h līdz 72 h pret *P. aeruginosa*. CDHAp+cipro maksimālais antibakteriālais laiks pret *P. aeruginosa* ir 72 h un minimālais

antibakteriālais laiks ir 48 h. Savukārt CDHAp/PLLA+cipro maksimālais antibakteriālais laiks pret *P. aeruginosa* ir ievērojami ilgāks nekā CDHAp+cipro, un sasniedz 192 h, bet tas ir mazāks nekā pret *S. epidermidis*. Novēro statistiski ticamas atšķirības (Manna–Vitnija tests,  $p < 0,001$ ) starp CDHAp/PLLA+cipro un CDHAp+cipro antibakteriālo laiku pret *P. aeruginosa*. Salīdzinot dažādu kompozītmateriālu antibakteriālās īpašības, redzams, ka ir statistiski ticamas (Manna–Vitnija tests,  $p < 0,001$ ) atšķirības starp Hap/PLLA+cipro un CDHAp/PLLA+cipro pret abām baktēriju kultūrām (3.27. attēls un 3.28. attēls), savukārt tiem pašiem kompozītmateriāliem ar gentamicīnu nenovēru statistiski ticamas (Manna–Vitnija tests,  $p > 0,05$ ) atšķirības pret abām baktēriju kultūrām.

#### **2.4. CDHAp/PCL+genta un CDHAp/PCL+cipro antibakteriālā efektivitāte *in vitro***

Pētījuma ietvaros tika izpētīti arī kompozītmateriāli ar citu bionoārdošos polimēru PCL, kuri savienoti ar antibiotiskajām vielām. Izmantojot Manna–Vitnija testu, ir redzams, ka CDHAp/PCL+genta biomateriāliem ir statistiski ticami ( $p < 0,001$ ) atšķirīgs antibakteriālais laiks nekā CDHAp/PLLA+genta pret *S. epidermidis*. Statistiski ticami atšķiras ( $p < 0,001$ ) arī CDHAp/PCL+genta antibakteriālais laiks, salīdzinot ar CDHAp+genta pret *S. epidermidis*. CDHAp/PCL+genta pētījumā parāda visilgāko antibakteriālo laiku (2.6. attēls) pret *S. epidermidis*, sasniedzot antibakteriālo ilgumu  $319,2 \pm 16,19$  h.





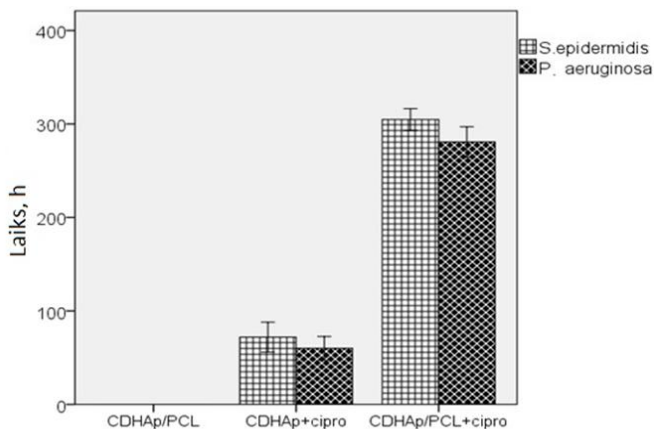
2.6. attēls. Vidējais antibakteriālais laiks kompozītmateriāliem ar gentamicīnu un PCL

Ilgais CDHAp/PCL+genta antibakteriālais laiks ir saistīts ar atsevišķu paraugu ilgo maksimālo antibakteriālo laiku pret *S. epidermidis* – 336 h, un minimālo antibakteriālo laiku – 288 h. Pret *P. aeruginosa* CDHAp/PCL+genta maksimālais antibakteriālais laiks sasniedz 288 h, bet minimālais antibakteriālais laiks ir 240 h.

CDHAp/PCL+genta CDHAp/PCL+genta spēja inhibēt *S. epidermidis* augšanu pilnībā saglabājas ilgu laiku no 192 h līdz 216 h, un arī vēlāk pilnībā *S. epidermidis* augšana netiek nomākta, antibakteriālās īpašības tiek zaudētas pakāpeniski. Biomateriālu paraugi bez PCL antibakteriālās spējas zaudē strauji, un *in vitro* pētījuma laika atzīmē no 24 h līdz 48 h novēro statistiski ticamas atšķirības inhibēto baktēriju procentuālajā rādītājā ( $p < 0,05$ ), izmantojot Manna–Vitnija testu.

Pilna *P. aeruginosa* augšanas inhibīcija CDHAp/PCL+genta tika novērota līdz pētījuma 168 stundu atzīmei. Pētījuma turpinājumā visiem kompozītmateriāliem ar antibiotiskajām vielām un bionoārdāmu polimēru novēroja kopēju tendenci, ka antibakteriālās spējas tiek zaudētas pakāpeniski.

CDHAp/PCL+genta pret *P.aeruginosa* nenovēroja statistiski ticamas ( $p > 0,05$ ) izmaiņas pētījuma laika posmā no 24 h līdz 48 h un arī pētījuma laika posmā no 48 h līdz 72 h, bet CDHAp+genta novēro statistiski ticamas ( $p < 0,05$ ) izmaiņas gan pētījuma laika posmā no 24 h līdz 48 h, gan pētījuma laika posmā no 48 h līdz 72h.



2.7. attēls. Vidējais antibakteriālais kompozītmateriāliem ar ciprofloksacīnu un PCL

Visilgāko antibakteriālo laiku pētījumā pret *P. aeruginosa* uzrāda CDHAp/PCL+cipro, sasniedzot  $280,8 \pm 16,19$  h. Maksimālais antibakteriālais laiks pret *P. aeruginosa* CDHAp/PCL+cipro ir 312 h, bet minimālais – 264 h (2.7. attēls). Manna–Vitnija tests uzrāda, ka starp CDHAp/PCL+cipro un CDHAp+cipro pret *P. aeruginosa* ir statistiski ticama atšķirība ( $p < 0,001$ ).

Kā rāda *P. aeruginosa* augšanas inhibīcijas dinamika, tad antibiotiskās vielas no CDHAp/PCL+cipro izdalās pakāpeniski un pietiekami lielā daudzumā, lai 168 līdz 192 h ilgi inhibētu visas *P. aeruginosa* baktērijas. Pēc šīs laika atzīmes izdalīto antibiotisko vielu daudzums vairs nav pietiekams, lai nomāktu visas *P. aeruginosa* baktērijas, bet pēc 336 h antibakteriālās īpašības

izzūd pavisam. CDHAp+cipro antibakteriālo īpašību zudums pret *P. aeruginosa* saskaņā ar Manna–Vitnija testu pētījuma laika posmā no 24 h līdz 48 h ir statistiski ticams ( $p < 0,05$ ). Šādas izmaiņas nenovēro CDHAp/PCL+cipro materiālam (statistiski ticami neatšķiras,  $p > 0,05$ ).

Salīdzinot CDHAp/PCL+cipro spēju inhibēt *P. aeruginosa* ar *S. epidermidis* augšanu, redzams, ka CDHAp/PCL+cipro nomāc lielāko daļu *S. epidermidis* ilgāku laika periodu nekā *P. aeruginosa*. Kopējais CDHAp/PCL+cipro antibakteriālais laiks pret *S. epidermidis* ir  $304,8 \pm 11,59$  h, maksimālais antibakteriālais laiks – 312 h, minimālais antibakteriālais laiks – 288 h. Starp CDHAp/PCL+cipro un CDHAp+cipro pret *S. epidermidis* novēro statistiski ticamas ( $p < 0,001$ ) atšķirības antibakteriālajā laikā.

## 2.5. IL-10 ekspresijas intensitāte *in vivo*

Kompozītmateriāliem – HAp/PLLA+genta, HAp/PLLA+cipro, HAp+genta un HAp+cipro, kas kontaminēti ar *S. epidermidis*, – neatkarīgi no izmeklējamo audu lokalizācijas attiecībā pret implantēto biomateriālu nenovēroja statistiski ticamas izmaiņas ( $p > 0,05$ , Manna–Vitnija tests), salīdzinot ar kontroles grupu (2.1. tabula). Savukārt kompozītmateriāliem bez antibiotiskajām vielām (ciprofloksacīna vai gentamicīna), kas kontaminēti ar *S. epidermidis* baktēriju suspensiju, IL-10 intensitātes paaugstināšanos novēroja statistiski ticami ( $p < 0,05$ , Manna–Vitnija tests) visos pētāmās grupas izmeklējamajos audos, salīdzinot ar kontroles grupu. Lielākā IL-10 intensitāte tika noteikta audos, kuri tieši kontaktē ar implantēto HAp/PLLA kompozītmateriālu. Statistiski ticamas ( $p > 0,05$ , Manna–Vitnija tests) izmaiņas nenovēroja IL-10 intensitātes līmenī starp audiem, kas ir tiešā kontaktā ar biomateriāliem, un audiem, kas ir tiešā kontakta ārējā zonā. Distancēti no implantētā HAp/PLLA atrodošajos audos novēroja statistiski ticamu ( $p < 0,05$ ) IL-10 intensitātes samazinājumu, salīdzinot ar IL-10 intensitāti tiešā kontakta

audos. Salīdzinot IL-10 intensitāti distancēti lokalizētajos audos ar kontroles grupas audiem, redzamas statistiski ticamas ( $p < 0,05$ ) atšķirības.

Kontaminējot HAp/PLLA+genta, HAp/PLLA+ciparo, HAp+genta un HAp+cipro ar *P. aeruginosa* baktēriju kultūru, neatkarīgi no izmeklējamu audu novietojuma ap biomateriālu netika novērotas statistiski ticamas atšķirības ( $p > 0,05$ ) IL-10 ekspresijā (2.2. tabula).

Manna–Vitnija tests parādīja statistiski ticamas ( $p < 0,05$ ) IL-10 līmeņa atšķirības starp kontroles grupas un pārējiem izmeklējamiem audiem HAp/PLLA implantācijas un *P. aeruginosa* kontaminācijas gadījumā.

Statistiski ticami ( $p < 0,05$ ) lielāka IL-10 intensitāte tika novērota tiešā kontakta audos – gan tieši kontaktējošos ar HAp/PLLA, gan tiešā kontakta ārējā malā –, salīdzinot ar kontroles grupu, bet statistiski ticamas ( $p > 0,05$ ) atšķirības starp abām (iekšējās un ārējās zonas) tiešā kontakta audu grupām netika atrastas. IL-10 intensitātes līmenis statistiski ticami ( $p < 0,05$ ) samazinās distancēti izmeklētajos audos, bet joprojām saglabājas statistiski ticamas ( $p < 0,05$ ) atšķirības ar izmeklēto kontroles grupu (veseliem dzīvniekiem bez biomateriāla implantācijas).

2.1. tabula

**IL-10 līmenis pēc brūces kontaminācijas ar *S. epidermidis* (pg/ml)**

Biomateriāla paraugs	Tiešā kontakta iekšējā zona	Tiešā kontakta ārējā zona	Distancēti	Kontroles grupa (bez implantācijas un brūces kontaminācijas)
HAp/PLLA+cipro	131 ± 4,04	131 ± 7,00	133 ± 5,29	133 ± 7,63
HAp+cipro	137 ± 2,00	135 ± 2,64	139 ± 1,00	133 ± 7,63
HAp/PLLA+genta	133 ± 5,69	134 ± 6,03	133 ± 7,64	133 ± 7,63
HAp+genta	132 ± 5,69	135 ± 6,56	133 ± 8,19	133 ± 7,63
HAp/PLLA	204 ± 4,04	194 ± 2,04	156 ± 3,00	133 ± 7,63

**IL-10 līmenis pēc brūces kontaminācijas ar *P. aeruginosa* (pg/ml)**

Biomateriāla paraugs	Tiešā kontakta iekšējā zona	Tiešā kontakta ārējā zona	Distancēti	Kontroles grupa (bez implantācijas un brūces kontaminācijas)
HAp/PLLA+cipro	133 ± 5,51	132 ± 3,79	133 ± 6,66	133 ± 7,63
HAp+cipro	135 ± 6,03	131 ± 7,37	133 ± 6,11	133 ± 7,63
HAp/PLLA+genta	133 ± 3,46	131 ± 6,00	137 ± 4,58	133 ± 7,63
HAp+genta	135 ± 6,11	132 ± 4,04	132 ± 1,01	133 ± 7,63
HAp/PLLA	212 ± 4,58	206 ± 2,64	150 ± 5,56	133 ± 7,63

**2.6. TNF-alfa ekspresijas intensitāte *in vivo***

TNF-alfa TNF-alfa intensitātes līmenis izmeklējamajos audos gan *S. epidermidis* (2.3. tabula), gan *P. aeruginosa* (2.4. tabula) kontaminācijas gadījumā neizmainās un netiek novērotas statistiski ticamas ( $p > 0,05$ ) atšķirības ar kontroles grupu, ja tiek implantēti kompozītmateriāli ar antibiotiskajām vielām.

Intensīvāko TNF-alfa ekspresiju novēro tiešā kontaktā esošos audos ap HAp/PLLA, kas kontaminēts ar *S. epidermidis* vai *P. aeruginosa*. TNF-alfa ekspresija abu baktēriju kontaminācijas gadījumā ir statistiski ticami ( $p < 0,001$ ) intensīvāka, salīdzinot ar kontroles grupu. Ja HAp/PLLA tiek kontaminēts ar *P. aeruginosa*, novēro visintensīvāko TNF-alfa ekspresiju tiešā kontakta audos. Pēc TNF-alfa intensitātes no HAp/PLLA distancēti novietotajos audos var spriest, ka iekaisuma zona samazinās, jo abu baktēriju kultūru gadījumā novēro statistiski ticamu ( $p < 0,05$ ) atšķirību TNF-alfa intensitātē starp tiešā kontakta audiem un distancēti novietotajiem audiem. Iespējams, ka iekaisuma zona ir lielāka, ņemot vērā, ka TNF-alfa intensitātes

līmenis abu baktēriju kultūru gadījumos distancēti novietotajos audos ir statistiski ticami ( $p < 0,05$ ) lielāks nekā kontroles grupai.

2.3. tabula

**TNF-alfa līmenis pēc brūces kontaminācijas ar *S. epidermidis* (pg/ml)**

Biomateriāla paraugs	Tiešā kontakta iekšējā zona	Tiešā kontakta ārējā zona	Distancēti	Kontroles grupa (bez implantācijas un brūces kontaminācijas)
HAp/PLLA+cipro	177 ± 9,60	176 ± 10,5	171 ± 1,52	177 ± 7,63
HAp+cipro	174 ± 8,38	168 ± 3,51	166 ± 4,04	177 ± 7,63
HAp/PLLA+genta	181 ± 5,03	179 ± 2,08	176 ± 7,09	177 ± 7,63
HAp+genta	185 ± 2,08	182 ± 1,53	173 ± 6,11	177 ± 7,63
HAp/PLLA	271 ± 3,21	268 ± 3,78	213 ± 1,52	177 ± 7,63

2.4. tabula

**TNF-alfa līmeņi pēc brūces kontaminācijas ar *P. aeruginosa* (pg/ml)**

Biomateriāla paraugs	Tiešā kontakta iekšējā zona	Tiešā kontakta ārējā zona	Distancēti	Kontroles grupa (bez implantācijas un brūces kontaminācijas)
HAp/PLLA+cipro	178 ± 7,54	174 ± 7,21	173 ± 2,00	177 ± 7,63
HAp+cipro	180 ± 5,13	177 ± 7,63	173 ± 5,77	177 ± 7,63
HAp/PLLA+genta	170 ± 2,65	168 ± 2,52	174 ± 6,43	177 ± 7,63
HAp+genta	174 ± 11,14	170 ± 12,86	170 ± 8,66	177 ± 7,63
HAp/PLLA	271 ± 3,21	268 ± 3,78	213 ± 1,52	177 ± 7,63

## 2.7. Beta-defensīna-2 ekspresijas intensitāte *in vivo*

Intensīvākā beta-defensīna-2 ekspresija notiek audos, kas ir visciešākajā kontaktā ar *S. epidermidis* kontaminētu HAp/PLLA (2.5. tabula); salīdzinot ar kontroles grupas beta-defensīna-2 līmeni, novēroja statistiski ticamas izmaiņas ( $p < 0,05$ ). Starp tiešā kontakta ārējo un iekšējo audu zonu nenovēroja statistiski ticamas izmaiņas ( $p > 0,05$ ). Statistiski ticamas ( $p < 0,05$ ) izmaiņas beta-defensīna-2 intensitātes līmenī novēro starp tiešā kontakta zonu un distancēti novietotajiem audiem HAp/PLLA implantācijas gadījumā, kas liecina par beta-defensīna-2 intensitātes samazinājumu. Beta-defensīna-2 līmeņa izmaiņas audos netika novērotas, implantējot kompozītmateriālu ar antibiotiskajām vielām.

Kontaminējot HAp/PLLA+cipro, HAp+cipro, HAp/PLLA+genta un HAp+genta ar *P. aeruginosa*, pēc 4 nedēļu implantācijas nenovēroja beta-defensīna-2 līmeņa izmaiņas, salīdzinot ar kontroles grupu (2.6. tabula). Izmaiņas beta-defensīna-2 intensitātes līmenī novēroja audos pēc HAp/PLLA implantācijas un kontaminācijas ar *P. aeruginosa*.

Līdzīgi kā *S. epidermidis* kontaminācijas gadījumā, arī *P. aeruginosa* kontaminācijas gadījumā visintensīvāko beta-defensīna-2 ekspresiju novēroja tiešā kontakta audos ap HAp/PLLA.

Beta-defensīna-2 intensitātes līmenis statistiski ticami ( $p < 0,05$ ) samazinās distancēti atrodošajos audos, salīdzinot ar tiešā kontakta audu zonu, bet nav statistiski ticama ( $p > 0,05$ ) atšķirība starp beta-defensīna-2 intensitātes līmeni distancēti novietotajos audos un kontroles grupu.

2.5. tabula

**Beta-defensīna-2 līmeņi pēc brūces kontaminācijas ar *S. epidermidis*  
(pg/ml)**

Biomateriāla paraugs	Tiešā kontakta iekšējā zona	Tiešā kontakta ārējā zona	Distancēti	Kontroles grupa (bez implantācijas un brūces kontaminācijas)
HAp/PLLA+cipro	326 ± 4,04	316 ± 3,21	319 ± 6,55	324 ± 11,01
HAp+cipro	323 ± 6,24	319 ± 1,00	316 ± 4,00	324 ± 11,01
HAp/PLLA+genta	325 ± 2,52	317 ± 2,65	321 ± 3,21	324 ± 11,01
HAp+genta	319 ± 3,21	320 ± 2,00	317 ± 4,58	324 ± 11,01
HAp/PLLA	395 ± 4,35	394 ± 4,35	339 ± 3,50	324 ± 11,01

2.6. tabula

**Beta-defensīna-2 līmeņi pēc brūces kontaminācijas ar *P. aeruginosa*  
(pg/ml)**

Biomateriāla paraugs	Tiešā kontakta iekšējā zona	Tiešā kontakta ārējā zona	Distancēti	Kontroles grupa (bez implantācijas un brūces kontaminācijas)
HAp/PLLA+cipro	324 ± 4,93	312 ± 1,00	319 ± 1,00	324 ± 11,01
HAp+cipro	323 ± 1,12	319 ± 6,65	315 ± 1,00	324 ± 11,01
HAp/PLLA+genta	323 ± 6,11	317 ± 2,65	317 ± 3,61	324 ± 11,01
HAp+genta	318 ± 1,00	319 ± 3,51	317 ± 1,00	324 ± 11,01
HAp/PLLA	395 ± 4,35	394 ± 4,35	339 ± 3,50	324 ± 11,01



## 3. DISKUSIJA

### 3.1. Kompozītmateriālu efektivitāte *in vitro*

Biomateriālu izmantošana medicīnā, lai aizvietotu orgāna vai tā daļu funkcijas, kļūst arvien plašāka, lai nodrošinātu pacientu dzīves kvalitāti un ilgumu (piemēram, mākslīgais sirds vārstulis).

Gandrīz visās medicīnas nozarēs tiek izmantoti biomedicīniskie implantāti diagnostisko manipulāciju vai terapijas nolūkos – intravenozie un urīnpūšļa katetri, intubācijas aprīkojums, locītavu protēzes un cits biomedicīniskais aprīkojums. Taču, lietojot šos biomedicīniskos implantātus, pastāv infekcijas attīstības risks (*Huebsch et al.*, 2009).

Papildu infekcija, kas rodas blakus jau esošai saslimšanai, paildzina pacienta hospitalizācijas laiku, palielina ārstēšanas izmaksas un letalitātes risku. Biomateriālu saistītās infekcijas (BAI) attīstības risks visiem pacientiem nav vienāds; to nosaka vairāki faktori, kas saistīti ar pašu pacientu, implantanta veidu un operācijas apjomu. Gados vecākiem vai imūnsupresētiem pacientiem, pacientiem ar ļaundabīgo audzēju vai ar ādas bojājumiem ir lielāks BAI risks, jo šo pacientu imūnās sistēmas darbības spējas pret BAI ierosinātajiem ir samazinātas (*Laupland et al.*, 2006; *Goldmann et al.*, 1993, *Greco et al.*, 2015).

BAI risku nosaka operācijas apjoms un operācijas vietas sterilitāte. Ortopēdisko operāciju laikā brūces apjoms ir liels, brūce var kalpot par baktēriju ieejas vārtiem, kam seko BAI attīstība. Operāciju zāles gaisa mikroflora, pacienta ādas un gļotādas mikroflora un personāla mikroflora ir infekcijas izraisīto baktēriju avots (*Vinh et al.*, 2005).

Zobu implantātus un mutes dobumu operācijas notiek vidē, kurā ir atrodama viena no bagātākajām cilvēka normālajām mikroflorām. Lai arī šīs baktērijas pieder pie normālās cilvēka mikrofloras, tās vienlaicīgi ir

oportūnistiskās baktērijas. Šādas ķirurģiskās manipulācijas dod iespēju baktērijām ierosināt BAI (*Heydenrijk et al., 2002*).

Atsevišķu BAI attīstības risks nav liels, taču letalitātes risks ir augsts. Letalitātes risks ir atkarīgs no pacienta veselības stāvokļa, infekcijas lokalizācijas un plašuma. Urīnceļu infekcijas pēc urīnpūšļa katetrizācijas attīstās apmēram 30% gadījumu, bet pacientu letalitāte šo infekciju dēļ tiek vērtēta kā ļoti zema. Savukārt mākslīgo sirds vārstuļu infekcijas attīstās 1–3% gadījumu, bet pacientu letalitātes risks šo infekciju dēļ ir vērtējams kā augsts (*Darouiche et al., 2001, Wright et al., 2013*).

Lai samazinātu BAI attīstības iespēju, slimnīcās pirms un pēc implantācijas operācijas tiek nozīmēta antibiotisko vielu terapija, kuras mērķis ir samazināt iespējamo oportūnistisko baktēriju klātbūtni un iespēju ierosināt infekcijas, kā arī samazināt biomateriālu kontaminācijas risku operācijas laikā vai pēcoperācijas periodā (*von Eiff et al., 2005*).

Sistēmiskai antibiotisko vielu lietošanai ir vairāki trūkumi, saļīdzinot ar lokālu antibiotisko vielu lietošanu. Viena no biežākajām problēmām ir disbakteriozes attīstība, kad tiek iznīcināta cilvēka normālā mikroflora kuņģa un zarnu traktā, mutes dobumā vai citās ķermeņa daļās. Disbakterioze var kalpot kā veicinošs faktors citu baktēriju ierosinātām infekcijām, piemēram, *C. difficile* ierosinātam pseidomembranozam kolītam (*Mylonakis et al., 2001, Aldrete Sdel et al., 2015*).

Lietojot antibiotiskās vielas sistēmiski, tās mazā koncentrācijā nonāk audos visā cilvēka organismā. Mazā antibiotisko vielu koncentrācija ir iemesls normālās mikrofloras baktēriju un infekciju ierosinātāju baktēriju rezistences attīstībai pret antibiotiskajām vielām. Hepatotoksicitāte, nefrotoksicitāte, ototoksicitāte un citas komplikācijas ir sistēmisku antibiotisko vielu lietošanas rezultāts. Sistēmiskai antibiotisko vielu lietošanai ir limitētas iespējas gadījumos, ja pacientam pēc antibiotisko vielu lietošanas ir blakusparādības –

slikta dūša, vemšana, alerģiskas reakcijas, izsitumi utt. (Cunha et al., 2001; Soothill et al., 2015).

Lokālai antibiotisko vielu lietošanai ir noteiktas priekšrocības, it sevišķi biomateriālu implantācijas operāciju gadījumā, kad antibiotiskās vielas tiek izdalītas no biomateriāla, kas ir ar tām piesūcinātas (Gottenbos et al., 2002; Pritchard et al., 2013).

Šajā darbā galvenais uzdevums bija izpētīt ar antibiotiskajām vielām un bionoārdamiem polimēriem piesūcināta hidrosiapatīta antibakteriālās īpašības *in vitro* un to biosaderību *in vivo* pētījumā pēc biomateriāla implantācijas un kontaminācijas ar baktēriju kultūrām, nosakot iekaisuma citokīnu IL-10, TNF- $\alpha$  un antibakteriālā peptīda  $\beta$ -defensīna-2 intensitāti apkārtējos audos ap implantēto biomateriālu. Šo biomateriālu iespējamais pielietojums ir kaulaudu reģenerācijā pacientiem ar BAI risku.

Hospitālī iegūto infekciju ierosinātāji ir gan starp gramnegatīvām (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*), gan starp grampozitīvām baktērijām (*S. aureus*, *S. epidermidis*), un vairums no tām ir atrodamas ne tikai slimnīcas vidē, bet arī cilvēka normālajā mikroflorā. Retos gadījumos pētījumos tiek pārbaudīta biomateriālu pretsenīšu darbība, un šim nolūkam tiek izvēlēts *C. albicans* vai kāds cits *Candida* ģints pārstāvis, kuriem arī ir spēja ierosināt BAI. Daudzu autoru pētījumos ir norādes par plašo ierosinātāju daudzveidību. Viena pētījuma ietvaros tiek izmantotas vairākas baktēriju kultūras, lai pārbaudītu ar antibiotiskajām vielām piesūcinātu biomateriālu plašo antibakteriālo darbības spektru. Viena baktēriju kultūra pētījumos parasti tiek izvēlēta, ja baktērija ir biežākais kādas konkrētas saslimšanas ierosinātājs; tad tiek pārbaudīta potenciālā antibakteriālā darbība pret šo konkrēto ierosinātāju, lai novērstu saslimšanas attīstību, piemēram, *S. aureus* vai MRSA osteomielīta gadījumā. Grampozitīvo un gramnegatīvo baktēriju izmantošana viena pētījuma ietvaros tiek pamatota ar to, ka šīs baktērijas pārstāv cilvēka normālo

mikrofloru, kas ierosina BAI (*Peel et al.*, 2012; *Vinh et al.*, 2005; *von Eiff et al.*, 2005).

Lai izvērtētu pētījumā izmantoto Latvijā oriģināli sintezēto biomateriālu antibakteriālās īpašības, tika izmantotas *S. epidermidis* un *P. aeruginosa* baktēriju kultūras. Šo baktēriju kultūru izvēle ir pamatota ar to, ka *S. epidermidis* ir viens no biežākajiem BAI, hospitālo infekciju un oportūnistisko infekciju ierosinātājiem. Augstā un plašā *P. aeruginosa* rezistence pret antibiotiskajām vielām, BAI un hospitālo infekciju ierosināšanas spēja pamato šīs baktēriju kultūras izmantošanu pētījumā.

Abām šīm baktēriju kultūrām ir raksturīgi vienlīdz aktīvi piesaistīties pie mākslīgo biomateriālu virsmām un veidot biofilmu. Tā kā biofilmu ierosināto infekciju ārstēšana ir sarežģīta un bieži nesekmīga, pētījumā tika izmantoti kompozītmateriāli ar antibiotiskajām vielām, kuri nomāktu gan baktēriju adhēziju, gan baktēriju kolonizāciju.

Literatūras dati liecina, ka tiek izmantoti dažādi kompozītmateriāli ar dažādām antibiotiskajām vielām. Antibiotisko vielu izvēle galvenokārt balstās uz antibiotisko vielu spektru pret biežākajiem multirezistentajiem ierosinātājiem. Ciprofloksacīns tiek izmantots pētījumos, jo labi penetrē kaulaudos (*Ahola et al.*, 2013). Atsevišķos pētījumos autori priekšroku dod vankomicīna izmantošanai, jo tas uzrāda izcilas antibakteriālās īpašības pret gramnegatīvajām, grampozitīvajām un arī rezistentajām baktērijām (*Liana et al.*, 2013). Lokālai un kontrolētai antibiotisko vielu izdarei pētījumos tiek izmantots arī gentamicīns (*Loca et al.*, 2011), ceftriaksons (*Kundu et al.*, 2010), cefaleksīns (*Li et al.*, 2011), amoksicilīns (*Xu et al.*, 2008), doksicilīns (*Feng et al.*, 2010) un citas.

Šī pētījuma ietvaros hidroksiapatīts tika piesūcināts ar ciprofloksacīnu vai gentamicīnu. Tā kā *S. epidermidis* un *P. aeruginosa* ir dažādas šūnas sienas uzbūve, tad ir jāizmanto antibiotiskās vielas ar atšķirīgu darbības mehānismu. Pēc sava darbības mehānisma ciprofloksacīns un gentamicīns ir atšķirīgas

antibiotiskās vielas, bet to darbības spektrā ir gan *S. epidermidis*, gan *P. aeruginosa*.

Analizējot literatūras datus, nav atrodams identisks pētījums par kompozītmateriālu antibakteriālajām īpašībām. Atrodami pētījumi, kuri atspoguļo antibiotisko vielu izdali vai antibakteriālās īpašības līdzīgiem kompozītmateriāliem ar mūsu pētījumā iekļautajiem biomateriāliem (*Leprêtre et al.*, 2009; *Loca et al.*, 2015; *Kankilic et al.*, 2014). Pētījuma autoru antibiotisko vielu, baktēriju vai polimēru izvēle atšķiras. Taču mūsu pētījums un citu autoru pētījumus apvieno antibakteriālo īpašību salīdzināšana starp biomateriāliem ar bionoārdošos polimēru un bez polimēra. Ir atrodami daži pētījumi par IL-10, TNF- $\alpha$  un  $\beta$ -defensīna-2 ekspresiju apkārtējos audos pēc biomateriāla implantācijas (*Gollwitzer et al.*, 2013; *Ata-Ali et al.*, 2015; *Reinis et al.*, 2011).

Mūsu pētījumā tika noskaidrots, ka HAp/PLLA+cipro antibakteriālās īpašības pret *S. epidermidis* saglabājas  $278,4 \pm 12,39$  h, bet CDHAp/PLLA+cipro –  $213,6 \pm 13,26$  h un CDHAp/PCL+cipro –  $304,8 \pm 11,59$  h. Biomateriāliem bez polimēra, bet ar antibiotiskajām vielām, antibakteriālais laiks pret *S. epidermidis* ir ievērojami īsāks nekā biomateriāliem ar polimēru, un ir  $91,2 \pm 10,11$  h HAp+cipro un  $72 \pm 16$  h CDHAp+cipro.

Hidroksiapatītam, kas savienots ar ciklodekstrīna polimēru un ciprofloksacīnu, antibakteriālās īpašības pret *S. aureus* novēro līdz pat 240 h, bet paraugiem bez polimēra antibakteriālais laiks pret *S. aureus* ir tikai 144 h. *S. aureus* izvēle šajā pētījumā tiek pamatota ar to, ka šī baktērija var būt rezistenta pret antibiotiskajām vielām un pēc savas šūnas sienas uzbūves ir gandrīz vienāda ar daudziem grampozitīviem BAI ierosinātajiem (*Leprêtre et al.*, 2009). Citā pētījumā sterila *S. aureus* zona ap hidroksiapatītu ar PLLA un vankomicīnu tiek novērota 432 h (*Lian et al.*, 2013).

Mūsu pētījumā izmantotajam HAp/PLLA+cipro antibakteriālās īpašības pret *P. aeruginosa* ilgst  $249,6 \pm 13,39$  h, CDHAp/PLLA+cipro –  $197 \pm 15,17$  h, bet CDHAp/PCL+cipro –  $280,8 \pm 16,19$  h. Līdzīgi kā pret *S. epidermidis*, biomateriāli bez polimēra pret *P. aeruginosa* uzrāda mazāku antibakteriālo laiku. HAp+cipro atibakteriālais laiks pret *P. aeruginosa* ir  $69,6 \pm 7,58$  h, CDHAp+cipro –  $60 \pm 12,64$  h.

Kompozītmateriāls PCL/ $\beta$ -TCP+cipro antibakteriālo aktivitāti pret *P. aeruginosa* uzrāda jau uzreiz pēc 2 h inkubācijas. Citi autori (piemēram, *Ahola et al.*, 2013) pierāda, ka antibiotiskās vielas izdalās ātri, pat 2 h laikā pēc inkubācijas sākuma. Šajā gadījumā tika izmantota antibiotiskā viela – tetraciklīns, kas izdalījās no HAp/PCL kompozīta. Kopējo antibiotisko vielu izdales laiku no kompozītmateriāla ietekmē antibiotisko vielu daudzums izmantotajā kompozītmateriālā (*Kim et al.*, 2004;). Ātrā antibiotisko vielu izdale no biomateriāla ir svarīga biofilmu veidošanās profilaksē uz tā virsmas. Pirmajās biofilmas veidošanās procesa stundās notiek baktēriju adhēzija pie biomateriāla, pēc kuras seko baktēriju proliferācija un biofilmas nobriešana. Antibiotiskajām vielām ātri izdaloties no biomateriāla, tiek inhibēta baktēriju adhēzija, tās nonāvējot. Baktēriju nespēja saistīties uz biomateriāla virsmas izslēdz biofilmas turpmākos veidošanās etapus.

Ortopēdisko infekciju ārstēšanā bez ciprofloksacīna tiek lietots arī vankomicīns. Šī antibiotiskā viela tiek lietota ārstēšanā gadījumos, ja ierosinātājs ir multirezistents pret antibiotiskajām vielām. Tāpēc vakcomicīnu izmanto biomateriālos ar ciklodekstrīna polimēru ilglaicīgai antibiotisko vielu izdalei. Šī kompozītmateriāla antibakteriālās īpašības pret *S. aureus* ilgst apmēram 144 h, bet paraugiem bez ciklodekstrīna polimēra antibakteriālais ilgums ir tikai 96 h (*Leprêtre et al.*, 2009).

Arī citi autori savos pētījumos ir pierādījuši bionoārdāmo polimēru ietekmi uz antibiotisko vielu izdales ātrumu un ilgumu. Piemēram, hidroksiapatīts ar PCL un vankomicīnu, salīdzinot ar hidroksiapatītu ar

vankomicīnu bez PCL, vankomicīnu izdala ilgāk un pakāpeniski (*Kim et al.*, 2005).

PLLA/ $\beta$ -TCP ar vankomicīnu tiek rekomendēts izmantot pret MRSA, jo uzrāda labas antibakteriālās īpašības pret MRSA *in vitro* (*Kankilic et al.*, 2011) un labas kaulaudu reģenerācijas spējas pēc MRSA kontaminācijas *in vivo* (*Kankilic et al.*, 2014), salīdzinot ar citiem biomateriālu paraugiem.

Modificētu kalcija fosfāta kaulu cementa biomateriālu ar PLLA un vankomicīnu spēja izdalīt antibiotiskās vielas ilgst līdz 43 dienām (*Loca et al.*, 2015).

Pētījuma ietvaros nosakot hidroksiapatīta porainības līmeņa ietekmi uz antibakteriālo laiku, tika noskaidrots, ka zemākas porainības kompozītmateriālam  $\downarrow$ HAp/PLLA+cipro antibakteriālais laiks pret *S. epidermidis* ir  $151,2 \pm 16,19$  h un pret *P. aeruginosa* –  $117,6 \pm 13,62$  h. Zemākas porainības kompozītmateriālam bez bionoārdošā polimēra  $\downarrow$ HAp+cipro antibakteriālais laiks pret *S. epidermidis* un *P. aeruginosa* ir tikai  $52,8 \pm 10,11$  h.

Citu autoru dati apstiprina kompozītmateriālu porainības ietekmi uz antibakteriālo laiku. Neatkarīgi no antibiotiskās vielas, kura tikusi izmantota pētījumā (ciprofloksacīns, gentamicīns, vankomicīns), mikroporainie hidroksiapatīti saturēja vairāk antibiotisko vielu nekā blīvākie hidroksiapatīti. Antibakteriālais laiks pret pētījumā izmantotajām *E. coli*, *S. aureus* un *P. aeruginosa* baktēriju kultūrām visos trīs antibiotisko vielu gadījumos bija garāks, ja tika izmantoti mikroporaini hidroksiapatīti, nevis blīvākie. Piesūcināmo antibiotisko vielu koncentrācija ir atkarīga no poru izmēra un to procentuālā daudzuma. Palielinot kompozītmateriāla porainību, palielinās iespējamais piesūcināto antibiotisko vielu daudzums, bet, samazinot porainību, samazinās iespējamais piesūcināto antibiotisko vielu daudzums (*Chai et al.*, 2007; *Schnieders et al.*, 2011). Ir svarīgi atrast optimālo līdzsvaru starp porainību un antibiotisko vielu daudzumu, lai biomateriāls nodrošinātu

pietiekami ilgstošas antibakteriālās īpašības, jo, palielinot porainības līmeni, hidrosiapatītam samazinās mehāniskās izturības spējas.

Mūsu pētījumā kompozītmateriāli ar gentamicīnu saglabā tādu pašu antibakteriālā laika tendenci kā kompozītmateriāli, kas piesūcināti ar ciprofloksacīnu. Neatkarīgi no tā, kāda antibiotiskā viela tiek izmantota, kompozītiem ar polimēru ir ilgākas antibakteriālās īpašības nekā bez polimēra. HAp/PLLA+genta antibakteriālais laiks pret *S. epidermidis* ir  $249,6 \pm 16,78$  h, bet pret *P. aeruginosa* –  $220,8 \pm 10,11$  h. Savukārt CDHAp/PCL+genta antibakteriālais laiks pret *S. epidermidis* ir  $319,2 \pm 16,19$  h, pret *P. aeruginosa* –  $264 \pm 16$  h. CDHAp/PLLA+genta antibakteriālais laiks pret *S. epidermidis* ir  $249,6 \pm 16,78$  h, pret *P. aeruginosa* –  $218,4 \pm 17,7$  h. Kompozītmateriāliem bez polimēra – HAp+genta, CDHAp+genta – antibakteriālais laiks pret *S. epidermidis* ir attiecīgi tikai  $88,8 \pm 11,59$  h un  $67,2 \pm 10,11$ , pret *P. aeruginosa* attiecīgi –  $67,2 \pm 10,11$  h un  $52,8 \pm 10,11$  h. Šādus kompozītmateriālus ar antibiotiskajām vielām un polimēru var izmantot gadījumos, kad pacientiem ar osteomielītu ir vajadzīga kaulu aizvietošanas operācija un ir jānodrošina antibakteriāla iedarbība uz ierosinātāju, lai neattīstītos BAI (Ahola et al., 2013). Osteomielīta gadījumā lokālai antibakteriālai terapijai ir priekšrocības, salīdzinot ar sistēmisku antibakteriālo terapiju, jo kaulaudi ir slikti apasiņoti un līdz ar to jau tā mazā antibiotisko vielu koncentrācija iekaisuma perēklī nonāk vēl mazāk.

*In vitro* pētījumā izmeklētās kompozītmateriālu grupas ar antibiotiskajām vielām un polimēru uzrāda ilgākas antibakteriālās īpašības, kas osteomielīta gadījumā būtu piemērotākas. Lai gan dati ir iegūti *in vitro* pētījumā, pētījuma apstākļi tiek nodrošināti līdzīgi, kādiem tiem būtu jābūt *in vivo* (tuvu cilvēka fizioloģiskajiem apstākļiem), līdz ar to iegūtos datus var attiecināt uz reāliem apstākļiem *in vivo*.

Pētījumos, kur pret *S. aureus* ierosinātām sasilšanām tiek izmantots gentamicīns, redzams, ka hidrosiapatīta granulām ar gentamicīnu un keratīnu



antibakteriālās īpašības pret *S. aureus* tiek novērotas 2904 h. Ir zināms, ka keratīnam piemīt stabilizējoša funkcija kompozītmateriālos, kas padara gentamicīna izdali no biomateriāla lēnāku (*Belcarz et al.*, 2009).

Pētījuma laikā visi kompozītmateriāli ar PCL neatkarīgi no izmantotās antibiotiskās vielas vai baktēriju kultūras uzrāda ilgākas antibakteriālās īpašības nekā kompozītmateriāli ar PLLA. Tas ir skaidrojams ar to, ka PLLA un PCL ir dažāds bionoārdīšanās ātrums, respektīvi, PCL noārdās lēnāk nekā PLLA (*Tokiwa et al.*, 2009). Labvēlīgos vides apstākļos PLLA degradējas 1–2 nedēļu laikā, bet, ja vides apstākļi nav labvēlīgi, biodegradācija var ilgt pat gadu. Savukārt PCL biodegradācija notiek aptuveni 2 gadu laikā, bet tas ir atkarīgs no PCL sākotnējās molekulārās masas implantā, līdz ar to biodegradācijas laiks var būt arī īsāks (*Armentano et al.*, 2010; *Gunatillake et al.*, 2003). Pateicoties savam ilgajam biodegradācijas laikam, PCL tiek plaši izmantots lokālas antibiotisko vielu izdales sistēmās, jo tādējādi antibakteriālās īpašības tiek nodrošinātas ilgāk (*Woodruff et al.*, 2009). Lielāks antibiotisko vielu daudzums, iespējams, tika izdalīts no kompozītmateriāliem ar PLLA pirmajās pētījuma dienās. Šis daudzums bija pietiekams, lai pilnībā nomāktu baktēriju augšanu. PCL kompozītmateriālu izdalītais antibiotisko vielu daudzums nebija tik liels kā PLLA kompozītmateriāliem, taču, tas bija pietiekams, lai pilnībā nomāktu baktēriju augšanu pirmajās pētījuma dienās.

Vairāki autori bez PLLA un PCL savos pētījumos izmanto arī citus bionoārdošos polimērus, lai panāktu lokālu un vienmērīgu antibiotisko vielu izdalīšanos. Lielā polimēru daudzveidība un to daudzveidīgās īpašības autoriem ļauj izvēlēties vajadzīgo polimēru pēc nepieciešamības. Piemēram, PLGA ir bionoārdošs polimērs, ko izmanto kompozītmateriālos, lai izdalītu antibiotisko vielu – gentamicīnu (*Schnieders et al.*, 2006; *Liet et al.*, 2011). PLGA ar gentamicīnu 432 h uzrāda antibakteriālās īpašības pret *S. aureus* (*McLaren et al.*, 2014).

Pateicoties ciprofloksacīna efektivitātei gan pret grampozitīvām, gan gramnegatīvām baktērijām, tas tiek izmantots daudzos pētījumos, lai nodrošinātu biomateriālu antibakteriālās īpašības un samazinātu BAI risku.

*In vitro* pētījumi liecina, ka ciprofloksacīns spēj labi darboties, adsorbēts uz biomateriāliem. Pētījumos (piemēram, *Parwe et al.*, 2014) arī konstatēts, ka ar ciprofloksacīnu pārklātas PLLA nanošķiedras uzrāda antibakteriālo aktivitāti pret *S. aureus* jau pēc 24 h inkubācijas 37 °C temperatūrā, un, lai pret *S. aureus* sasniegtu līdzīgu efektivitāti, tīra ciprofloksacīna koncentrācijai ir jābūt 8 reizes augstākai nekā tad, ja tas ir adsorbēts uz PLLA nanošķiedrām. Labākas antibakteriālās īpašības pret *E. coli* ir uzrādījušas PLLA nanošķiedras, kas pārklātas ar ciprofloksacīnu (*Parwe et al.*, 2014).

Kohleārais implants ar ciprofloksacīnu 5 nedēļas saglabā antibakteriālās īpašības pret *S. pneumoniae in vitro* apstākļos 23 °C un 37 °C temperatūrā. Savukārt *in vivo* pētījumos ir konstatēts, ka kohleārais implants ar ciprofloksacīnu pasargā žurkas no *S. pneumoniae* meningīta, kas varētu būt iegūts hematogēnā ceļā. Kontaminējot šo implantu ar baktērijām tieši vidusausī, meningīts attīstījās pēc garāka inkubācijas perioda (*Wei et al.*, 2006).

Polimerizētas nanosfēriskas kontaktlēcas ar ciprofloksacīnu līdz pat 96 stundām spēj inhibēt *S. aureus* un *P. aeruginosa* augšanu (*Garhwal et al.*, 2012).

Ciklodekstrīna kombinācija ar ciprofloksacīnu palīdzina biomateriālu antibakteriālās īpašības pret *S. aureus*, *S. epidermidis* un *E. coli* (*Laurent et al.*, 2011).

Gentamicīna teicamās antibakteriālās īpašības pret gramnegatīvajām baktērijām ir iemesls, kāpēc šī antibiotiskā viela tiek plaši lietota biomateriālos.

Izmantojot gentamicīnu antibakteriālo biomateriālu izveidē, ir svarīgi noteikt tā termostabilitāti. Kaula rekonstrukcijā izmantojamo biomateriālu, kas pārklāts ar gentamicīnu, pirms kaulu rekonstrukcijas iespējams uzglabāt sasaldētā veidā. Saskaņā ar pētījumu (piemēram, *Coraça-Huber et al.*, 2013)

datiem, gentamicīna atbrīvošanās no protēzes  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  un  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  temperatūrā bija samērā līdzīga. Gentamicīna šķīdumu pakļaujot  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  iedarbībai 30 minūtes, 77,91% gentamicīna tiek degradēts, un tas liecina par zemu termostabilitāti un ierobežo tā izmantošanu. Gentamicīnu plaši lieto antibakteriālo biomateriālu izveidē, jo tam ir plašs darbības spektrs, turklāt cilvēka organisma temperatūra ir optimāla gentamicīna darbībai (Naveed *et al.*, 2014).

Ar gentamicīnu klāts sintētiskais trūces fikliņš *in vitro* pētījumos uzrāda augstas antibakteriālās īpašības pret *S. aureus*, tādējādi pasargājot pacientu no iespējamās postoperatīvās infekcijas (Wiegering *et al.*, 2014). Tāpat pētījumos konstatēts, ka pēc asinsvadu implantu ievietošanas aptuveni 20% pacientu attīstās ar operāciju saistīta infekcija, taču asinsvadu kolagēna implants, kas klāts ar gentamicīnu, pēc operācijas nodrošina pilnīgu antibakteriālo aktivitāti. Pacientiem, kuriem izmantots implants ar gentamicīnu, novērots īsāks hospitalizācijas laiks (Costa Almeida *et al.*, 2014).

Izteiktu antibakteriālo efektivitāti gentamicīns uzrāda arī ortopēdisko biomateriālu sastāvā. Ar gentamicīnu pārklātam kaula cementam ir izteikti ilgākas antibakteriālās īpašības pret *S. aureus*, MRSA, koagulāzes negatīvajiem stafilokokiem, *E. coli*, *P. aeruginosa* un *Klebsiella spp.* nekā cementam, kas klāts ar citām antibiotiskām vielām, piemēram, vankomicīnu, piperacilīnu vai imipenemu (Chang *et al.*, 2013). Papēža kaula hroniska osteomielīta ārstēšana, izmantojot ar gentamicīnu piesūcinātu kalcija fosfāta cementu, ir sekmīga arī diabēta slimniekiem (Iwakura *et al.*, 2014). Pacientiem, kuriem izmantoja gentamicīna polimetilmetakrilāta cementu kaula reģenerācijai, novēroja gentamicīna izdalīšanos urīnā vidēji no 43 līdz 71 dienai (Webb *et al.*, 2013).

### 3.2. Iekaisumu citokīnu ekspresija *in vivo*

Pētījuma *in vivo* sadaļā tika noteikta iekaisuma citokīnu (TNF- $\alpha$  un IL-10) un antibakteriālo peptīdu ( $\beta$ -defensīns-2) ekspresija apkārtējos audos pēc četrus nedēļus HAp/PLLA+cipro, HAp/PLLA/+genta, HAp+cipro, HAp+genta un HAp/PLLA zemādas implantācijas un implanta kontaminācijas ar *S. epidermidis* vai *P. aeruginosa*.

Iekaisuma citokīnu produkcija ir organisma atbildes reakcija pret implantēto biomateriālu vai biomateriāla bakteriālo kontamināciju. Palielināta iekaisuma citokīnu daudzuma atrade var kalpot par diagnostisko kritēriju biomateriālu infekcijas gadījumā (*Franz et al.*, 2011).

HAp/PLLA+cipro, HAp/PLLA/+genta, HAp+cipro un HAp+genta implantācijas un tai sekojošas bakteriālas kontaminācijas (neatkarīgi no tā, kāda baktēriju kultūra tika izmantota) apkārtējos audos ap biomateriālu netika novērotas TNF- $\alpha$ , IL-10 un  $\beta$ -defensīna-2 ekspresijas izmaiņas. Neatkarīgi no tā, vai PLLA bija vai nebija biomateriālā, audos netika atrastas izmaiņas, salīdzinot ar kontroles grupu. Normālais iekaisuma citokīnu un antibakteriālo peptīdu daudzums liecina par to, ka pēc šo kompozītmateriālu implantācijas un kontaminācijas nav veidojies iekaisuma process, kas saistāms ar antibiotisko vielu izdali no biomateriāla un baktēriju iznīcināšanu. Baktēriju daudzums, kas tika izmantots *in vivo* pētījumā, bija pietiekami mazs, lai kompozītmateriāli ar un bez polimēra spētu baktērijas iznīcināt pilnībā, ko pierāda *in vitro* pētījuma sadaļa.

Pretēja situācija ir HAp/PLLA implantācijas un baktēriju kontaminācijas gadījumā. Pēc četrus nedēļus implantācijas apkārtējos audos ekspresējas palielināts TNF- $\alpha$ , IL-10 un  $\beta$ -defensīna-2 daudzums, kas skaidri liecina par iekaisuma procesu. Ņemot vērā, ka šis kompozītmateriāls nav piesūcināts ar antibiotiskām vielām, izmantotais baktēriju daudzums ir pietiekams, lai attīstītos iekaisuma process.

Vairāki autori implantu infekciju gadījumā audos ap implantu ir novērojuši palielinātu IL-10 un TNF- $\alpha$  līmeni, salīdzinot ar implantiem bez infekcijas (*Duarte et al.*, 2009). Šos rezultātus apstiprina citu autoru pētījumi, kuros pētīti audi ap dentāliem implantiem iekaisuma gadījumā, salīdzinot ar veselīem audiem ap dentālo implantu (*Ata-Ali et al.*, 2015).

*Staphylococcus spp.* ierosināto locītavu implantu infekciju gadījumā locītavu somiņas šķidrumā ir atklāts paaugstināts TNF- $\alpha$  un  $\beta$ -defensīna-2 līmenis, kā arī paaugstināts vēl cita antibakteriālā peptīda –  $\beta$ -defensīna-3 – līmenis (*Gollwitzer et al.*, 2013).

Intensīvāka TNF- $\alpha$ ,  $\beta$ -defensīna-2 un IL-10 produkcija audos ap biomateriālu ir novērota pēc kompozītmateriālu zemādas implantācijas un kontaminācijas ar *P. aeruginosa* vai *S. epidermidis* (*Reinis et al.*, 2011). Biomateriāli, kas tikuši izmantoti pētījumā, ir bez antibiotiskajām vielām un kontaminēti ar mazāku baktēriju daudzumu nekā mūsu pētījumā, bet arī šāda baktēriju koncentrācija ir pietiekama, lai stimulētu iekaisuma citokīnu un antibakteriālo peptīdu produkciju ap biomateriāla audiem.

Neizmainīts TNF- $\alpha$  līmenis, salīdzinot ar kontroles grupu, tiek novērots gadījumos, kad lokāls vaskulārs implants ar vankomicīnu tiek kontaminēts ar MRSA. Šāds pats implants bez vankomicīna, bet kontaminēts ar baktēriju kultūru, izraisa palielinātu TNF- $\alpha$  produkciju (*Gul et al.*, 2011).

## 4. SECINĀJUMI

1. Biomateriāliem ar antibiotiskām vielām un ar bionoārdošo polimēru pārklājumu, piemīt izteiktas antibakteriālās īpašības; antibiotiskās vielas izdalās pakāpeniski un saglabājas ilgāk nekā biomateriāliem bez bionoārdošā polimēra pārklājuma, kuri antibiotiskās vielas izdala īslaicīgi.

2. Visu pētījumā iekļauto biomateriālu (ar un bez polimēru pārklājuma) antibakteriālās darbības laiks pret *S. epidermidis* ir ilgāks nekā tādiem pašiem biomateriāliem pret *P. aeruginosa*; konstatēts, izmantojot divas dažādas antibakteriālās testēšanas metodes.

3. Biomateriāliem ar antibiotiskajām vielām un PCL polimēru savienojumu antibakteriālās īpašības ir ilgstošākas nekā tādiem pašiem biomateriāliem ar PLLA (neatkarīgi no antibiotisko vielu veida vai baktēriju kultūras).

4. Ar antibiotiskajām vielām un ar polimēru savienotu zemas porainības biomateriālu antibakteriālais laiks pret *S. epidermidis* un *P. aeruginosa* ir īsāks nekā identiskiem biomateriāliem ar lielāku porainību.

5. Iekaisuma citokīnu un antibakteriālo peptīdu ekspresija audos ap biomateriālu ar antibiotiskajām vielām, kas kontaminēts ar *S. epidermidis* un *P. aeruginosa*, pēc implantācijas neatkarīgi no antibiotiskās vielas nemainās.

6. Palielināta iekaisuma citokīnu un antibakteriālo peptīdu izdales intensitāte ir novērojama audos ap kontaminētu, bet antibiotiskās vielas nesaturušu biomateriālu.

## 5. PUBLIKĀCIJAS UN PREZENTĀCIJAS PAR PĒTĪJUMA TĒMU

### Raksti starptautiski citējamās datubāzēs

1. **Skadins I.**, Kroica J., Salma I., Reinis A., Sokolova M., Rostoka D. The level of inflammatory cytokines and antimicrobial peptides after composite material implantation and contamination with bacterial culture. // *Key Engineering Materials*, 2017; 721: 245–250.
2. Narkevica I., Reinis A., Bugovecka L., **Skadins I.**, Sansonetti E., Kroica J., Ozolins J. *In vitro* bioactivity and bacteriostasis effect of thermally treated and UV-light irradiated TiO<sub>2</sub> ceramics. // *Key Engineering Materials*, 2016; 674: 121–126.
3. Brangule A., Gross K. A., **Skadins I.**, Reinis A., Kroica J. Simultaneous identification of amorphous calcium phosphate and *S.epidermidis* bacteria by photoacoustic spectroscopy. // *Key Engineering Materials*, 2017; 720: 125–129.
4. Kroica J., **Skadins I.**, Salma I., Reinis A., Sokolova M., Rostoka D., Berza N. Antibacterial efficiency of hydroxyapatite biomaterials with biodegradable polylactic acid and polycaprolactone polymers saturated with antibiotics. // *Proceedings of the Latvian Academy of Sciences, Section B*, 2016; 4(703): 20–30.

### Starptautiska mēroga uzstāšanās par publikācijas tēmu

1. **Skadins I.**, Reinis A., Kroica J. Analysis methods of antibacterial efficiency of retainers impregnated with antibiotics. // *Symposium Bioceramics and cells for reinforcement of bone* (18–20 October, 2012, Riga, Latvia).
2. **Skadins I.**, Kroica J., Salma I., Reinis A., Sokolova M., Berza N. Antibacterial efficiency of hydroxyapatite biomaterials with biodegradable polylactic acid polymer, saturated with ciprofloxacin. // *Scandinavian*

Society for Biomaterials – 7th Annual Meeting iNANO (Aarhus University, Aarhus, Denmark, 26–28 March, 2014).

3. **Skadins I.**, Kroica J., Salma I., Reinis A., Sokolova M., Rostoka D., Berza N. Antibacterial efficiency of biomaterials with open porosity of 15% and total porosity of 20%. // European Orthopaedic Research Society 22nd Annual Meeting (2–4 July, Nantes, France).
4. **Skadins I.**, Kroica J., Salma I., Reinis A., Sokolova M., Rostoka D., Berza N. Biomaterials with biodegradable polymer and antibiotics – efficiency tests in laboratories, practical use, advantages and disadvantages. // 12th Baltic Congress of Laboratory Medicine (Latvia, Riga, 18–20 September, 2014).
5. **Skadins I.**, Kroica J., Salma I., Reinis A., Sokolova M., Rostoka D., Berza N. Antibacterial efficiency of hydroxyapatite biomaterials with biodegradable polycaprolactone polymer, saturated with ciprofloxacin. // 2nd Congress of Baltic Microbiologists (Tartu, Estonia, 16.10.2014–19.10.2014).
6. **Skadins I.**, Kroica J., Salma I., Reinis A., Sokolova M., Rostoka D. Antibacterial efficiency of biomaterials with biodegradable polymer and antibiotics. // Scandinavian Society for Biomaterials – 8<sup>th</sup> conference (Sigulda, Latvia, 6–8 May, 2015).

### **Starptautiska mēroga tēzes par pētījuma tēmu**

1. **Skadins I.**, Kroica J., Salma I., Reinis A., Sokolova M., Berza N. Antibacterial efficiency of hydroxyapatite biomaterials with biodegradable polylactic acid polymer, saturated with ciprofloxacin. // Scandinavian Society for Biomaterials – 7<sup>th</sup> Annual Meeting iNANO (Aarhus University, Aarhus, Denmark, 26–28 March 2014), O19.



2. **Skadins I.**, Kroica J., Salma I., Reinis A., Sokolova M., Rostoka D., Berza N. Antibacterial efficiency of hydroxyapatite biomaterials with biodegradable polylactic acid polymer, saturated with gentamicin. // 24<sup>th</sup> European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (in Barcelona, Spain, 10–13 May 2014), p. 016.
3. **Skadins I.**, Kroica J., Salma I., Reinis A., Sokolova M., Rostoka D., Berza N. Antibacterial efficiency of biomaterials with open porosity of 15% and total porosity of 20%. // European Orthopaedic Research Society 22<sup>nd</sup> Annual Meeting (2–4 July, Nantes, France), O2.3.
4. **Skadins I.**, Kroica J., Salma I., Reinis A., Sokolova M., Rostoka D., Berza N. Biomaterial antibacterial efficiency with reduced level of porosity. // European Orthopaedic Research Society 22<sup>nd</sup> Annual Meeting (2–4 July, Nantes, France), p. 7.1.
5. **Skadins I.**, J Kroica J., Salma I., Reinis A., Sokolova M., Rostoka D., Berza N. Antibacterial efficiency of hydroxyapatite biomaterials with biodegradable polycaprolactone polymer, saturated with gentamicin. // 12<sup>th</sup> Baltic Congress of Laboratory Medicine (Latvia, Riga, 18–20 September, 2014), p. 42.
6. **Skadins I.**, J Kroica J., Salma I., Reinis A., Sokolova M., Rostoka D., Berza N. Biomaterials with biodegradable polymer and antibiotics – efficiency tests in laboratories, practical use, advantages and disadvantages. // 12<sup>th</sup> Baltic Congress of Laboratory Medicine (Latvia, Riga, 18–20 September, 2014), p. 41.
7. **Skadins I.**, J Kroica J., Salma I., Reinis A., Sokolova M., Rostoka D., Berza N. Antibacterial efficiency of hydroxyapatite biomaterials with biodegradable polycaprolactone polymer, saturated with ciprofloxacin. // 2<sup>nd</sup> Congress of Baltic Microbiologists (Tartu, Estonia, 16.10.2014–19.10.2014), p. 54.

8. **Skadins I.**, J Kroica J., Salma I., Reinis A., Sokolova M., Rostoka D. Antibacterial efficiency of biomaterials with biodegradable polymer and antibiotics. // Scandinavian Society for Biomaterials – 8<sup>th</sup> conference (Sigulda, Latvia, 6–8 May, 2015), p. 49.

### **Latvijas mēroga uzstāšanās par promocijas darba pētījuma tēmu**

1. **Skadins I.**, J Kroica J., Salma I., Reinis A., Sokolova M., Rostoka D., Berza N. Hidroksiapatīta-polipienskābes-ciprofloksacīna biomateriālu ar vidējo atvērto porainību 15% antibakteriālās efektivitātes noteikšana, izmantojot Kirby-Bauer difūzijas metodi. // RSU Zinātniskā konference (2014. gada 10.–11. aprīlis).

### **Latvijas mēroga tēzes par pētījuma tēmu**

2. **Skadins I.**, J Kroica J., Salma I., Reinis A., Sokolova M., Rostoka D., Berza N. Biomateriālu efektivitāte pret *Ps. aeruginosa* un *S. epidermidis*. // RSU Zinātniskā konference: Tēzes (2014. gada 10.–11. aprīlis). Rīga: RSU, 2014, 337. lpp.
3. **Skadins I.**, J Kroica J., Salma I., Reinis A., Sokolova M., Rostoka D., Berza N. Biomateriālu antibakteriālās efektivitātes noteikšana. RSU Zinātniskā konference: Tēzes (2014. gada 10.–11. aprīlis). Rīga: RSU, 2014, 335. lpp.
4. **Skadins I.**, J Kroica J., Salma I., Reinis A., Sokolova M., Rostoka D., Berza N. Hidroksiapatīta-polipienskābes-ciprofloksacīna biomateriālu ar vidējo atvērto porainību 15% antibakteriālās efektivitātes noteikšana, izmantojot *Kirby-Bauer* difūzijas metodi. RSU Zinātniskā konference: Tēzes (2014. gada 10.–11. aprīlis). Rīga: RSU, 2014, 334. lpp.
5. **Skadins I.**, J Kroica J., Salma I., Reinis A., Sokolova M., Rostoka D., Berza N. Hidroksiapatīta-polipienskābes-ciprofloksacīna biomateriālu ar

vidējo porainību 15% antibakteriālā efektivitāte *in vitro*. RSU Zinātniskā konference: Tēzes (2014. gada 10.–11. aprīlis). Rīga: RSU, 2014, 336. lpp.

6. **Skadins I.**, J Kroica J., Salma I., Reinis A., Sokolova M., Rostoka D., Berza N., Brakovska P., Jaunzeme A., Pētersons K., Veckalns I., Pudule S. Biomateriālu antibakteriālās efektivitātes noteikšanas metodes ietekme uz antibakteriālo ilgumu. RSU Zinātniskā konference: Tēzes (2015. gada 26.–27. marts). Rīga: RSU, 2015, 307. lpp.
7. **Skadins I.**, J Kroica J., Salma I., Reinis A., Sokolova M., Rostoka D., Berza N., Brakovska P., Jaunzeme A., Pētersons K., Veckalns I., Pudule S. Fizioloģiskās vides ietekme uz biomateriāliem ar biodegradējamu polipienskābes polimēru. RSU Zinātniskā konference: Tēzes (2015. gada 26.–27. marts). Rīga: RSU, 2015, 306. lpp.

## 6. IZMANTOTĀ LITERATŪRA

1. Ahola N., Männistö N., Veiranto M., Karp M., Rich J., Efimov A., et al. An *in vitro* study of composites of poly(L-lactide-co-ε-caprolactone), β-tricalcium phosphate and ciprofloxacin intended for local treatment of osteomyelitis // *Biomater*, 2013; 3(2): e23162.
2. Aldrete Sdel M., Magee M. J., Friedman-Moraco R. J., Chan A. W., Banks G. G., Burd E. M., Kraft C. S. Characteristics and antibiotic use associated with short-term risk of *Clostridium difficile* infection among hospitalized patients // *Am J Clin Pathol*, 2015; 143(6): 895–900.
3. Ata-Ali J., Flichy-Fernández J. A., Alegre-Domingo T., Ata-Ali F., Palacio J., Peñarrocha-Diago M. Clinical, microbiological, and immunological aspects of healthy versus peri-implantitis tissue in full arch reconstruction patients: a prospective cross-sectional study // *BMC Oral Health*, 2015; 15: 4.
4. Bauer A. W., Bauer A. W., Kirby W. M. M., Sherris J. C., Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method // *Am J Clin Pathol*, 1966; 36: 493–496.
5. Belcarz A., Belcarz A., Ginalska G., Zalewska J., Rzeski W., Słószarczyk A., Kowalczyk D., et al. Covalent coating of hydroxyapatite by keratin stabilizes gentamicin release // *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2009; 89(1): 102–113.
6. Campoccia D., Montanaro L., Speziale P., Arciola C. R. Antibiotic-loaded biomaterials and the risks for the spread of antibiotic resistance following their prophylactic and therapeutic clinical use // *Biomaterials*, 2010; 31(25): 6363–6377.
7. Chai F., Hornez J. C., Blanchemain N., Neut C., Descamps M., Hildebrand H. F. Antibacterial activation of hydroxyapatite (HA) with controlled porosity by different antibiotics // *Biomol Eng*, 2007 Nov; 24(5): 510–514.
8. Chang Y., Tai C. L., Hsieh P. H., Ueng S. W. Gentamicin in bone cement: a potentially more effective prophylactic measure of infection in joint arthroplasty // *Bone Joint Res*, 2013; 2(10): 220–226.
9. Coraça-Huber D. C., Hausdorfer J., Fille M., Nogler M. Effect of storage temperature on gentamicin release from antibiotic-coated bone chips // *Cell Tissue Bank*, 2013; 14(3): 395–400.
10. Costa Almeida C. E., Reis L., Carvalho L., Costa Almeida C. M. Collagen implant with gentamicin sulphate reduces surgical site infection in vascular surgery: a prospective cohort study // *Int J Surg*, 2014; 12(10): 1100–1104.
11. Cunha B. A. Antibiotic side effects // *Med Clin North Am*, 2001; 85(1): 149–185.
12. Darouiche R. O. Device-associated infections: a macroproblem that starts with microadherence // *Clin Infect Dis*, 2001; 33(9): 1567–1572.
13. Duarte P. M., de Mendonça A. C., Máximo M. B., Santos V. R., Bastos M. F., Nociti Júnior F. H. Differential cytokine expressions affect the severity of peri-implant disease // *Clin Oral Implants Res*, 2009; 20(5): 514–520.

14. Feng K., Feng K., Sun H., Bradley M. A., Dupler E. J., Giannobile W. V., Ma P. X. Novel antibacterial nanofibrous PLLA scaffolds // *J Control Release*, 2010; 146(3): 363–369.
15. Franz S., Rammelt S., Scharnweber D., Simon J. C. Immune responses to implants – a review of the implications for the design of immunomodulatory biomaterials // *Biomaterials*, 2011; 32(28): 6692–6709.
16. Garhwal R., Shady S. F., Ellis E. J., Ellis J. Y., Leahy C. D., McCarthy S. P., et al. Sustained ocular delivery of Ciprofloxacin using nanospheres and conventional contact lens materials // *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2012; 53(3): 1341–1352.
17. Goldmann D. A., Pier G. B. Pathogenesis of infections related to intravascular catheterization // *Clin Microbiol Rev*, 1993; 6(2): 176–192.
18. Gollwitzer H., Dombrowski Y., Proding P. M., Peric M., Summer B., Hapfelmeier A., et al. Antimicrobial peptides and proinflammatory cytokines in periprosthetic joint infection // *J Bone Joint Surg Am*, 2013; 95(7): 644–651.
19. Gottenbos B., Busscher H. J., Van Der Mei H. C., Nieuwenhuis P. Pathogenesis and prevention of biomaterial centered infections // *J Mater Sci Mater Med*, 2002; 13(8): 717–722.
20. Greco G., Shi W., Michler R. E., Meltzer D. O., Ailawadi G., Hohmann S. F., Thourani V. H., Argenziano M., Alexander J. H., Sankovic K., Gupta L., Blackstone E. H., Acker M. A., Russo M. J., Lee A., Burks S. G., Gelijns A. C., Bagiella E., Moskowitz A. J., Gardner T. J. Costs associated with health care-associated infections in cardiac surgery // *J Am Coll Cardiol*, 2015; 65(1): 15–23.
21. Gul M., Yasim A., Aral M. The levels of cytokines in rats following the use of prophylactic agents in vascular graft infection // *Bratisl Lek Listy*, 2010; 111(6): 316–320.
22. Heydenrijk K., Meijer H. J., van der Reijden W. A., Raghoobar G. M., Vissink A., Stegenga B. Microbiota around root-form endosseous implants: a review of the literature // *Int J Oral Maxillofac Implants*, 2002; 17(6): 829–838.
23. Huebsch N., Mooney D. J. Inspiration and application in the evolution of biomaterials // *Nature*, 2009; 462(7272): 426–432.
24. Iwakura T., Lee S. Y., Niikura T., Miwa M., Sakai Y., Nishida K. et al. Gentamycin-impregnated calcium phosphate cement for calcaneal osteomyelitis: a case report // *J Orthop Surg (Hong Kong)*. 2014; 22(3): 437–439.
25. Kankilic B., Bayramli E., Kilic E., Dağdeviren S., Korkusuz F. Vancomycin Containing PLLA/β-TCP Controls MRSA *In Vitro* // *Clin Orthop Relat Res*, 2011; 469(11): 3222–3228.
26. Kankilic B., Bilgic E., Korkusuz P., Korkusuz F. Vancomycin containing PLLA/β-TCP controls experimental osteomyelitis *in vivo* // *J Orthop Surg Res*, 2014; 19; 9:114.
27. Kim H. W., Knowles J. C., Kim H. E. Development of Hydroxyapatite Bone Scaffold for Controlled Drug Release via Poly(ε-caprolactone) and Hydroxyapatite Hybrid Coatings // *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2004; 70(2): 240–249.

28. Kim H. W., Knowles J. C., Kim H. E. Hydroxyapatite porous scaffold engineered with biological polymer hybrid coating for antibiotic Vancomycin release // *J Mater Sci Mater Med*, 2005; 16(3): 189–195.
29. Kundu B., Soundrapandian C., Nandi S. K., Mukherjee P., Dandapat N., Roy S. Development of new localized drug delivery system based on ceftriaxone-sulbactam composite drug impregnated porous hydroxyapatite: a systematic approach for in vitro and in vivo animal trial // *Pharm Res*, 2010; 27(8): 1659–1676.
30. Laupland K. B., Lee H., Gregson D. B., Manns B. J. Cost of intensive care unit-acquired bloodstream infections // *J Hosp Infect*, 2006; 63(2): 124–132.
31. Laurent T., Kacem I., Blanchemain N., Cazaux F., Neut C., Hildebrand H. F., et al. Cyclodextrin and maltodextrin finishing of a polypropylene abdominal wall implant for the prolonged delivery of ciprofloxacin // *Acta Biomater*, 2011; 7(8): 3141–3149.
32. Leprêtre S., Chai F., Hornez J. C., Vermet G., Neut C., Descamps M., et al. Prolonged local antibiotics delivery from hydroxyapatite functionalised with cyclodextrin polymers // *Biomaterials*, 2009; 30(30): 6086–6093.
33. Li Z., Kong W., Li X., Xu C., He Y., Gao J. Antibiotic-containing biodegradable bead clusters with porous PLGA coating as controllable drug-releasing bone fillers // *J Biomater Sci Polym Ed*, 2011; 22(13): 1713–1731.
34. Lian X., Liuc H., Wanga X., Xua S., Cuia F., Bai X. Antibacterial and biocompatible properties of vancomycin-loaded nano-hydroxyapatite/collagen/poly (lactic acid) bone substitute // *Progress in Natural Science: Materials International*, 2013; 23(6): 549–556.
35. Loca D., Locs J., Salma K., Gulbis J., Salma I., Berzina-Cimdina L. Porous Hydroxyapatite bioceramic scaffolds for drug delivery and bone regeneration // *Mater. Sci. Eng.*, 2011; 18: 192019.
36. Loca D., Sokolova M., Locs J., Smirnova A., Irbe A. Calcium phosphate bone cements for local vancomycin delivery // *Materials Science and Engineering: C*, 2015; 49: 106–113.
37. Locs J., Zalite V., Berzina-Cimdina L., Sokolova M. Ammonium hydrogen carbonate provided viscous slurry foaming – a novel technology for the preparation of porous ceramics // *J Eur Ceram Soc*, 2013; 33: 3437–3443.
38. Mann H. B., Whitney D. R. On a Test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other // *Ann Math Statist*, 1947; 18(1): 50–60.
39. McLaren J. S., White L. J., Cox H. C., Ashraf W., Rahman C.V., Blunn G. W., et al. A biodegradable antibiotic-impregnated scaffold to prevent osteomyelitis in a contaminated *in vivo* bone defect model // *Eur Cell Mater*, 2014; 27: 332–349.
40. Mylonakis E., Ryan E. T., Calderwood S. B. Clostridium difficile-associated diarrhea: a review // *Arch Intern Med*, 2001; 161(4): 525–533.
41. Naveed S., Waheed N., Nazeer S., Qamar F. Degradation study of gentamicin by UV spectroscopy // *American Journal of Chemistry and Applications*, 2014; 1(4): 36–39.

42. Parwe S. P., Chaudhari P. N., Mohite K. K., Selukar B. S., Nande S. S., Garnaik B. Synthesis of ciprofloxacin-conjugated poly (L-lactic acid) polymer for nanofiber fabrication and antibacterial evaluation // *Int J Nanomedicine*, 2014; 9: 1463–1477.
43. Peel T. N., Cheng A. C., Buising K. L., Choong P. F. Microbiological aetiology, epidemiology, and clinical profile of prosthetic joint infections: are current antibiotic prophylaxis guidelines effective? // *Antimicrob Agents Chemother*, 2012; 56(5): 2386–2391.
44. Pritchard E. M., Valentin T., Panilaitis B., Omenetto F., Kaplan D. L. Antibiotic-releasing silk biomaterials for infection prevention and treatment // *Adv Funct Mater*, 2013; 23(7): 854–861.
45. Reinis A., Pilmane M., Stunda A., Vētra J., Kroiča J., Rostoka D., et al. An *in vitro* and in vivo study on the intensity of adhesion and colonization by *Staphylococcus epidermidis* and *Pseudomonas aeruginosa* on originally synthesized biomaterials with different chemical composition and modified surfaces and their effect on expression of TNF- $\alpha$ ,  $\beta$ -defensin-2 and IL-10 in tissues // *Medicina (Kaunas)*, 2011; 47(10): 560–565.
46. Schnieders J., Gbureck U., Thull R., Kissel T. Controlled release of gentamicin from calcium phosphate-poly(lactic acid-co-glycolic acid) composite bone cement // *Biomaterials*, 2006; 27(23): 4239–4249.
47. Schnieders J., Gbureck U., Vormdran E., Schossig M., Kissel T. The effect of porosity on drug release kinetics from vancomycin microsphere/calcium phosphate cement composites // *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2011; 99(2): 391–398.
48. Sokolova M., Putniņš A., Kreicbergs I., Ločs J. Scale-up of wet precipitation calcium phosphate synthesis // *Key Engineering Materials*, 2014; 604: 216–219.
49. Soothill G., Hu Y., Coates A. Can we prevent antimicrobial resistance by using antimicrobials better? // *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, 2015; 32(1): 1–59.
50. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing – EUCAST. Disk Diffusion Method for antimicrobial susceptibility testing, Manual ver. 5.0 // [http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Disk\\_test\\_documents/Manual\\_v\\_5.0\\_EUCAST\\_Disk\\_Test.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Disk_test_documents/Manual_v_5.0_EUCAST_Disk_Test.pdf) (sk. 04.02.2015.).
51. Tokiwa Y., Calabia B. P., Ugwu C. U., Aiba S. Biodegradability of plastics // *Int J Mol Sci*, 2009; 10(9): 3722–3742.
52. van de Belt H., Neut D., Schenk W., van Horn J. R., van der Mei H. C., Busscher H. J. Infection of orthopedic implants and the use of antibiotic-loaded bone cements. A review // *Acta Orthop Scand*, 2001; 72(6): 557–571.
53. Vinh D. C., Embil J. M. Device-related infections: a review // *J Long Term Eff Med Implants*, 2005; 15(5): 467–488.
54. von Eiff C., Jansen B., Kohlen W., Becker K. Infections associated with medical devices: pathogenesis, management and prophylaxis // *Drugs*, 2005; 65(2): 179–214.

55. Webb J. C., Gbejuade H., Lovering A., Spencer R. Characterisation of in vivo release of gentamicin from polymethyl methacrylate cement using a novel method // *Int Orthop*, 2013; 37(10): 2031–2036.
56. Wei B. P. C., Robins-Browne R. M., Shepherd R. K., Azzopardi K., Clark G. M., O'Leary S. J. Protective effects of local administration of ciprofloxacin on the risk of pneumococcal meningitis following cochlear implantation // *Laryngoscope*, 2006; 116(12): 2138–2144.
57. Wiegering A., Sinha B., Spor L., Klinge U., Steger U., Germer C. T., et al. Gentamicin for prevention of intraoperative mesh contamination: demonstration of high bactericide effect (in vitro) and low systemic bioavailability (in vivo) // *Hernia*, 2014; 18(5): 691–700.
58. Wright J., Paauw D. S. Complications of antibiotic therapy // *Med Clin North Am*, 2013, 97(4): 667–679.
59. Xu Q., Czernuszka J. T. Controlled release of amoxicillin from hydroxyapatite-coated poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres // *J Control Release*, 2008; 127(2): 146–1453.