



RĪGAS STRADIŅA
UNIVERSITĀTE

Ingus Skadiņš

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

Promocijas darbs
medicīnas doktora zinātniskā grāda iegūšanai

Specialitāte – mikrobioloģija

Darba zinātniskās vadītājas:
Dr. med. profesore **Juta Kroiča**
Dr. med. docente **Ilze Šalma**

Daļējs pētījuma finansējums saņemts VPP 4 “Jauni materiāli un tehnoloģijas
bioloģisko audu izvērtēšanai un aizvietošanai” ietvaros

Rīga, 2016

SATURS

ANOTĀCIJA.....	4
ABSTRACT	5
DARBĀ LIETOTIE SAĪSINĀJUMI	6
IEVADS	8
1. LITERATŪRAS APSKATS	11
1.1. Antibiotisko vielu vēsture, pielietojums un antibakteriālā rezistence	11
1.2. Kvinoloni	12
1.2.1. Ciprofloksacīna pielietojums.....	13
1.2.2. Ciprofloksacīna darbības mehānisms	13
1.2.3. Ciprofloksacīna darbības spektrs.....	14
1.2.4. Ciprofloksacīna farmakokinētika un termostabilitāte	14
1.2.5. Baktēriju rezistences mehānismi pret ciprofloksacīnu.....	15
1.2.6. Ciprofloksacīna blakusparādības	16
1.3. Aminoglikozīdi.....	16
1.3.1. Gentamicīns	17
1.3.2. Gentamicīna darbības mehānisms.....	17
1.3.3. Gentamicīna pielietojums	18
1.3.4. Gentamicīna farmakokinētika	18
1.3.5. Gentamicīna lietošanas blakusparādības.....	20
1.3.6. Baktēriju rezistences mehānismi pret gentamicīnu	19
1.4. Biomateriālu veidi un pielietojums.....	19
1.4.1. Biomateriālu saistītās infekcijas	21
1.4.2. Biomateriālu saistītās infekciju ierosinātāji un biežums	23
1.5. Iekaisums un iekaisuma marķieri. Antibakteriālie peptīdi	25
1.5.1. IL-10	25
1.5.2. TNF- α	26
1.5.3. B-defensīns-2.....	26
1.6. <i>S. epidermidis</i> un <i>P. aeruginosa</i> raksturojums, patogēnitātes faktori un ierosinātās infekcijas.....	28
1.6.1. <i>S. epidermidis</i> raksturojums.....	28
1.6.2. <i>S. epidermidis</i> patogēnitātes faktori un ierosinātās infekcijas.....	28
1.6.3. <i>S. epidermidis</i> biofilmas veidošanās process	29
1.6.4. <i>P. aeruginosa</i> raksturojums.....	31
1.6.5. <i>P. aeruginosa</i> patogēnitātes faktori un ierosinātās infekcijas	32
1.6.6. <i>P. aeruginosa</i> biofilmas veidošanās process	33
1.7. Bionoārdāmie polimēri, to raksturojums.....	35
1.7.1. Polipienskābes polimērs.....	36
1.7.2. Polikaprolaktona polimērs	37
2. MATERIĀLS UN METODES.....	38
2.1. Biomateriālu paraugi.....	38
2.1.1. HAp/PLLA+cipro un HAp/PLLA+genta	38
2.1.2. CDHAp/PCL+cipro, CDHAp/PCL+genta, CDHAp/PLLA+cipro un CDHAp/PLLA+genta.....	39
2.2. Antibakteriālo īpašību noteikšana <i>in vitro</i>	40
2.2.1. Antibakteriālo īpašību noteikšana baktēriju suspensijā	40
2.2.2. Antibakteriālo īpašību noteikšana ar disku difūzijas metodi.....	41

2.3. Izmeklējamās baktēriju kultūras un to jutība pret gentamicīnu un ciprofloksacīnu ..	42
2.4. Iekaisuma intensitātes noteikšana <i>in vivo</i>	42
2.4.1. Eksperimentā izmantotie dzīvnieki	42
2.4.2. Operācijas gaita	43
2.4.3. Izmeklējamais materiāls	45
2.5. Statistiskās metodes	45
2.6. Izmantotās literatūras meklēšana	46
3. REZULTĀTI	48
3.1. Antibiotisko vielu minimāli inhibējošā koncentrācija.....	48
3.2. HAp/PLLA+genta un HAp/PLLA+cipro antibakteriālā efektivitāte <i>in vitro</i>	48
3.3. CDHAp/PLLA+genta un CDHAp/PLLA+cipro antibakteriālā efektivitāte <i>in vitro</i>	58
3.4. CDHAp/PCL+genta un CDHAp/PCL+cipro antibakteriālā efektivitāte <i>in vitro</i>	66
3.5. IL-10 intensitāte <i>in vivo</i>	70
3.6. TNF- α intensitāte <i>in vivo</i>	73
3.7. Beta-defensīna-2 intensitāte <i>in vivo</i>	75
4. DISKUSIJA	77
4.1. Kompozītmateriālu efektivitāte <i>in vitro</i>	77
4.2. Iekaisuma citokīnu ekspresija <i>in vivo</i>	84
5. SECINĀJUMI	86
PUBLIKĀCIJAS PAR PĒTĪJUMA TĒMU	87
IZMANTOTĀ LITERATŪRA	91
PATEICĪBAS	103
PIELIKUMI.....	104

ANOTĀCIJA

Mūsdienās biomateriālus izmanto bieži, un to aktualitāte kļūst arvien nozīmīgāka, jo biomateriālus izmanto visās medicīnas nozarēs, turklāt nereti to lietošana ir dzīvību glābjoša nepieciešamība.

Taču biomateriālu plašais izmantojums, dažādie biomateriālu veidi un pielietojums ir saistīts ar būtisku medicīnisku problēmu – biomateriālu saistītām infekcijām. Atkarībā no infekcijas veida un lokalizācijas var palielināties pacienta letalitātes risks un kopējās ārstnieciskās izmaksas, jo implantātu bieži nākas aizvietot ar jaunu. Lai novērstu biomateriālu infekcijas, ir jāsamazina baktēriju adhēzija un biofilmu veidošanās. To iespējams panākt, biomateriālam pievienojot antibiotiskās vielas. Lokālai antibiotisko vielu izdalei no biomateriāla ir daudz priekšrocību, salīdzinot ar sistēmisko antibiotisko vielu nozīmēšanu pacientiem pirms un pēc implantācijas operācijas.

Šī darba mērķis ir noskaidrot kompozītmateriālu ar antibiotiskajām vielām (gentamicīnu vai ciprofloksacīnu) un biodegradējamu polimēru antibakteriālo efektivitāti pret vienu no biežākajiem pēcoperācijas infekciju ierosinātājiem – *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) un *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*), kā arī salīdzināt antibakteriālās īpašības kompozītmateriāliem ar biodegradējamu polimēru un bez tā.

Biomateriālu antibakteriālās īpašības pret *S. epidermidis* un *P. aeruginosa* tika pētītas, izmantojot standartizēto disku difūzijas metodi agara barotnē, kā arī baktēriju suspensijā.

Iekaisuma citokīnu (TNF- α un IL-10) un antibakteriālo peptīdu (β -defensīna-2) intensitāte audos ap implantēto biomateriālu tika izvērtēta *in vivo* pētījumā pēc biomateriālu paraugu implantācijas truša zemādas kabatā un kontaminācijas ar *S. epidermidis* vai *P. aeruginosa*.

Rezultāti atklāja, ka biomateriāliem ar bionoārdāmo polimēru un antibiotiskajām vielām antibakteriālās darbības laiks ir statistiski ticami ilgāks nekā biomateriāliem ar antibiotiskajām vielām bez bionoārdāma polimēra. Antibakteriālās darbības laiku neietekmē metode, ar kādu nosaka biomateriālu antibakteriālās īpašības, bet to būtiski ietekmē biomateriālu porainības līmenis, jo biomateriāliem ar zemāku porainības līmeni ir statistiski ticami īsāks antibakteriālās darbības laiks nekā biomateriāliem ar augstāku porainības līmeni.

In vivo pētījuma rezultāti rāda, ka pēc antibiotisko vielu saturošu kompozītmateriālu implantācijas apkārtējos audos ap biomateriālu nenovēro paaugstinātu iekaisuma citokīnu un antibakteriālo peptīdu klātbūtni. Paaugstināta iekaisuma citokīnu un antibakteriālo peptīdu ekspresija tiek novērota audos ap biomateriālu pēc antibiotikas nesaturošu biomateriālu implantācijas un kontaminācijas ar baktēriju tīrkultūru.

ABSTRACT

Nowaday, biomaterials are used more frequently and are becoming increasingly important as biomaterials are used in all medical fields, and often the use of biomaterials are of life saving importance.

Due to the extensive use and applications of biomaterials, and different types of biomaterials associated infections which are a significant medical problem. Depending on the type of infection, it may increase the patient's risk of mortality, and increase the total cost of treatment due to necessary replacement of biomaterial. To prevent infection of biomaterials, it is necessary to reduce bacterial adhesion and biofilm formation on the biomaterial. This can be achieved with the use of antimicrobial substances. Local antibiotic substances released from the biomaterial is an advantage compared with most systemic antibiotic which are given to the patients before and after implantation surgery.

The aim of this work is to exam the antibacterial efficiency of hydroxyapatite biomaterials with antibiotics (gentamicin or ciprofloxacin) and biodegradable polymer against the most common post-operative causative agents – *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) and *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*). This work also compares the antimicrobial properties of composite materials with biodegradable polymers and without biodegradable polymers. Antibacterial properties of biomaterials were investigated against *S. epidermidis* and *P. aeruginosa* by using a standardized disc diffusion method in an agar medium, and in the bacterial suspension.

The intensity of Inflammatory cytokines (TNF- α a IL-10) and antibacterial peptides (β -defensina-2) were tested in an *in vivo* study after a biomaterial sample implantation in the rabbits subcutaneous pocket and wound contamination with *S. epidermidis* or *P. aeruginosa*.

The results showed that the biomaterials with biodegradable polymer and antibiotic substances have statistically significantly longer antibacterial time than the biomaterials with antibiotic substances without the biodegradable polymer. The method which was used doesn't influence the antibacterial properties of biomaterials. The porosity level of biomaterials influences on antibacterial time, the biomaterials with lower porosity level have statistically significantly shorter antibacterial time than biomaterials with higher porosity levels.

In vivo study results showed that after composite material implantation with antibiotic substances, levels of inflammatory cytokines and antimicrobial peptides doesn't increase in the surrounding tissues around biomaterials. Increased levels inflammatory cytokines and antibacterial peptides are in the tissue around biomaterials, after an implantation of biomaterials without antibiotic substances.

DARBĀ LIETOTIE SAĪSINĀJUMI

Saīsinājums	Nosaukums angļu / latīņu valodā	Nosaukums latviešu valodā
AIDS	<i>acquired Immune Deficiency Syndrome</i>	iegūts imūndeficīta sindroms
ASV	<i>United States of America</i>	Amerikas Savienotās Valstis
B ly	<i>B lymphocyte</i>	B limfocīts
BAI	<i>biomaterial associated infections</i>	biomateriālu saistītās infekcijas
Bap	<i>biofilm associated proteins</i>	ar biofilmu asociētais proteīns
CD	<i>calcium deficient</i>	kalcija deficīts
Cipro	<i>ciprofloxacin</i>	ciprofloksacīns
DNS	<i>deoxyribonucleic acid</i>	dezoksiribonukleīnskābe
eDNS	<i>extracellular deoxyribonucleic acid</i>	ekstracelulāra dezoksiribonukleīnskābe
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>	enzīmu saistošā imūnabsorbcijas metode
Genta	<i>gentamicin</i>	gentamicīns
HAp	<i>hydroxyapatite</i>	hidroksiapatīts
IFN-γ	<i>interferon gamma</i>	interferons gamma
IgA	<i>immunoglobulin A</i>	imūnglobulīns A
IgG	<i>immunoglobulin G</i>	imūnglobulīns G
IL-1	<i>interleukin-1</i>	interleikīns-1
IL-6	<i>interleukin-6</i>	interleikīns-6
IL-10	<i>interleukin-10</i>	interleikīns-10
IL-12	<i>interleukin-12</i>	interleikīns-12
KVV	<i>colonies forming units (CFU)</i>	kolonijas veidojošās vienības
LPS	<i>lipopolysaccharides</i>	lipopolisaharīdi
MCH II	<i>major histocompatibility complex II</i>	galvenais audu saderības komplekss II
MIC	<i>minimum inhibitory concentration</i>	minimāli inhibējošā koncentrācija
MRSA	<i>Methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i>	meticilīnrezistentais <i>Staphylococcus aureus</i>
MRSE	<i>Methicillin-resistant Staphylococcus epidermidis</i>	meticilīnrezistentais <i>Staphylococcus epidermidis</i>
NK	<i>natural killer cells</i>	dabīgās galētājšūnas
PBP	<i>penicillin binding proteins</i>	penicilīnu saistošais proteīns
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>	fosfāta buferšķīdums
PCL	<i>polycaprolactone</i>	polikaprolaktons
PGA	<i>polyglycolide</i>	poliglikolīds
PHB	<i>polyhydroxybutyrate</i>	polihidroksibutirāts
PIA	<i>intercellular polysaccharide adhesin</i>	intercelulārais polisaharīda adhezīns
PLGA	<i>polylactic-co-glycolic acid</i>	polipien-ko-glikolskābe
PLLA	<i>polylactic acid</i>	polipienskābe
RNS	<i>ribonucleic acid</i>	ribonukleīnskābe
SEM	<i>scanning electron microscope</i>	skenējošā elektronmikroskopija
Spp.	<i>multiple species</i>	vairākas sugas

TCP	<i>tricalcium phosphate</i>	trikalcija fosfāts
Th ₁	<i>T helper cells subpopulation 1</i>	T palīgšūnas subpopulācija-1
Th ₂	<i>T helper cells subpopulation 2</i>	T palīgšūnas subpopulācija-2
TNF- α	<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 vārstuļus 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 izdale, 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- α un antibakteriālā peptīda β -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 komplektus pētījumam *in vivo*. Pētījums *in vivo* tika veikts Rīgas Stradiņa universitātes eksperimenta dzīvnieku audzētavā. Pētītie biomateriāli tika oriģināli sintezēti Rīgas Tehniskās universitātes Rūdolfa Cimdīņa 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. LITERATŪRAS APSKATS

1.1. Antibiotisko vielu vēsture, pielietojums un antibakteriālā rezistence

Antibiotiskās vielas ir medikamenti, kas tiek lietoti mikrobu nonāvēšanai (baktericīda darbība) vai to augšanas nomākšanai (bakteriostatiska darbība). Šobrīd ir zināmas aptuveni 15 antibiotisko vielu klases, un joprojām notiek aktīva jaunu antibiotisko vielu meklēšana un atklāšana. Savstarpēji antibiotiskās vielas atšķiras ar ķīmisko struktūru, darbības spektra plašumu, kā arī darbības mehānismu un veidu, kā tās ietekmē baktērijas (baktericīdi vai bakteriostatiski). Baktericīda darbība ir antibiotisko vielu spēja nonāvēt baktēriju, bet bakteriostatiska darbība ir antibiotisko vielu spēja inhibēt baktēriju augšanu (Aminov, 2010).

Ar Aleksandra Fleminga atklājumu 1928. gadā, kad viņš novēroja *Staphylococcus aureus* augšanas inhibīciju ap *Penicillium notatum* pelējuma sēnīti (Fleming, 1929), aizsākās mūsdienu antibiotisko vielu vēsture. Zināms, ka jau sen pirms “antibiotisko vielu ēras” aizsākuma 20. gs, sākumā senie grieķi, ēģiptieši un ķīnieši veidoja augu maisījumus, apstrādājot inficētas brūces. Tādējādi cilvēki jau vairāk nekā pirms diviem gadiem tūkstošiem centās iegūt antiseptiskus līdzekļus, kas mazinātu infekciju attīstības iespēju (Clardy et al., 2009). Veselus divpadsmit gadus Flemings neveiksmīgi centās pievērst zinātnieku uzmanību *Penicillium notatum* antibakteriālajām īpašībām, līdz 1940. gadā divi Oksfordas universitātes zinātnieki – Hovards Florejs (Howard Walter Florey) un Ernests Čeins (Ernest Boris Chain) – neatkarīgi no Fleminga pētījumiem prezentēja savu darbu par penicilīna antibakteriālajām īpašībām (Chain et al., 1940). 1945. gadā par saviem atklājumiem visi trīs zinātnieki saņēma Nobela prēmiju fizioloģijā un medicīnā (Ligon, 2004).

Antibiotisko vielu atklāšana turpinājās, un 1943. gadā, mikrobiologs Selmans Vaksman (Selman Waksman) atklāja aminoglikozīdu klases antibiotisko vielu pārstāvi streptomīnu, kas vēlāk tika lietots tuberkulozes ārstēšanā. Streptomīns tika ļoti plaši lietots, bet tam piemita daudz blakusparādību (Waksman et al., 1942). Vēl pēc divpadsmit gadiem Amerikas Savienotajās Valstīs Loids Konovers (Lloyd Conover) sintezēja plaša darbības spektra sintētisko antibiotisko vielu tetraciklīnu. Līdz tetraciklīnu spēja sintezēt laboratorijā, pagāja aptuveni desmit gadi kopš tā izdalīšanas no *Actinomices* (Chopra et al., 2001). Arī turpmākajos gados turpinājās pētījumi antibiotisko vielu nozarē, un tika iegūtas jaunas antibiotisko vielu klases, kas bija neaizvietoājams medicīnas nozares ieguvums daudzu pacientu dzīvības glābšanā (Aminov, 2010).

Antibiotiskajām vielām izšķir trīs galvenos darbības mehānismus: tie inhibē 1) baktēriju nukleīnskābju (DNS vai RNS) replikāciju vai sintēzi, 2) proteīnu sintēzi baktērijās un 3) baktēriju šūnas sienas sintēzi (*Kohanski et al.*, 2010).

Aizvien plašāk, biežāk un dažkārt nevajadzīgi lietojot antibiotiskās vielas, attīstās baktēriju rezistence pret antibiotiskajām vielām, kas ir nozīmīga problēma medicīnas nozarē, ārstējot infekcijas slimības. Eiropā katru gadu aptuveni 25 tūkstoši pacientu nomirst multirezistentu baktēriju infekciju dēļ (*Aminov*, 2009).

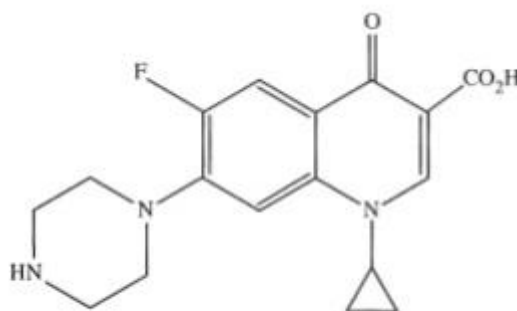
Galvenie faktori, kas ietekmē baktēriju rezistences veidošanos pret antibiotiskajām vielām, ir antibiotisko vielu dažāda klāsts un plašais spektrs, kas, terapijā nesamērīgi izmantojot antibiotiskās vielas, izraisa arvien plašāku baktēriju rezistenci. Tāpēc, lai samazinātu baktēriju rezistences attīstību pret antibiotiskajām vielām, ir ļoti svarīgi pacientam izrakstīt pēc darbības spektra visatbilstošākās antibiotiskās vielas, izvēloties optimālo devu un ievades veidu, un nepieciešamības gadījumos pirms antibakteriālās terapijas sākšanas veikt antibiotisko vielu jutības testus un slimības ierosinātāja identifikāciju (*Caron et al.*, 2010).

1.2. Kvinoloni

Kvinoloni kā antibiotiskās vielas tika atklāti 1962. gadā, un kopš tā laika kvinolonu klasei izšķir četras paaudzes (*Leshner et al.*, 1962). Pie pirmās paaudzes kvinoloniem pieder nalidiksicīnskābe, ko biežāk izmanto urīnceļu infekciju gadījumā. Galvenais darbības spektrs ir gramnegatīvās baktērijas, izņemot *P. aeruginosa*. Otrās paaudzes kvinoloniem ir antibakteriālā aktivitāte pret *P. aeruginosa*, un ne tikai pret gramnegatīvajām baktērijām, bet arī pret grampozitīvām baktērijām, piemēram, *S. epidermidis*. Otrās paaudzes kvinolonus var izmantot pret atipisko baktēriju ierosinātām saslimšanām, tādām kā *Mycoplasma spp.*, *Legionella pneumonia* u. c. Pie otrās paaudzes kvinoloniem pieder ciprofloksacīns, norfloksacīns, lomefloksacīns u. c. Otrās paaudzes kvinoloniem ir maza aktivitāte pret *Streptococcus pneumoniae*, bet trešās paaudzes kvinoloniem ir lielāka aktivitāte pret šo ierosinātāju, tāpēc levofloksacīnu rekomendē sadzīvē iegūto pneimoniju ārstēšanā. Trijām pirmajām kvinolonu paaudzēm nav antibakteriālās aktivitātes pret anaerobām baktērijām, taču ceturtās paaudzes fluorhinoloniem ir plaša spektra aktivitāte pret anaerobām baktērijām un rezistentajām baktērijām (*King et al.*, 2000).

1.2.1. Ciprofloksacīna pielietojums

Ciprofloksacīns pieder pie otrās paaudzes kvinoloniem, un to no šīs paaudzes antibiotiskajām vielām klīnikās lieto visbiežāk (*Oliphant et al.*, 2002). Ciprofloksacīna ķīmiskā formula ir $C_{17}H_{18}FN_3O_3$ (1.1. attēls). To var lietot perorāli vai intravenozi pieaugušajiem tādu bakteriālo slimību ārstēšanā kā urīnceļu infekcijas (uretrīts, cistīts, pielonefrīts), hronisks bakteriāls prostatīts (*Nabera et al.*, 2000), akūts sinusīts, apakšējo elpošanas ceļu infekcijas (pneimonija, bronhīts, traheobronhīts), izņemot gadījumus, kad augšējo elpošanas ceļu infekcijas ierosinātājs ir *S. pneumoniae* (*Low*, 2005), ādas infekcijas (celulīts, folikulīts), kaulu vai saišu infekcijas (septisks artrīts, osteomielīts), intraabdominālas infekcijas (peritonīts, holecistīts, holangīts u. c.), infekciozā diareja (*Solomkin et al.*, 2010) u. c. infekcijas, ko izraisa gramnegatīvās un grampozitīvās aerobās baktērijas.



1.1. attēls. Ciprofloksacīna ķīmiskā struktūra
(*Ball*, 2000)

1.2.2. Ciprofloksacīna darbības mehānisms

Ciprofloksacīnam piemīt baktericīda iedarbība, un tās pamatā ir spēja inhibēt DNS sintēzi baktērijās, inhibējot divus DNS topoizomerāžu klases enzīmus – DNS girāzi un topoizomerāzi IV. Šiem enzīmiem ir svarīga loma baktērijas DNS replikācijas, transkripcijas un rekombinēšanas procesos. DNS žirāze ir tetramērs, kas sastāv no 2 GyrA un 2 GyrB apakšvienībām. Topoizomerāze IV sastāv no 2 ParC un 2 ParE apakšvienībām. DNS girāze un topoizomerāze IV ir strukturāli līdzīgas, jo ParC ir homologs GyrA, un ParE ir homologs GyrB. Topoizomerāze IV darbojas DNS replikācijas beigu fāzē, nodrošinot meitromosomu atdalīšanos. Ciprofloksacīns inhibē šos enzīmus, stabilizējot DNS-girāzes kompleksu vai DNS-topoizomerāzes IV kompleksu. Šie stabilizētie kompleksi bloķē turpmāko DNS replikāciju, un baktērijas strauji aiziet bojā. (*Hooper et al.*, 1987; *LeBel*, 1988).

1.2.3. Ciprofloksacīna darbības spektrs

Starp visiem kvinoloniem ciprofloksacīns vislabāk darbojas pret gramnegatīvajām baktērijām, un to iesaka kā labāko antibakteriālo līdzekli pret *P. aeruginosa* ierosinātām saslimšanām. Ciprofloksacīnu izmanto pret tādiem gramnegatīvajiem ierosinātājiem kā *Escherichia coli* (*E. coli*), *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Campylobacter jejuni*, *Proteus spp.*, *Shigella spp.*, *Neisseria gonorrhoeae* un citas. Ciprofloksacīna darbības spektrs pret grampozitīvām baktērijām ir mazāks un tā aktivitāte ir zemāka nekā pret gramnegatīvajām baktērijām (Campoli-Richards et al., 1988). Nozīmīgākie grampozitīvie ierosinātāji, pret kuriem izmanto ciprofloksacīnu, ir *S. aureus*, *S. epidermidis* un *Streptococcus spp.* (Wolfson et al., 1985). Pret anaerobām baktērijām ciprofloksacīns netiek izmantots, jo tikai 31% anaerobo baktēriju ir jutīgas pret ciproflokacīnu, kas ir mazāk, nekā izmantojot citu antibiotisko vielu grupu līdzekli (Sutter et al., 1985). Ciprofloksacīns tiek rekomendēts pieaugušajiem kaulu un saišu infekciju gadījumā. Osteomielītu ierosina virkne gramnegatīvu baktēriju, piemēram, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *P. aeruginosa*, kā arī grampozitīvas baktērijas – *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* un citi koagulāzes negatīvie stafilokoki (MacGregor et al., 1990).

Aptuveni 3% no visiem infekciozā endokardīta gadījumiem ierosina HACEK grupas mikroorganismi (*Haemophilus spp.*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Cardiobacterium hominis*, *Eikenella spp.*, *Kingella spp.*), kas ir gramnegatīvās baktērijas. Visas šīs baktērijas ir cilvēka normālās mikrofloras pārstāvji (Das et al., 1997). Ņemot vērā ciprofloksacīna efektivitāti pret gramnegatīvām baktērijām, to iesaka kā alternatīvu antibiotisko vielu dabīgo un protēžu vārstuļu infekciju terapijā (Gould et al., 2012).

1.2.4. Ciprofloksacīna farmakokinētika un termostabilitāte

Ciprofloksacīns metabolizējas nierēs un daļēji arī aknās par vismaz četriem metabolītiem – 2-aminoetilamino (M1), sulfociprofloksacīnu (M2), oksociprofloksacīnu (M3) un N-formilciprofloksacīnu (M4). Šo metabolītu aktivitāte ir mazāka par ciprofloksacīna aktivitāti, taču varētu būt līdzīga citām kvinolonu grupas antibiotikām (M3 un M4 darbība ir salīdzināma ar norfloksacīna darbību) (Vance-Bryan et al., 1990, Landersdorfer et al., 2010). Ciprofloksacīns un tā metabolīti tiek ekskretēti ar urīnu un fēcēm. Nemetabolizētais ciprofloksacīns (66%) tiek ekskretēts ar urīnu, pateicoties glomerulārajai filtrācijai un tubulārajai sekrēcijai.

Maksimālā ciprofloksacīna koncentrācija serumā tiek sasniegta pēc 1–2 stundām, tam uzsūcoties gastrointestinālajā traktā. Lietojot ciprofloksacīnu perorāli 250 mg, 500 mg vai 750 mg devā pieaugušajiem ar normālu nieru funkciju, vidējā koncentrācija serumā ir 0,1 µg/ml, 0,2 µg/ml un 0,4 µg/ml (*Payen et al.*, 2003).

Pieaugušajam ar normālu nieru funkciju ciprofloksacīna pussabrukšanas periods ir vidēji 4 stundas. 10–15% ciprofloksacīna tiek ekskretēts neizmainīts ar urīnu un 10–15% – kā metabolīti 24 stundu laikā. 40% ciprofloksacīna neizmainītā un metabolizētā veidā tiek ekskretēti ar fēcēm 5 dienu laikā. Liela daļa neizmainītā ciprofloksacīna, izdaloties žultij, parādās fēcēs. Ciprofloksacīns aktīvā formā ir konstatēts siekalās, deguna un bronhu sekrētā, gļotādās, limfā, peritoneālajā šķidrumā, žultī, plaušās, ādā, taukaudos, muskuļos, kaulos, daļēji arī dzimumorgānos, īpaši prostatas sekrētā. Nenozīmīgi maza ciprofloksacīna koncentrācija spēj difundēt cerebrospinālajā šķidrumā (*LeBel et al.*, 1988). Tiek rekomendēts ciprofloksacīnu glabāt 18–29 °C temperatūrā un nepieļaut tiešu UV staru iedarbību (*Eisenhart et al.*, 2012). Ciprofloksacīna koncentrācija dažādās temperatūrās ir atšķirīga (1.1. tabula).

1.1. tabula

Ciprofloksacīna šķīduma (25 mg/mL) koncentrācijas izmaiņas laikā atkarībā no temperatūras izmaiņām (*Eisenhart et al.*, 2012)

Laiks (stundas)	Temperatūra (°C)			
	32	50	71	93
1	19,55 mg/mL	N/A	22,64 mg/mL	23,75 mg/mL
4	22,09 mg/mL	24,40 mg/mL	11,84 mg/mL	20,97 mg/mL
16	10,84 mg/mL	23,90 mg/mL	N/A	2,74 mg/mL

1.2.5. Baktēriju rezistences mehānismi pret ciprofloksacīnu

Baktēriju rezistence pret antibiotiskām vielām, ieskaitot fluorhinolonus, ir izplatīta problēma antibakteriālajā terapijā. Kopš pirmās paaudzes fluorhinolonu lietošanas 1962. gadā tiek novērota baktēriju rezistence pret šīs klases antibiotiskajām vielām. Baktēriju rezistence pret ciprofloksacīnu attīstās mutāciju rezultātā, kas skar *gyrA* un *parC* gēnus. Gramnegatīvajām baktērijām biežāk rezistence attīstās izmainītas DNS girāzes, bet grampozitīvajām baktērijām – izmainītas topoizomerāzes IV enzīmu gēnos. Bez šiem rezistences mehānismiem baktērijām novēro arī effluksa sūkņa rezistences mehānismu (*Fantin et al.*, 2009). Daudzas baktērijas rezistenci pret antibiotiskajām vielām iegūst ar *Qnr* plazmīdu palīdzību (*Poirel et al.*, 2005). Pēc ASV slimnīcās veiktajiem pētījumiem, pret ciprofloksacīnu biežāk rezistence tiek novērota baktērijām, kurām jau ir rezistence pret citu grupu antibiotiskajām vielām, piemēram, 90% MRSA baktēriju tiek novērota rezistence pret

ciprofloksacīnu. Rezistentajām *Actinetobacter baumannii* 60% gadījumu tiek novērota rezistence pret ciprofloksacīnu. Gandrīz vai visiem (98%) vankomicīna rezistentajiem *Enterococcus* tiek novērota rezistence pret ciprofloksacīnu. Savukārt tikai 25% *P. aeruginosa* gadījumu tiek novērota rezistence pret ciprofloksacīnu (Jacoby, 2005; Dalhoff, 2012). Starp visiem urīnceļu infekciju gadījumiem, ko ierosina *P. aeruginosa*, 58,8% gadījumu baktērijas bija rezistentas pret ciprofloksacīnu (Mandal et al., 2012).

1.2.6. Ciprofloksacīna ierosinātās blakusparādības

Ciprofloksacīns ir antibiotiska viela, kurai piemīt plaša spektra un efektīvs darbības mehānisms, bet atsevišķiem pacientiem bez vēlamā efekta ir novērojamas arī nevēlamas blakusparādības. Viena no galvenajām blakusparādībām, kas raksturīga ciprofloksacīna terapijai, ir cīpslu iekaisumi un plīsumi (Kim et al., 2010). Paaugstināts cīpslu plīsuma risks ir pacientiem pēc 60 gadu vecuma, kuri lieto kortikosteroīdu preparātus, kā arī pacientiem pēc orgānu transplantācijas operācijām. Visbiežāk šī ciprofloksacīna lietošanas komplikācija skar Ahileja cīpslu (Yu et al., 2005).

Lietojot ciprofloksacīnu antibakteriālajā terapijā, nevēlamas blakusparādības tiek novērotas 5–14% pacientu. Šo blakusparādību dēļ 1,0% pacientu tiek atcelta ciprofloksacīna lietošana, nomainot to pret citu antibiotisko vielu. Parasti 2,1 līdz 5,5% pacientu, lietojot ciprofloksacīnu, ir slikta dūša un vemšana. Līdz 2,1% pacientu pēc ciprofloksacīna lietošanas ir diareja, bet izsutumīgi uz ādas ir 1,6% pacientu. Tādas centrālās un perifērās nervu sistēmas blakusparādības kā galvas reiboņi un sāpes tiek novērotas 0,4 līdz 1,5% pacientu pēc ciprofloksacīna lietošanas.

Salīdzinot ar citu paaudžu fluorhinoloniem, pēc ciprofloksacīna lietošanas blakusparādības pacientiem novēro retāk (Wilton et al., 1996).

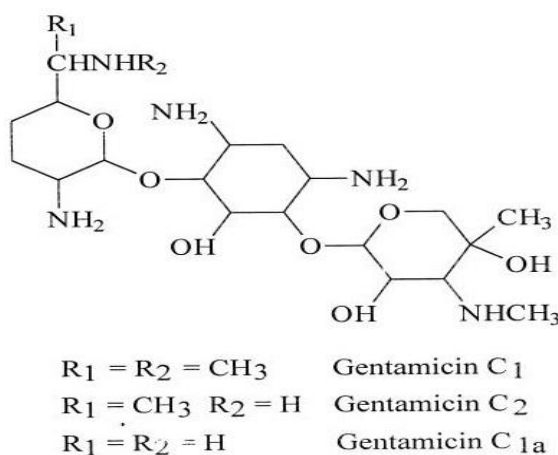
1.3. Aminoglikozīdi

Mēģinot atklāt antibiotiskās vielas, kuras būtu līdzīgas penicilīnam, no *Streptomyces griseus* tika izdalīts pirmais aminoglikozīdu pārstāvis streptomīns, kuru joprojām izmanto tuberkulozes ārstēšanā (Waksman et al., 1944). Vairākus gadus vēlāk no *Streptomyces spp.* tika izdalītas arī citas antibiotiskās vielas, kuras pieder pie aminoglikozīdu klases, piemēram, neomicīns tika izdalīts no *Streptomyces fradiae* un kanamicīns – no *Streptomyces kanamyceticus* (Waksman et al., 1949; Umezawa et al., 1957). Kā viens no pēdējiem aminoglikozīdu klases pārstāvjiem tika izdalīts tobramicīns no *Streptomyces tenebrarius*

(Higgins *et al.*, 1967). Aminoglikozīdi ir plaša spektra antibiotiskās vielas, ko galvenokārt lieto gramnegatīvu baktēriju ierosinātu saslimšanu ārstēšanā, bet aminoglikozīdi ir efektīvi arī pret grampozitīvām baktērijām (Moore *et al.*, 1987).

1.3.1. Gentamicīns

Gentamicīns ir antibiotiskā viela, kas pieder pie aminoglikozīdu klases. Tā ķīmiskā formula ir $C_{21}H_{43}N_5O_7$ (1.2. attēls). To izdalīja 1963. gadā no *Micromonosporum purpurea*. Gentamicīnam ir plašs darbības spektrs, un to galvenokārt lieto aerobo gramnegatīvo baktēriju (*P. aeruginosa*, *Proteus spp.*, *Serratia spp.* u. c.) ierosinātu infekciju antibakteriālā terapijā. Gentamicīnu lieto arī grampozitīvo *Staphylococcus spp.* izraisītu infekciju gadījumā (Weinstein *et al.*, 1963). Gentamicīns sastāv no trīs pamatvienībām: C1, C1a, C2, kā arī citām mazākām daļām. Starp dažādiem gentamicīna preparātiem pastāv šo subvienību variācijas, ko nosaka konkrētā preparāta ražotājs (Isoherranen *et al.*, 2000).



1.2. attēls. Gentamicīna ķīmiskā struktūra
(Isoherranen *et al.*, 2000)

1.3.2. Gentamicīna darbības mehānisms

Gentamicīna baktericīdās darbības pamatā ir neatgriezeniska saistīšanās ar baktērijas ribosomām, tādējādi inhibējot proteīnu sintēzi. Ir noskaidrots, ka baktēriju ribosomu 30S subvienība sastāv no 16S RNS un ribonukleotīdu kompleksa, kura galvenā funkcija tiek realizēta mRNS translācijas laikā. Piesaistoties pie 16S rRNS gentamicīns veido stabilu kompleksu, kas noved pie kodona-antikodona nesakritības, un rezultātā šūna producē defektīvus proteīnus, kas ir šūnas nāves iemesls (Lambert, 2012).

1.3.3. Gentamicīna pielietojums

Gentamicīnu lieto *E. coli*, *P. aeruginosa* un citu gramnegatīvu baktēriju ierosinātu urīnceļu infekciju gadījumā. Kombinācijā ar beta laktāmu antibiotiskajām vielām gentamicīnu lieto gramnegatīvu baktēriju izraisītas sepses gadījumā, ko visbiežāk ierosina *P. aeruginosa*. Gentamicīnu iesaka lietot pret antibiotiskām vielām rezistentu ierosinātāju gadījumā, visbiežāk pret *P. aeruginosa*, *Klebsiella spp.*, *Acinetobacter baumannii* (Leibovici et al., 2009).

Staphylococcus spp. un beta hemolītisko *Streptococcus spp.* ierosināta bakteriāla endokardīta gadījuma kā antibakteriālais līdzeklis tiek nozīmēts gentamicīns. Ņemot vērā, ka šīm baktērijām pastāv rezistences iespējamība pret gentamicīnu, to nozīmē kopā ar beta laktāma antibiotiskām vielām, piemēram, penicilīnu (Graham et al., 2002).

1.3.4. Gentamicīna farmakokinētika

Gentamicīna terapijas laikā tas strauji uzsūcas parenterāli un pēc 30–90 minūtēm sasniedz maksimālo koncentrāciju serumā. Pieaugušam cilvēkam ar normālu nieru funkciju gentamicīna pussabrukšanas laiks ir 2–3 stundas, tas tiek ekskretēts caur nieru glomerulāro filtrāciju nemodificētā veidā proporcionāli tā koncentrācijai serumā. Gentamicīna eliminācija ir atkarīga no nieru funkcijas, respektīvi, seruma kreatinīna koncentrācijas, glomerulārās filtrācijas ātruma un kreatinīna klīrensa (Tam et al., 2006; Lazebnik et al., 1985).

1.3.5. Gentamicīna lietošanas blakusparādības

Galvenās toksiskās īpašības, kas piemīt gentamicīnam, ir ototoksicitāte, neirotoksicitāte un nefrotoksicitāte. Blakusparādības skar pacientus ar nieru mazspēju, cistisko fibrozi un gados vecākus pacientus, kuriem nozīmētas lielas gentamicīna devas (Smyth et al., 2010). Līdzsvara un dzirdes traucējumi gentamicīna lietošanas laikā ir tādēļ, ka tas skar VIII kraniālo nervu. Gentamicīna antibakteriālās terapijas laikā 47% pacientu attīstās līdzsvara traucējumi, bet 38% – tikai līdzsvara traucējumi. Smagākos gadījumos pēc antibakteriālās terapijas beigām vai atcelšanas gadījumā var attīstīties daļējs vai pilnīgs neatgriezenisks kurlums. Dzirdes traucējumus novēro 3% pacientu (Ahmed et al., 2012). Pēc gentamicīna lietošanas aptuveni 17–33% pacientu ar ototoksicitāti ir konstatēta ģenētiska predispozīcija ototoksicitātei. Aminoglikozīdu ototoksicitātes predispozīcija ir saistīta ar mitohondriālo DNS. Eiropā šīs predispozīcijas incidence ir 1 : 500 (Huth et al., 2011). Tāpat pie gentamicīna blakusparādībām ir pieskaitāmi arī nieru darbības traucējumi, kas attīstās 42% pacientu

(Ahmed et al., 2012). Gentamicīnam akumulējoties nieru proskimālajos, distālajos un savācējkanāliņos, var attīstīties proteinūrija, albuminūrija un smagākos gadījumos – tubulārā nekroze (Mingeot-Leclercq et al., 1999).

1.3.6. Baktēriju rezistences mehānismi pret gentamicīnu

Plašā gentamicīna izmantošanas iespēja bakteriālo infekciju terapijā ir novedusi pie pieaugošas baktēriju rezistences pret šo antibiotisko vielu. Biežākais baktēriju rezistences mehānisms pret gentamicīnu un citiem aminoglikozīdiem ir saistīts ar antibiotisko vielu enzīmu modifikāciju. Gentamicīna gadījumā to nodrošina trīs baktērijas enzīmi: aminoglikozīdu acetiltransferāze, aminoglikozīdu fosfotransferāze un aminoglikozīdu nukleotīdtransferāze. Šo enzīmu ietekmē gentamicīna darbība tiek nomākta un tas zaudē spēju saistīties ar baktēriju ribosomām (Green et al., 2013). *P. aeruginosa* šī rezistence var būt kodēta plazmīdu vai hromosomālā līmenī (Poole, 2005). Hromosomāli kodēts ir baktēriju rezistences mehānisms, kad izmainās šūnas membrānas permabilitāte un tādējādi antibiotiskā viela nenonāk šūnā (Mingeot-Leclercq et al., 1999). Pie galvenajiem baktēriju rezistences mehānismiem pret gentamicīnu ir pieskaitāms effluxa sūkņa mehānisms (Aires et al., 1999). Saskaņā Indijas apdegumu nodaļas pētījuma datiem biežāk rezistentie mikroorganismi pret gentamicīnu ir *P. aeruginosa*. Apdegumu pacientiem, kuriem *P. aeruginosa* tika izolēta no apdeguma brūces, 81,03% gadījumu baktērija bija rezistenta pret gentamicīnu (Biswal et al., 2014). Apmēram 9% gadījumu *P. aeruginosa* bija rezistenta pret gentamicīnu, kas tika izdalītas no peldbaseiniem un karstajām vannām (Lutz et al., 2011). Savukārt klīniski veselu cilvēku urīna paraugos atklāja 29% rezistentu *P. aeruginosa* pret gentamicīnu (Chikwendu et al., 2010).

1.4. Biomateriālu veidi un pielietojums

Biomateriālu evolūcija daudzu gadu laikā ir strauji attīstījusies, un mūsdienās biomateriāli tiek izmantoti jebkurā medicīnas nozarē – ne tikai lai glābtu pacienta dzīvību, bet arī lai veiktu pacienta aprūpi un diagnostiku. Joprojām notiek meklējumi pēc ideālā biomateriāla. Šajā sacensībā tiek izmantotas daudzas biomateriālu grupas (Huebsch et al., 2009).

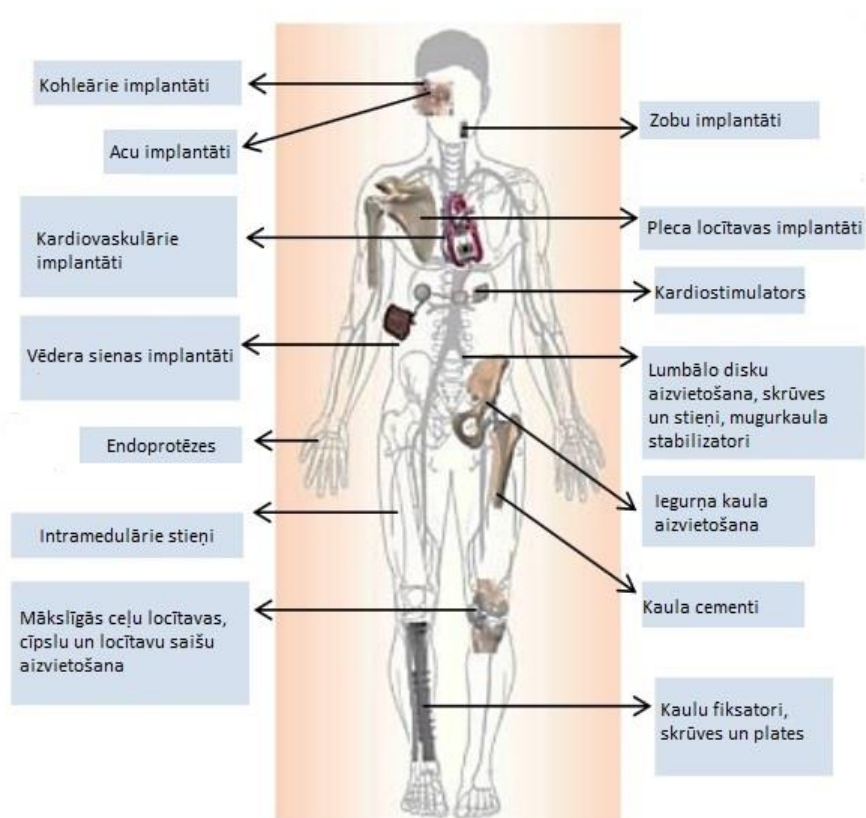
Medicīnā izmantojamus biomateriālus var iedalīt vairākās grupās atkarībā no to pielietojuma, uzbūves un izmantošanas. Pēc bioloģiskā uzdevuma biomateriālus iedala 1) toksiskajos biomateriālos, kuri izraisa toksisku reakciju uz apkārtētajiem audiem,

2) bioinertajos biomateriālos, kuri nekādā veidā nereaģē ar cilvēka ķermeņa audiem un šūnām, un 3) bioaktīvajos biomateriālos, uz kuriem notiek pastiprināta audu reģenerācija un reakcijas (*Chatzistavrou et al.*, 2015). Pēc tā, cik ilgi biomateriālus paredzēts izmantot, tos iedala divās apakšgrupās – pagaidu un paliekošajos (uz visu atlikušo dzīvi) biomateriālos. Pagaidu biomateriālus iedala neuzsūcošos un uzsūcošos. Neuzsūcošos biomateriālus pēc kāda noteikta laika tie ir jāizņem, kad, piemēram, ir notikusi kaulu pilnīga sadzīšana. Savukārt uzsūcošie biomateriāli laika gaitā uzsūcas, un nav vajadzīga to izņemšana (*DiZerega et al.*, 2010). Biomateriālus iedala arī pēc to rakstura, un šī grupa veido lielāko un plašāk izmantoto biomateriālu klasi.

Metāla un metālisko sakausējumu biomateriālus plaši izmanto ortopēdiskajās operācijās. Biežāk izmantotie metāli šāda veida biomateriāliem ir dzelzs, titāns, niķelis un kobalts (*Chen et al.*, 2015). Titānu un titāna sakausējumus visbiežāk izmanto zobārstniecībā zobu implantātiem (*Yamagami et al.*, 2014).

Keramikas biomateriālu galvenā priekšrocība starp visiem biomateriāliem ir to līdzība kaulam, kas padara šo biomateriālu plaši izmantojamu ortopēdiskos un dentālos implantātos ar labām osteointegrācijas spējām. Galvenie keramikas biomateriāli ir hidroksiapatīts, kalcija fosfāti un bioaktīvais stikls (*Höland et al.*, 2008; *Sáenz et al.*, 1999).

Arvien populārāka kļūst polimēru biomateriālu izmantošana – zobu implantātos, ortopēdiskās protēzēs un lokālas medikamentu izdales sistēmās. No polimēru biomateriāliem ir vieglāk pagatavot vajadzīgo formu, salīdzinot ar citiem biomateriāliem, tāpēc tos lieto zobu implantātos, intravenozos katetros, mākslīgo sirds vārstuļu, diegu, lēcu veidošanā (*Seala et al.*, 2001). Polimēri, kuriem piemīt bionoārdīšanās spēja, tiek izmantoti ne tikai antibiotisko vielu, bet arī anestēzijas līdzekļu un citu zāļu izdalīšanai (*Kohane et al.*, 2008). Biomateriālu daudzveidīgā izmantošana ir atspoguļota 1.3. attēlā.



1.3. attēls. **Biomateriālu izmantošana cilvēka ķermenī**
(pēc Patel et al., 2012)

1.4.1. Biomateriālu saistītās infekcijas

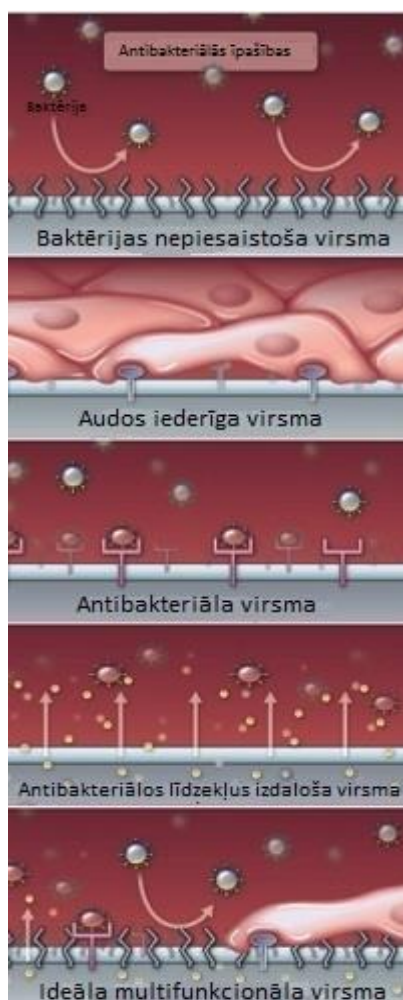
BAI ir infekcijas, kas rodas pēc dažādu biomateriālu vai implantātu lietošanas cilvēka organismā. Atkarībā no biomateriāla novietojuma un atrašanās ilguma organismā tie var kļūt par dažādu infekciju perēkli (Darouiche, 2001). BAI bieži vien ir grūti ārstējamas, jo baktērijas, kas piesaistās un kolonizē biomateriālus, ir spējīgas producēt biofilmas. Ārstēšanu apgrūtina arī baktēriju rezistence pret antibiotiskajām vielām, kuras tiek izmantotas ārstēšanas procesā (Stewart et al., 2001). Tāpēc, lai izvairītos no pacienta dzīvības apdraudējuma un lielākas komplikāciju attīstības, implantāti tiek izņemti un aizvietoti ar jauniem, līdz ar to radot papildu dzīvības apdraudējumu un diskomfortu pacientiem, kā arī palielina kopējās ārstēšanas izmaksas, lai sekmīgi izārstētu BAI (Pittet et al., 1994).

Ir vairāki veidi, kā baktērijas var nokļūt uz biomateriāla. Visbiežāk BAI attīstās pēc biomateriāla implantācijas operācijas, kad biomateriāls tiek kontaminēts ar ādas un gļotādas normālās mikrofloras baktērijām. Bieži implantātu operācijas tiek veiktas cilvēka organismā nesterilā vidē, piemēram, implantējot zobus mutes dobumā, kur mutes normālā mikroflora var kļūt par BAI iemeslu. Operāciju zālē ir atrodami 20–60 KVV/m³ baktēriju, kas var būt BAI attīstības iemesls (Desai et al., 2012). Otrs galvenais BAI attīstības iemesls ir baktēriju

hematogēna diseminācija no kāda cita infekcijas avota cilvēka ķermenī (*Trampuz et al.*, 2005).

Lai biomateriāli būtu droši un pildītu tiem paredzēto funkciju, tie jāpasargā no iespējamās kontaminācijas ar baktērijām, kuras būtu spējīgas piesaistīties pie biomateriāla un attīstīt infekciju. Ir vairāki veidi, kā biomateriālus iespējams pasargāt no baktēriju piesaistes pie tiem. Var modificēt vai izveidot biomateriāla virsmu tā, lai baktērijām nebūtu iespējams piesaistīties, vai arī samazināt baktēriju daudzumu, kuras būtu spējīgas piesaistīties biomateriālam (*Banerjee et al.*, 2011). Biomateriālu virsmas var pārklāt ar elementiem, piemēram, sudrabu, kam piemīt spēja inaktivēt baktērijas pirms piesaistīšanās pie biomateriāla. Šādus biomateriālus ar sudraba daļiņu pārklājumu izmanto urīnkatetros, lai samazinātu urīnceļu infekciju rašanos pacientiem pēc urīnpūšļa katetrizācijas (*Johnson et al.*, 2012).

Lai panāktu biomateriāliem vislabāko antibakteriālo efektu, tiem pievieno antibiotiskās vielas, kuras izdalās no biomateriāla pēc tā implantācijas operācijas. Šāda veida biomateriālus izmanto stentos, visdažādākajos katetros, ķirurģiskajos diegos un kaulu aizvietojošos implantos (*Wu et al.*, 2006). Taču nepietiek tikai ar antibakteriālajām īpašībām – biomateriālam pēc implantācijas ir jāpiemīt arī biosaderībai ar apkārtējiem audiem (*Morais et al.*, 2010). Apvienojot biomateriāla virsmas, antibakteriālās, biosaderības un citas īpašības, varētu iegūt ideālo biomateriālu (1.4. attēls) (*Busscher et al.*, 2012).



1.4. attēls. **Biomateriāla īpašību daudzveidība**
(pēc Busscher *et al.*, 2012)

1.4.2. Biomateriālu saistīto infekciju ierosinātāji un biežums

BAI ierosinātāju dažādība ir plaša no normālās cilvēka mikrofloras pārstāvjiem līdz pret antibiotiskajām vielām rezistentām baktērijām. Bieži vien BAI ierosinātāji ir saistīti ar biomateriāla operācijas vietu cilvēka ķermenī vai implantāta pielietojumu. Piemēram, urīnceļu infekcijas pēc urīnpūšļa katetrizācijas biežāk ierosina gramnegatīvas baktērijas, savukārt ortopēdiskās implantātu infekcijas biežāk ierosina grampozitīvas baktērijas. Visbiežākais urīnceļu infekciju ierosinātājs pēc urīnpūšļa katetrizācijas ir *E. coli* (Hooton *et al.*, 2010), kā arī *P. mirabilis* (Jacobsen *et al.*, 2008), *P. aeruginosa* un koagulāzes negatīvie *Staphylococcus* (*S. epidermidis*, *S. saprophyticus*) (Nicolle, 2014). Koagulāzes negatīvie stafilokoki, visbiežāk *S. epidermidis*, ir biežākais ortopēdisko protēžu infekciju ierosinātājs. Gandrīz 60% no visiem ortopēdisko protēžu infekciju gadījumiem ierosina *S. epidermidis*. No koagulāzes pozitīvajiem stafilokokiem, kuri ierosina ortopēdisko protēžu infekcijas, ir *S. aureus* un MRSA, un to biežums ir līdz 20% (Ribeiro *et al.*, 2012). Vēl citas grampozitīvās baktērijas,

kuras ierosina ortopēdisko protēžu infekcijas, līdz 10% gadījumu ir *Streptococcus spp.* Gramnegatīvās baktērijas (*Enterobacteriaceae spp.*, *P. aeruginosa* u. c.) ierosina nelielu daļu (3–6%) no ortopēdisko protēžu infekciju gadījumiem (Trampuz et al., 2005). Keratītu pēc kontaktlēcu lietošanas var ierosināt *P. aeruginosa* (Choy et al., 2008). *Staphylococcus spp.*, *Klebsiella spp.*, *Propionibacteria spp.* un citas baktērijas ir vieni no biežākajiem sirds stimulatoru infekciju ierosinātājiem (Tischer et al., 2014). Bioprotēžu vārstuļu endokardīta ierosinātāju diapazons variē, bet 23% gadījumu ierosinātājs ir *S. aureus*. No šiem gadījumiem biežākais ierosinātājs ir MSSA, nevis MRSA, savukārt 16,9% gadījumu ierosinātājs ir koagulāzes negatīvie *Staphylococcus*, kuriem seko *viridans* grupas *Streptococcus* (12,1%), bet gramnegatīvās baktērijas (*E. coli*, *P. aeruginosa*) ir ierosinātājs mazāk par 1% gadījumu (Wang et al., 2007). BAI biežums un implanta lokalizācija apkopota 1.2. tabulā.

1.2. tabula

BAI biežums atkarībā no lokalizācijas

Lokalizācija	Implants	Incidence, %	Autors
Zemāda	Sirds stimulators	3–7	Tischer et al., 2014. Darouiche et al., 2001
Mīkstie audi	Krūšu implantanti	< 7	Seng et al., 2015. Dankert et al., 1986
Asinsrites sistēma	Vārstuļa bioprotēzes	1,0–3,0	Misawa et al., 2015. Wu et al., 2006
Kauli, saites	Ceļa locītava	1,1–4,0	Pulido et al., 2008. Darouiche et al., 2001
Kauli, saites	Gūžas locītava	0,7–4,0	Pulido et al., 2008. Darouiche et al., 2001
Urīnceļi	Urīnpūšļa katetrs	14,4–33,0	Darouiche et al., 2001. Vanhems et al., 2008

Biomateriālu lielā daudzveidība un plašā pielietošana, lai saglabātu pacientam dzīvību, atjaunotu organisma funkcionālo stāvokli un nodrošinātu labāku dzīves kvalitāti, ir risks infekciju attīstībai. Šo risku nosaka gan pacienta veselības stāvoklis un vecums, gan biomateriāla īpatnības, gan implantācijas operācijas plašums un anatomiskā vieta. BAI biežums ir atkarīgs no riska faktoru kopējā daudzuma (Busscher et al., 2012).

1.5. Iekaisums un iekaisuma marķieri. Antibakteriālie peptīdi

Iekaisums ir organisma atbildes reakcija uz cilvēkam svešu materiālu, piemēram, biomateriālu, implantēšanu, bet biežāk – pret slimību ierosinošu kairinātāju, piemēram, baktēriju, vīrusu, sēni vai parazītu. Pret šo svešo kairinātāju, lai to iznīcinātu un neitralizētu, cilvēka imūnās sistēmas šūnas izdala citokīnus. Izdalītie citokīni ir signāli imūnās atbildes mehānismā, kurā attiecīgā signāla saņemšana vai nodošana stimulē vai neitralizē imūnkompetento šūnu atbildi uz kairinātāju. Ņemot vērā, ka katrs citokīns ir iesaistīts konkrētā imūnās atbildes procesā, tad tas, atrasts pacienta materiālā, var tikt izmantots iekaisuma diagnostikā kā iekaisuma marķieris (Libby, 2007).

1.5.1. IL-10

IL-10 ir pretiekaisuma citokīns. Tā galvenā funkcija ir samazināt citu citokīnu (TNF- α , IL-6 un IL-1) darbības izpausmi. Tas veicina citu pretiekaisuma citokīnu izdalīšanos, kā arī samazina iekaisuma citokīnu receptoru daudzumu (Zhang *et al.*, 2007). IL-10 inhibē T šūnu, monocītu, dendrītisko šūnu un makrofāgu aktivāciju, tādējādi samazinot un izbeidzot iekaisuma procesu (Moore *et al.*, 2001). IL-10 izdala Th₂ šūnas, T regulētājšūnas un makrofāgi, kā arī citas šūnas. IL-10 galvenokārt iedarbojas uz B šūnām un Th₁ šūnām, attiecīgi aktivējot B līnijas augšanu un inhibējot Th₁ atbildi. T regulētājšūnas, izdalot IL-10, novērš autoimūnus procesus (Charo *et al.*, 2006). Nomācot Th₁ veidošanos, tiek nomākta IFN- γ produkcija no Th₁ šūnām, un tas izraisa celulārās imūnās atbildes inhibīciju. IL-10 iedarbojas uz aktivētajiem makrofāgiem, izbeidzot to atbildes reakciju un apstādinot imūno atbildi pret ierosinātāju. IL-10 inhibē IL-12 ražošanu aktivētos makrofāgos un dendrītiskajās šūnās, kā arī inhibē kostimulatoru un MHC II ekspresiju uz šīm šūnām (Alexander *et al.*, 2004). Kopumā IL-10 darbība ir saistīta ar nomācošu efektu uz celulāro imūno atbildi, bet veicinošu – uz humorālo imūno atbildi. IL-10 nomāc autoimūnos procesus un pārtrauc imūno atbildi pēc visu ierosinātāju neitralizēšanas (Rousset *et al.*, 1992).

Lai noteiktu iekaisuma intensitāti, apkārtējos audos ap biomateriāla implantācijas vietu IL-10 nosaka *in vivo* pētījumos. Infekcijas procesa laikā audos ap biomateriālu novēro augstāku IL-10 intensitāti (Duarte *et al.*, 2009). IL-10 audos ap biomateriālu var saglabāties augstā līmenī vairākas nedēļas (Schutte *et al.*, 2009).

1.5.2. TNF- α

Galvenais TNF- α avots ir makrofāgi. Šī iekaisuma mediatora darbības efekti ir ļoti plaši, dažādi un atkarīgi no TNF- α līmeņa. Endotēlija šūnas TNF- α ietekmē var palielināt adhēzijas molekulu sintēzi un sintezēt hemokīnus, tādējādi norādot leukocītiem uz iekaisuma vietu. Ir atklāta TNF- α ietekme uz neitrofilajām šūnām, aktivējot pašas šūnas un aktivizējot fagocitozes procesos tajos (Murray *et al.*, 1997). TNF- α ietekmē palielinās T šūnu sintezēto citokīnu daudzums un notiek B šūnu augšanas stimulācija. TNF- α tiek dēvēts arī par kaheksīnu, jo tas iedarbojas uz taukšūnām, samazinot taukskābju izmantošanu, kas gala rezultātā noved pie kaheksijas (Espat *et al.*, 1994). TNF- α , aktivizējot trombocītus un izraisot intravaskulāro koagulāciju audzējā, var izraisīt audzēja nekrozi. TNF- α kā endogēnais pirogēns iedarbojas uz hipotalāmu un līdz ar to stimulē ķermeņa temperatūras celšanos un drudža attīstību. TNF- α var arī izraisīt sistēmiskas izmaiņas organismā – metabolisma izmaiņais, svara zudumu, apetītes zudumu. TNF- α piedalās imunoloģiskajos procesos pret mikroorganismiem un specifisku audzēju nekrozē (Tracey *et al.*, 1994).

Kā akūtās fāzes citokīnu produkcijas stimulators TNF- α veicina IL-1 un IL-6 produkciju, kuri kā akūtās fāzes citokīni iedarbojas uz aknu šūnām. Turpinot šo kaskādi, aknu šūnas producē akūtās fāzes proteīnus, piemēram, C reaktīvo proteīnu. Bojātie audi tiek atjaunoti, augot fibroblastiem, un to stimulē TNF- α (Wajant *et al.*, 2003).

Tā kā TNF- α ir viens no būtiskākajiem lokālā iekaisuma citokīniem, tā noteikšana kalpo par kritēriju, lai spriestu par iekaisumu pēc biomateriāla implantācijas. Paaugstināta TNF- α atrade vairākas dienas pēc implanta operācijas var liecināt par infekcijas procesu implantāta vietā, sevišķi, ja TNF- α dinamika nemainās. Tieši ar TNF- α atradi precīzāk var spriest par iekaisuma procesu implantācijas vietā nekā ar citu citokīnu atradi (Gul *et al.*, 2010).

1.5.3. β -defensīns-2

Defensīni ir peptīdi, kuriem piemīt antibakteriāla darbība, veidojot jonu kanālus baktēriju membrānās, kas izraisa baktēriju nāvi. Defensīnus producē ādas un gļotādu epitēlijšūnas, neitrofilās šūnas, NK šūnas, T citotoksiskās šūnas. Defensīni tiek producēti nepārtraukti, bet to sekrēcija citokīnu ietekmē tiek pastiprināta. Atsevišķas šūnas producē defensīnus kā atbildi uz IL-1 un TNF- α stimulāciju iekaisuma procesā. Baktērijas, baktēriju komponenti vai veidotie produkti ir stimulē šūnām producēt defensīnus. Defensīni ir mazi (līdz 30 aminoskābēm) peptīdi, kuri darbojas pret baktērijām, sēnīšu infekcijām un neitralizē

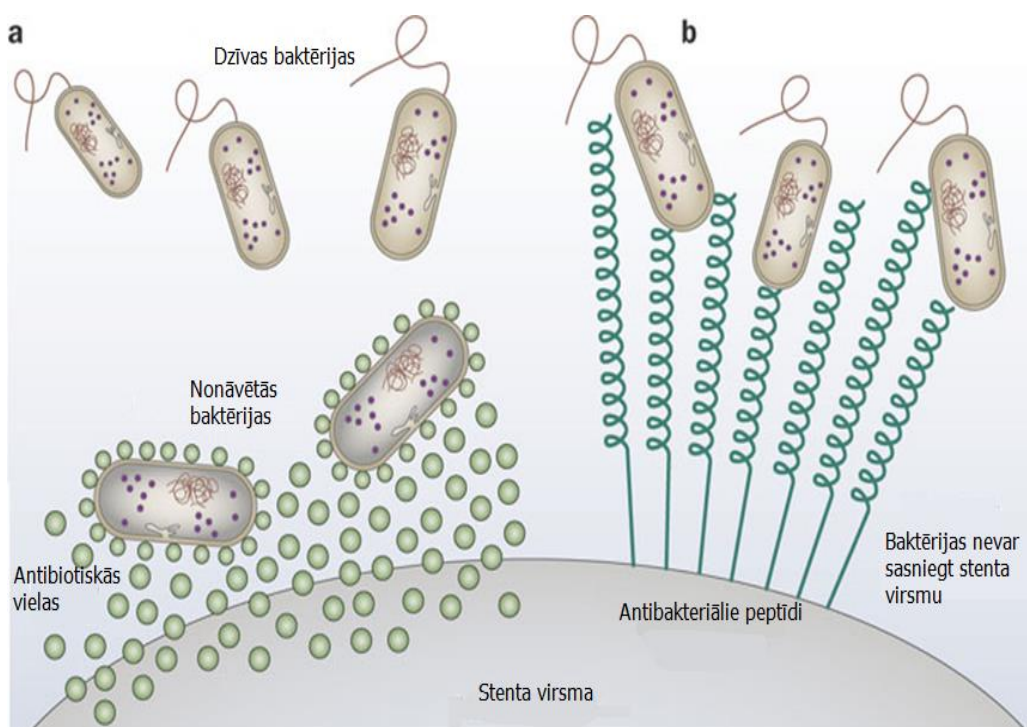
vīrusus. Izšķir α un β defensīnu grupas, savukārt β defensīniem izšķir četras apakšgrupas (Schröder *et al.*, 2006).

β -defensīns-2 ir katjonu peptīdu defensīns, viens no defensīnu grupas antibakteriālajiem peptīdiem, kas piedalās nespecifiskās imunitātes procesos (Radek *et al.*, 2007).

Ģļotādas epitēlijšūnu izdalītajam β -defensīnam-2 ir antibakteriāla iedarbība tieši pret gramnegatīvām baktērijām un *Candida spp.* β -defensīns-2 piedalās ādas un elpceļu sistēmas aizsargāšanā no iespējamajām bakteriālajām infekcijām un tiek izdalīts pēc kontakta ar baktērijām, visbiežāk ar *P. aeruginosa*, vai arī pēc citokīnu TNF- α un IL-1 stimulācijas (Schröder *et al.*, 1999).

Ortopēdisko implantu infekcijas gadījumā tiek novērots paaugstināts β -defensīna-2 līmenis, tātad β -defensīna-2 intensitātes paaugstināšanās var kalpot kā diagnostiskais kritērijs infekcijas noteikšanai (Gollwitzer *et al.*, 2013).

Pateicoties savām antibakteriālajām īpašībām pret grampozitīvām un gramnegatīvām baktērijām, antibakteriālie peptīdi tiek izmantoti biomateriālu virsmas modificēšanai un biomateriālu pasargāšanai no baktēriju adhēzijas uz tiem un biofilmas veidošanās (Costa *et al.*, 2011). Piemēram, uretrāls stents ar antibakteriāliem peptīdiem neļauj baktērijām piesaistīties pie virsmas. Līdzīgs mehānisms ir uretrāliem stentiem ar antibiotiskajām vielām (1.5. attēls).



1.5. attēls. Uretrāls stents: a – ar antibiotiskām vielām, b – ar antibakteriāliem peptīdiem (pēc Chew *et al.*, 2009)

1.6. *S. epidermidis* un *P. aeruginosa* raksturojums, patogēnitātes faktori un ierosinātās saslimšanas

1.6.1. *S. epidermidis* raksturojums

Pēc šūnas sienas uzbūves *S. epidermidis* ir grampozitīva nekustīga lodveida baktērija, apmēram 1 µm diametrā. Baktērijas grupas novietojas vienkārtainā slānī, kas līdzīgs vīnogu ķekara formai. Baktērijām piemīt fakultatīvi anaerobais respiratorais tips. Bioķīmiski baktērijas ir ļoti aktīvas un fermentē glikozi, mannītu. Salīdzinot ar *Streptococcus*, *S. epidermidis*, kā visi stafilokoki, ir katalāzes pozitīvas baktērijas (Kloos *et al.*, 1986).

S. epidermidis ir cilvēka ādas un gļotādas normālās mikrofloras pārstāvis, vairāk nekā 90% no visas mikrofloras kopējā baktēriju daudzuma ir tieši *S. epidermidis* (Cogen *et al.*, 2008). Kā normālās mikrofloras pārstāvis *S. epidermidis* producē antibakteriālos peptīdus pret iespējamajiem infekciju ierosinātājiem un stimulē ādas un gļotādas šūnas vēl vairāk producēt šos peptīdus, tādējādi *S. epidermidis* piedalās organisma nespecifiskās rezistences imūnajos procesos (Gallo *et al.*, 2011).

Kaut arī *S. epidermidis* pieder pie normālās mikrofloras, ir sastopami pret antibiotiskajām vielām rezistenti celmi. MRSE rezistences mehānisms ir balstīts uz izmainītu PBP baktērijas šūnas sienā. PBP ir metecilīna un penicilīnu grupas antibiotisko vielu darbības mērķis, kuru izmaina, baktērijām iegūstot *mecA* gēnu. No klīniskā materiāla izolēta MRSE biežums var sasniegt pat 90%, kas ir biežāks nekā MRSA biežums.

S. epidermidis spēj attīstīt rezistenci arī pret citām antibiotiskajām vielām, piemēram, pret makrolīdu grupas, aminoglikozīdu, fluorhinolonu un tetraciklīnu grupas antibiotiskajām vielām. Šī rezistence tiek nodota un kodēta ar plazmīdu palīdzību (Diekema *et al.*, 2001).

1.6.2. *S. epidermidis* patogēnitātes faktori un ierosinātās infekcijas

S. epidermidis ir oportūnistisko infekciju ierosinātājs un viens no biežākajiem hospitālo infekciju ierosinātājiem. Tam nepiemīt agresīvi patogēnitātes faktori, kas veiktu patogēno funkciju, bet tas infekcijas ierosina, pateicoties baktērijas virsmas faktoriem un polisaharīdu produkcijai.

S. epidermidis ir raksturīga adhēzija pie mākslīgajām virsmām vai saimniekorganisma šūnu proteīniem. Adhēziju pie implantiem un biofilmas veidošanos nodrošina tādi patogēnitātes faktori kā *Aae*, *AtIE* un teihonskābes. *Aae* un *AtIE* papildus piedalās piesaistē pie saimniekorganisma šūnu proteīniem. Bez šiem patogēnitātes faktoriem pie saimniekorganisma šūnu proteīniem biofilmas veidošanās procesā piedalās arī *SdrF*, *SdrH* un

SdrG patogenitātes faktori, kuri piesaistās pie kolagēna un fibrinogēna. *Ebp* faktors biofilmas veidošanās procesā piesaistās pie elastīna. Galvenie patogenitātes faktori, kuri nodrošina starpšūnu agregāciju un sasaisti, ir *PIA*, *Aap* un biofilmu asociētais proteīns *Bap*. *S. epidermidis* piemīt rezistence pret antibakteriālajiem peptīdiem. Rezistence tiek nodrošināta ar *SepA* proteāzi, kas degradē antibakteriālos peptīdus. Visi rezistences mehānismi pret antibakteriālajiem peptīdiem tiek regulēti ar *Aps* sistēmas palīdzību. Savukārt tādi patogenitātes faktori kā *PNAG* un *PGA* nodrošina ne tikai *S. epidermidis* rezistenci pret antibakteriālajiem peptīdiem, bet arī pret IgG, fagocitozi un komplementa sistēmu (Otto, 2009).

No visiem koagulāzes negatīvajiem stafilokokiem *S. epidermidis* ir biežākais dažādu infekcijas slimību ierosinātājs (Rogers *et al.*, 2009). Lielāks *S. epidermidis* ierosināto infekciju attīstības risks ir imūnsupresētiem, AIDS un vēža slimniekiem, kā arī cilvēkiem, kuri lieto implantētus biomateriālus.

Intravenozo katetru infekciju, ortopēdisko implantātu infekciju, mākslīgo sirds vārstuļu infekciju, sirds elektrostimulatoru infekciju un citu ar implantātiem saistītu infekciju biežākais ierosinātājs ir *S. epidermidis*, jo šī baktērija ir ādas mikrofloras sastāvā, savukārt šo ierīču lietošana ir saistīta ar neizbēgamu ādas kontaktu, bet implantācijas operācijas ķirurģiskā brūce kalpo kā ieejas vārti baktērijai (Rogers *et al.*, 2009).

Jaundzimušo asinsrites infekcijas attīstās pēc intravenozo vai peritoneālo katetru lietošanas. Citi riska faktori ir arī zems jaundzimušā svars un imūnsupresijas stāvoklis, bet neatkarīgi no riska faktora biežākie asinsrites infekciju ierosinātāji ir koagulāzes negatīvais stafilokoks (Venkatesh *et al.*, 2006).

1.6.3. *S. epidermidis* biofilmas veidošanās process

S. epidermidis biofilmas veidošanās process ir daudzfunkcionālu etapu komplekss, kas gala rezultātā pasargā baktēriju no antibiotisko vielu iedarbības un imūnās sistēmas. Labvēlīgie apstākļi ļauj baktērijai ierosināt grūti ārstējamas infekcijas. Biofilmas veidošanās process ir atkarīgs no vairākiem faktoriem. Galvenais faktors ir virsma, uz kuras baktērija piesaistīsies un veidos biofilmu, virsmas īpatnības un raksturojums. Medicīnā tie ir biomedicīniskie implantāti, pie kuriem *S. epidermidis* spēj piesaistīties un veidot biofilmas, bet biofilmas var tikt veidotas arī ārējās vides apstākļos (upēs uz akmeņiem, dušās, caurulēs). Biofilmas var tikt veidotas gan uz dzīvām, gan mākslīgām virsmām (Agarwal *et al.*, 2010).

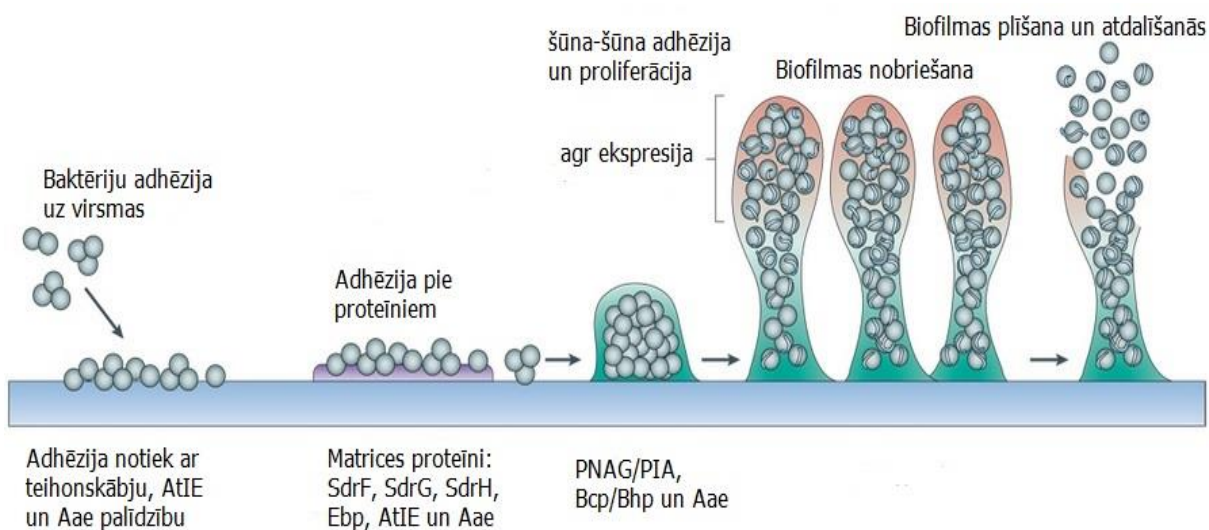
Biofilmas veidošanās process ir atkarīgs no pašas baktērijas, jo šī spēja nepiemīt visām zināmajām baktērijām. Ir arī atsevišķas sēnes, kuras veido biofilmas. Atšķirības biofilmu

veidošanā novēro pat vienas sugas baktēriju ietvaros. Ne visas *S. epidermidis* baktērijas ir spējīgas producēt *PIA*, bet tikai tās, kuras kodē *icaADBC* operonu. *PIA* ir nepieciešams biofilmas veidošanas procesā pēc baktēriju piesaistes (Mack *et al.*, 2004).

Ar baktēriju adhēziju pie biomateriāla virsmas sākas biofilmas veidošanās pirmais posms. Adhēzijas etaps sastāv no diviem apakšetapiem, jo sākotnēji baktērijas veic adhēziju pie paša biomateriāla virsmas un noslēdz ar adhēziju uz biomateriāla esošajiem saimniekorganisma šūnu proteīniem. Uzreiz pēc implantācijas uz biomateriāla piesaistās saimniekorganisma proteīni, piemēram, fibrinogēns un fibrinonektīns, pie kuriem *S. epidermidis* piesaistās ar saviem patogenitātes faktoriem. Adhēziju uz biomateriāla virsmas nodrošina baktērijas teihonskābju gali un adhezīni – *AtlE* un *Aae*. Adhēzija pie saimniekorganisma šūnu proteīniem uz biomateriāla virsmas sākas ar *SdrF* patogenitātes faktora piesaisti pie kolagēna un turpinās ar *SdrG* patogenitātes faktora piesaisti pie fibrinogēna un *Ebp* patogenitātes faktora piesaisti pie elastīna. Lai gan *AtlE* un *Aae* spēj saistīties ar paša biomateriāla virsmu, tie spēj piesaistīties arī pie daudziem proteīniem (Fey *et al.*, 2010).

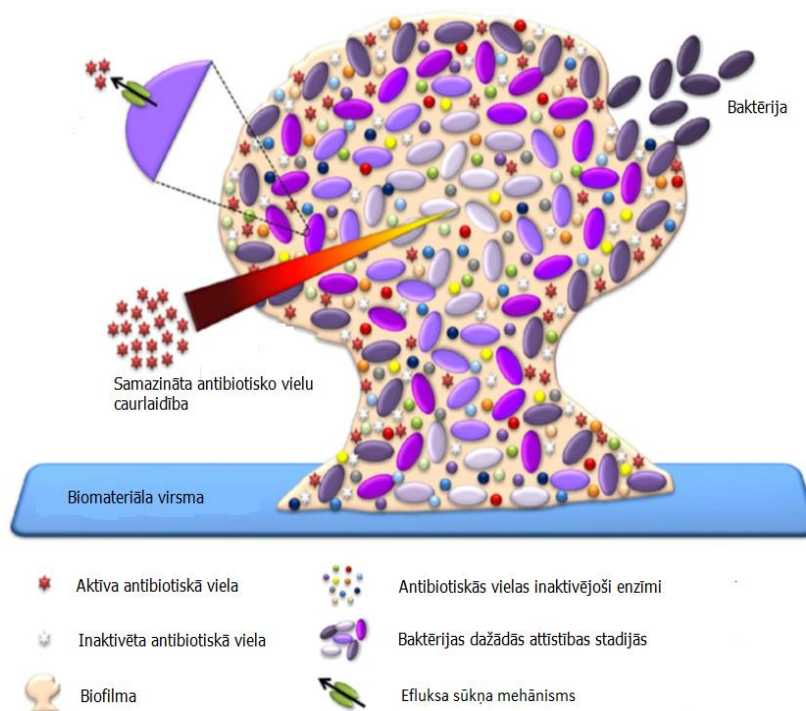
Otrais *S. epidermidis* biofilmu veidošanās etaps ir baktēriju šūnu akumulācijas etaps. Šajā etapā notiek baktēriju savstarpējā adhēzija ar *PIA*, *Bap* un *Aap* patogenitātes faktoru līdzdalību. Grampozitīvajā šūnas sienā atrodamās teihonskābes piedalās baktēriju savstarpējās akumulācijas veidošanā (Büttner *et al.*, 2015).

Pēc savstarpējās *S. epidermidis* adhēzijas notiek trešais biofilmas veidošanās etaps, kad notiek baktēriju šūnu proliferācija un nobriešana līdz biofilmas plīšanai un atdalīšanai no virsmas (1.6. attēls) (Stanley *et al.*, 2004).



1.6. attēls. *S. epidermidis* biofilmas veidošanās process
(pēc Otto, 2009)

Biofilmu rezistenci pret antibiotiskajām vielām nodrošina mehānismi ārpus biofilmas un mehānismi biofilmas iekšienē. Antibiotiskās vielas no ārpuses nevar tikt cauri glikokaliksa slānim, bet uz antibiotiskajām vielām, kas nokļuvušas biofilmas vidē, iedarbojas mehānismi to inaktivācijai vai izdarei no baktērijas šūnas. Biofilmā esošās baktērijas producē enzīmus (β -laktamāzes) antibiotisko vielu inaktivācijai un ar efluksa sūkņa mehānismu izdala antibiotiskās vielas no šūnas (1.7. attēls) (Xiong et al., 2014).



1.7. attēls. **Biofilmu rezistences mehānismi pret antibiotiskajām vielām**
(pēc Xiong et al., 2014)

1.6.4. *P. aeruginosa* raksturojums

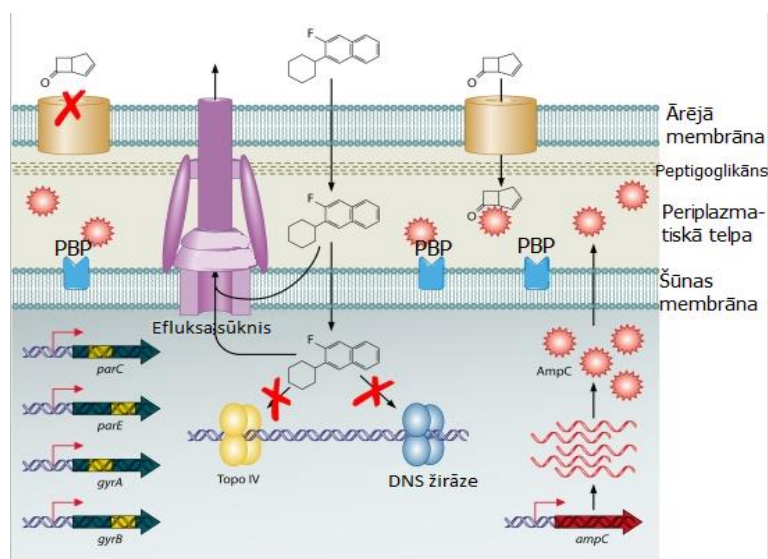
P. aeruginosa ir gramnegatīva nūjiņveida baktērija ar unipolāru viciņu. Pateicoties aerobajam respirācijas veidam, baktēriju plaši var atrast apkārtējā vidē, piemēram, augsnē, ūdenī, dzīvnieku mikroflorā un uz augiem, bet atsevišķai populācijas daļai ir atrodamas ādas, elpceļu un zarnu normālajā mikroflorā. *P. aeruginosa* ir viens no biežākajiem hospitāli ierosināto infekciju ierosinātājiem. Slimnīcas vidē baktēriju atrod sanitārajos mezglos (izlietnēs, tualetēs, dušās). Baktērija ir spējīga kontaminēt slimnīcā izmantotās ierīces un medicīniskos priekšmetus (mākslīgās elpināšanas aparāturu, dialīzes aparāturu). Atsevišķas baktērijas ir rezistentas pret dezinfekcijas šķīdumiem (Pollack, 1995).

P. aeruginosa ierosinātajām infekcijām ir apgrūtināta antibakteriālā terapija, jo baktērijai ir augsta rezistence pret antibiotiskajām vielām. Rezistence veidojas pret vairākām

antibiotisko vielu grupām. Līdz 35% *P. aeruginosa* ir rezistenta pret ciprofloksacīnu, bet līdz 22% rezistentas pret gentamicīnu. Rezistence pret β -laktāmiem sasniedz 20%.

Baktērijas rezistence pret ciprofloksacīnu un fluorhinoloniem attīstās divējādi: ar efluksa sūkņa mehānismu, vai arī baktērija izmaina ciprofloksacīna darbības mērķi (topoizomerāze IV un DNS žirāze).

Plašā baktērijas rezistence pret β -laktāmiem ir saistāma ar *P. aeruginosa* spēju producēt enzīmus, piemēram, penicilināzi, kas šķel penicilīnā esošo β -laktāma gredzenu. Savukārt rezistence pret aminoglikozīdiem tiek panākta, izdalot enzīmus, kas ķīmiski modificē antibiotiskās vielas uzbūvi (1.8. attēls) (Lister et al., 2009).



1.8. attēls. *P. aeruginosa* antibakteriālās rezistences mehānismi (pēc Lister et al., 2009)

1.6.5. *P. aeruginosa* patogenitātes faktori un ierosinātās infekcijas

P. aeruginosa patogenitātes faktorus iedala divās grupās. Pirmās grupas patogenitātes faktori ir saistīti ar pašas baktērijas struktūrām, piemēram, LPS, kas stimulē citokīnu produkciju, un pacientam izpaužas kā šoks. Pie šīs grupas patogenitātes faktoriem pieder viciņa, pili, algināts un citi baktērijas adhezīni. Unipolāra viciņa ir baktērijas kustību aparāts, bet ar pili palīdzību baktērija nodrošina adhēzijas funkciju un pret antibiotiskajām vielām rezistentu plazmīdu nodošanu citām baktērijām. Algināts nodrošina baktērijas piesaisti pie trahejas epitēlija šūnām un rezistenci pret antibiotiskajām vielām, kā arī inhibē fagocitozi.

Otrā patogenitātes faktoru grupa ir ekstracelulāri producētie baktērijas patogenitātes faktori. Šajā grupā ietilpst eksotoksīns A, elastāzes, eksoenzīms S, eksoenzīms U un

fosfolipāze C. Eksotoksīns A iedarbojas uz šūnām, inhibējot tajos proteīnu sintēzi un izraisot šo šūnu nekrozi. Šūnu nekrozi pastiprina eksoenzīms S ar savu citotoksisko iedarbību, bet eksoenzīmam U ir antifagocitāra iedarbība pret imūnās sistēmas šūnām.

Elastāzes iedalās divos apakštipos, *LasB* un *LasA* elastāzēs, tās nodrošina baktērijas invāziju audos. Kolagēns, elastīns un fibrīns šo elastāžu ietekmē tiek dedradēti. Turklāt elastāzes nodrošina baktērijas evāziju no IgG, IgA un komplementa sistēmas. Fosfolipāzei C ir lokāls citolītisks efekts uz mērķa šūnām, veidojot plaušu atelektāzes *P. aeruginosa* izraisītu akūtu un hronisku infekciju gadījumā. Pie *P. aeruginosa* papildu patogenitātes faktoriem pieder piocianīns un pioverdīns, kuriem piemīt baktericīda iedarbība uz citām baktērijām un epitēlija skropstiņu imobilizācijas funkcija (Van Delden et al., 1998).

P. aeruginosa ierosina hospitāli iegūtas infekcijas pacientiem ar novājinātu imūno sistēmu vai pacientiem ar traumatizētu un bojātu epiteliāro barjeru.

Asinsrites infekcijas, ko ierosina *P. aeruginosa*, 21% pacientu ir letālas. Mirstība no asinsrites infekcijas biežāka ir tiem pacientiem, kuri sākotnēji nesaņem atbilstošu antibakteriālo terapiju (Micek et al., 2005).

Intensīvās terapijas nodaļās, lai uzturētu pacientiem normālu elpošanas funkciju, tiek veikta intubācija. Intubācijas caurule ir biomateriāls, kas bieži tiek kontaminēts ar *P. aeruginosa* uzreiz vai pāris dienas pēc intubācijas. Ventilatorasociētās pneimonijas biežākais ierosinātājs ir *P. aeruginosa*, kas saistīts ar pacienta intubāciju. Pacientu mirstība no ventilatorasociētās pneimonijas biežāka ir gadījumos, ja ierosinātājs ir *P. aeruginosa* (American Thoracic Society; Infectious Diseases Society of America, 2005).

Pacientiem ar ādas apdegumiem ir traucētas ādas funkcijas, un apdegumi kalpo kā ieejas vārti bakteriālajām infekcijām. No visām ādas infekcijām pēc apdegumiem 57% gadījumu ierosinātājs ir *P. aeruginosa* (Estahbanati et al., 2002). Pēc ķirurģiskas operācijas par baktēriju infekcijas ieejas vārtiem kļūst ķirurģiskā brūce. Šādas brūces parasti inficē gramnegatīvas baktērijas – *E. coli* (20,3%), *Klebsiella spp.* (16,6%), *Proteus spp.* (6,3%), bet visbiežāk (29,6%) – *P. aeruginosa* (Ranjan et al., 2010).

Cistiskās fibrozes slimniekiem *P. aeruginosa* infekcijas ir ar augstu letalitāti, jo baktērija ir spējīga kolonizēt elpceļu un plaušu šūnas, veidojot atelektāzes (Davies et al., 2002).

1.6.6. *P. aeruginosa* biofilmas veidošanās mehānisms

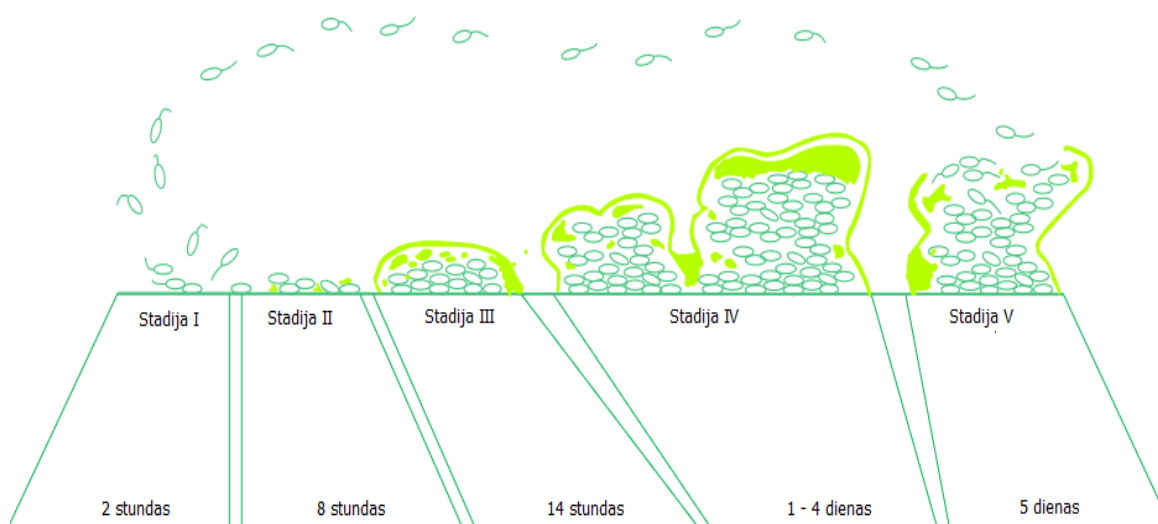
P. aeruginosa biofilmu veidošanās procesā izšķir piecas stadijas. Biofilmas pirmā stadija ir adhēzija pie biomateriāla, un sākotnēji tā ir atgriezeniska. Šīs stadijas ilgums ir

apmēram divas stundas. Pēc divām stundām sākas otrā biofilmas attīstības stadija (neatgriezeniskā adhēzija), kad baktēriju šūnas vairs neatdalās no biomateriāla virsmas. Neatgriezeniskās adhēzijas stadija ilgst 8 h no biofilmas veidošanās procesa sākuma. Adhēzija pie biomateriāla virsmas sākotnēji notiek ar baktēriju viciņu un IV tipa pili palīdzību, bet turpinājumā adhēzija tiek panākta ar *Psl* eksopolisaharīdu (Harmsen et al., 2010). *P. aeruginosa* baktērijām ar *flgK* gēna mutāciju nav viciņas. Šādām baktērijām, salīdzinot ar viciņotām baktērijām, novēro samazinātu adhēzijas intensitāti uz biomateriāliem un arī biofilmas veidošanos. Līdzīga aina ir ar baktērijām, kurām ir mutācija *pilA* gēnā, kas nosaka, ka baktērijai nav pili, līdz ar to ir samazinātas adhēzijas spējas (Barken et al., 2006; Sauer et al., 2002).

Psl eksopolisaharīds ne tikai nodrošina baktēriju adhēziju pie biomateriāla virsmas, bet arī uzsāk trešo biofilmas veidošanās stadiju – mikrokoloniju veidošanos. Biofilmas struktūra tiek noturēta ar *Psl* eksopolisaharīda nodrošinātajiem baktēriju savstarpējiem kontaktiem. Agrīna savstarpējā baktēriju mijiedarbība tiek nodrīnāta ar *Pel* polisaharīdu (Wei et al., 2013). Abu šo polisaharīdu īpatnības ļauj tiem piesaistīties un veidot biofilmas uz biomateriāliem un cilvēka šūnām. *Psl* eksopolisaharīds saistās pie respiratorā epitēlija, īpaši cistiskās fibrozes slimniekiem (Ma et al., 2006). Mikrokolonija tiek veidota, līdz tās biezums sasniedz apmēram 10 µm biezumu, un tas notiek apmēram pēc 14 stundām no biofilmas veidošanās procesa sākuma. Ceturtajā – nobriešanas – stadijā biofilma nobriest un palielinās apmēram 10 reizi. Šos izmērus biofilma sasniedz 4.–5. biofilmas veidošanās stadijā. Biofilmas palielināšanos izmēros stabilizē *eDNS* izdalīšanās, kas nostiprina baktēriju savstarpējo adhēziju biofilmā (Rasamiravaka et al., 2015; Sauer et al., 2002).

Biofilmas veidošanās process noslēdzas ar piekto – dispersijas – stadiju. Šīs stadijas laikā biofilma plīst, un baktērijas pārvietojas no biofilmas uz brīvu biomateriāla virsmu, lai veidotu jaunas biofilmas (Sauer et al., 2002). *P. aeruginosa* biofilmas veidošanās process un laiki ir shematiski apkopoti 1.9. attēlā.

P. aeruginosa veidoto biofilmas rezistenci pret antibiotiskajām vielām un saimniekorganisma imūno sistēmu nosaka eksopolisaharīds – algināts, kas biofilmas veidošanās procesā biofilmā notur ūdeni un baktērijām vajadzīgās barības vielas (Ryder et al., 2007).



1.9. attēls. *P. aeruginosa* biofilmas veidošanās process un laiki
(pēc Rasamiravaka et al., 2015)

1.7. Bionoārdāmie polimēri, to raksturojums

Bionoārdāmos polimērus izmanto daudzās medicīnas nozarēs, sadzīvē nepieciešamo lietu (iesaiņojuma maisiņu) izgatavošanā, rūpniecībā, lauksaimniecībā, kā arī sportā un elektronikā. Pēc ieguves veida izdala sintētiskos un dabīgos polimērus. Daudzi dabīgie polisaharīdi un to ķīmiskās modifikācijas tiek izmantotas kā dabīgie polimēri. Lignīns, ciete un celuloze ir tikai neliela daļa no dabīgajiem polimēriem. Lai arī sintētiskie polimēri tiek iegūti ķīmiskās sintēzes procesā, tiem piemīt spēja sadalīties dabīgos vides un fizioloģiskā cilvēka vidē, kas dara iespējamu šo polimēru izmantošanu medicīnā un audu inženierijā (Vroman et al., 2009).

Medicīnā izmantojamajiem bionoārdāmajiem polimēriem ir jāpiemīt vairākām īpašībām, lai tos droši varētu izmantot kā implantētus biomateriālus cilvēka organismā. Šie polimēri un polimēru sadalīšanās produkti nedrīkst būt toksiski apkārtējiem audiem. Atkarībā no izmantošanas mērķa šiem polimēriem jābūt mehāniski izturīgiem, kā arī jābūt iespējai tos sterilizēt. Šādi biomateriāli tiek izmantoti īslaicīgi, noteiktu laika periodu, un tie funkcionē konkrētu laiku, tāpēc, izmantojot bionoārdāmos polimērus, ir jāzina to noārdīšanās laiks un ātrums (Gomes et al., 2004).

Ir iespējami vairāki veidi, kā polimēri tiek noārdīti, bet visos gadījumos kopīgais ir polimēra noārdīšanās līdz monomēriem. Izšķir enzimatisko, hidrolītisko un mikrobioloģiskās degradācijas veidu.

Hidrolītiskās degradācijas laikā polimēra saites tiek šķeltas ar ūdens molekulu palīdzību, veidojot monomērus. Implantējot bionoārdošos polimērus cilvēka organismā, uz

tiem iedarbojas cilvēka enzīmi, nodrošinot polimēra degradāciju līdz oligomēriem, dimēriem un monomēriem. Mazās polimēru molekulas mineralizējas par CO₂ un H₂O. Šī degradācijas kaskāde ir pamats enzimatiskajai degradācijai (Suming et al., 2002).

Mikrobioloģiskās polimēru degradācijas laikā sēnītes (*Penicillium spp.*, *Aspergillus spp.*) un baktērijas spēj izdalīt ekstracelulārus enzīmus, kuri šķel polimēru. Degradācija var notikt gan aerobos, gan anaerobos apstākļos (Tokiwa et al., 2009).

Bionoārdāmie polimēri tiek izmantoti divējādi – vai nu kā atsevišķs biomateriāls vai savienots kopā ar citu biomateriālu, piemēram, hidroksiapatītu. To lielākais pētniecības un izmantošanas virziens ir lokāla, ilglaicīga zāļu izdale (Ulery et al., 2011).

Pacientiem ar koronāro artēriju stenozi tiek izmantoti bionoārdoša polimēra stenti, lai atjaunoto artēriju funkcionālo darbību un izdalītu lokāli zāles (Tamai et al., 2000). Ķirurģijā jau gadu desmitiem ir pazīstami un tiek izmantoti bionoārdoši polimēru diegi. Jaunākie pētījumi liecina, ka bionoārdošo diegu īpašības tiek apvienotas ar antibakteriālajām īpašībām gan pret grampozitīvām, gan pret gramnegatīvām baktērijām, lai samazinātu brūču infekciju attīstību pēc ķirurģiskajām operācijām (Lee et al., 2013).

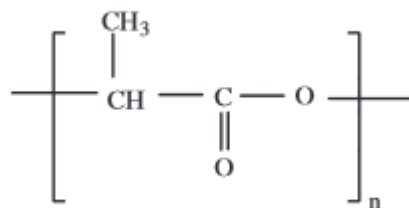
Kaulus fiksējošas ierīces, skrūves, ortopēdiskās plates un citi kaulu aizvietojoši materiāli tiek veidoti no bionoārdošajiem polimēriem, ko izmanto ortopēdiskās operācijās. Metāliskām platēm, kuras tiek izmantotas noteiktu laiku, ir nepieciešama atkārtota operācija, lai tās izņemtu, bet, izmantojot bionoārdošos polimērus, kam piemīt labas mehāniskās īpašības, šāda operācija nav nepieciešama (Navarro et al., 2008).

PGA, PLLA, PLGA, PHB, PCL ir vieni no daudzajiem bionoārdāmajiem polimēriem, kas tiek izmantoti gan medicīnā, gan citās nozarēs (Ulery et al., 2011).

1.7.1. Polipienskābes polimērs

PLLA savu izmantošanas popularitāti ir ieguvis, pateicoties tam, ka to iegūst no atjaunojamiem dabas resursiem, piemēram, cietes. PLLA ir termosplastisks un bionoārdāms polimērs ar kušanas temperatūru 175 °C, tā ķīmiskā formula ir (C₃H₄O₂)_n (1.10. attēls). PLLA biomateriālus plaši izmanto ortopēdijā, jo PLLA piemīt labas mehāniskās īpašības (4,8 GPa) (Ulery et al., 2011). Zobārstniecībā un sejas un žokļu ķirurģijā PLLA biomateriālus (PLLA plāksnītes un skrūves) izmanto, ja ir apgrūtināta kaulu fiksācija un nevar izmantot citas metodes.

Ja ortopēdisko operāciju laikā izmantoti biomateriāli ar PLLA, pēc PLLA bionoārdīšanās šo vietu aizpildīs kaulaudi (Shikinami et al., 2001).

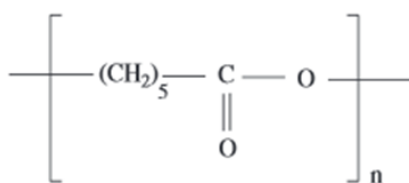


1.10. attēls. **PLLA ķīmiskā struktūra**
(Nair et al., 2007)

Audu inženierijā PLLA izmanto labo biosaderības īpašību dēļ, tā sadalīšanās laikā neveidojas audiem toksiski produkti. Lēnais noārdīšanās ātrums ļauj izmantot šo polimēru lokālai un kontrolētai zāļu, piemēram, antibiotisko vielu, izdarei. PLLA virsmu var pārklāt ar bioloģiski aktīvām vielām, uzlabojot biomateriāla biosaderību ar apkārtējiem audiem. PLLA pārklāšanai izmanto kolagēnu un bāzisko fibroblastu augšanas faktoru, tādējādi paaugstinot hondrocītu metabolisko aktivitāti (Ma et al., 2005).

1.7.2. Polikaprolaktona polimērs

PCL piemīt zemas mehāniskās īpašības (23MP), kas ierobežo tā izmantošanu, piemēram, ortopēdijā, bet kompozītmateriālos ar kalcija fosfātiem to izmanto kaulu aizvietošanā (Mondrinos et al., 2006). PCL izmantošanu ierobežo arī tā zemā kušanas temperatūra – 55 līdz 60 °C. PCL ķīmiskā formula ir $(\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_2)_n$ (1.11. attēls). Tā uzbūvē ir hidrolītiski labilas esteru saites, kas tiek šķeltas hidrolizācijas procesā. Biodegradācijas ātrums ir lēnāks nekā PLLA.



1.11. attēls. **PCL ķīmiskā struktūra**
(Nair et al., 2007)

Teicamo biosaderības īpašību dēļ PCL izmanto audu inženierijā un lokālās un kontrolētās zāļu izdales sistēmās. Lai samazinātu periodontālu infekciju risku, kontrolētai un ilglaicīgai antibiotisko vielu izdarei tiek ieteikts lietot PCL šķiedras ar gentamicīnu, kuras uzrāda teicamas antibakteriālās īpašības pret *S. epidermidis in vitro* (Chang et al., 2008).

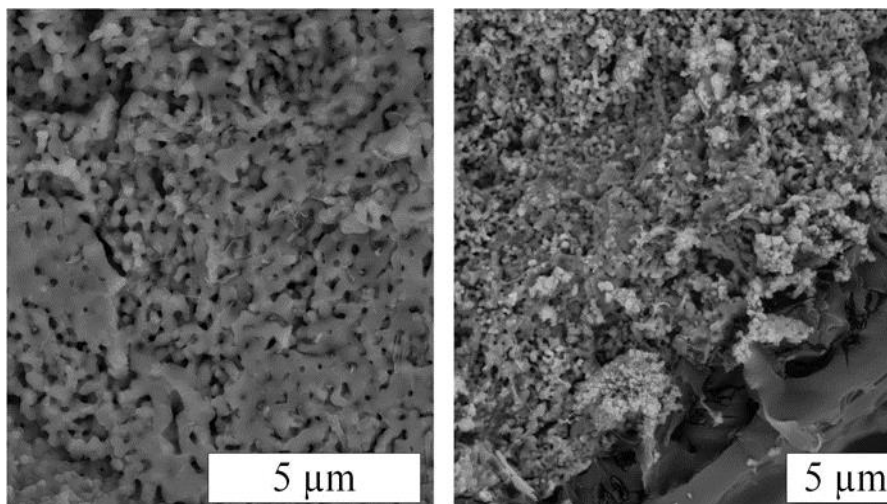
2. MATERIĀLS UN METODES

2.1. Biomateriālu paraugi

2.1.1. 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 sapresēti tabletēs ($d = 10$, $H = 3$ mm). Visi paraugi tika termiski apstrādāti $1100\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūrā 1 stundu ilgi. Pirms HAp paraugu piesūcināšanas 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 sagatavotajiem 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 dihlormetānu (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 šķēsgriezumu, bija redzams, ka HAp/PLLA paraugi, kas pārklāti ar 10 wt% PLLA, ir poraina mikrostruktūra ar poru izmēru diapazonu no 200 līdz 500 nm (2.1. attēls, kreisā puse). Tika iegūti paraugi ar PLLA pārklājumu, kas ir 2–5 μm biezi (2.1. attēls, labā puse). Lai izvērtētu, vai PLLA piemīt antibakteriālas īpašības, tika pagatavoti HAp/PLLA paraugi bez antibiotiskajām vielām.

Pēc šādas pašas metodikas tika pagatavoti ↓HAp/PLLA+cipro, ↓HAp+cipro un ↓HAp/PLLA paraugi (↓ – 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 antibakteriālās darbības laiku. Katrai kompozītmateriālu grupai pret abu baktēriju kultūrām tika izgatavoti 8 paralēlie sērijas paraugi.



2.1. attēls. HAp/PLLA šķērsgriezums (SEM)

2.1.2. CDHAp/PCL+cipro, CDHAp/PCL+genta, CDHAp/PLLA+cipro un CDHAp/PLLA+genta

Kalcija deficīta hidroksiapatīta pulveri ieguva, izmantojot slapjās ķīmiskās nogulsnešanas 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 šķidro/cieto suspensiju tehnoloģiju.

Gentamicīns 40 mg/ml koncentrācijā, bet ciprofloksacīns 100 mg/10 ml koncentrācijā tika izšķīdināts dejonizētā ūdenī. Iegūtos šķīdumus sajauca ar dažādiem CDHAp/PCL un CDHAp/PLLA pulveriem. Iegūtos pulvera maisījumus žāvēja istabas temperatūrā 24 stundas. Izžāvētie kompozīti tika saspresēti tabletēs ($d = 12,5$ mm, $H = 2,2$ mm) (2.2. attēls). 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).

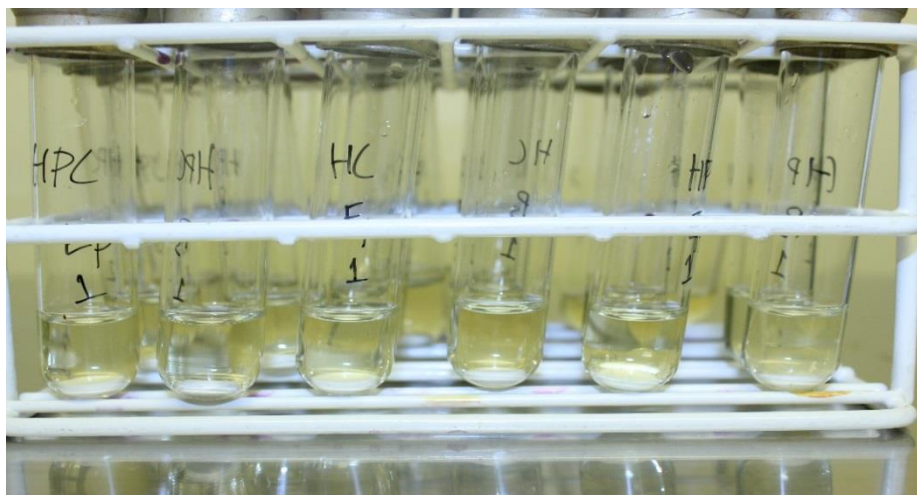


2.2. attēls. CDHAp/PLLA+cipro paraugi

2.2. Antibakteriālo īpašību noteikšana *in vitro*

2.2.1. 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 (Mettler, 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 (2.3. attēls) 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.



2.3. attēls. *S. epidermidis* suspensija ar HAp/PLLA+cipro

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 izmeklējamā biomateriālu grupās divas dienas pēc kārtas vairs netika novērotas antibakteriālas īpašības, koloniju skaits uz TSA bija vienāds ar kontroles grupas koloniju skaitu uz TSA.

2.2.2. Antibakteriālo īpašību noteikšana ar disku difūzijas metodi

Kirby-Bauer disku difūzijas metode (2.4. attēls) 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 termostātā 37 °C temperatūrā. Pēc 24 h tika analizētas biomateriālu paraugu antibakteriālās īpašības, izmērot sterilo zonu (diametru) 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.



2.4. attēls. Disku difūzijas metode

2.3. 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 plates inkubēja 37 °C temperatūrā. Rezultātus izvērtēja pēc 24 h inkubācijas (1. pielikums).

2.4. Iekaisuma intensitātes noteikšana *in vivo*

2.4.1. 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 (2. pielikums).

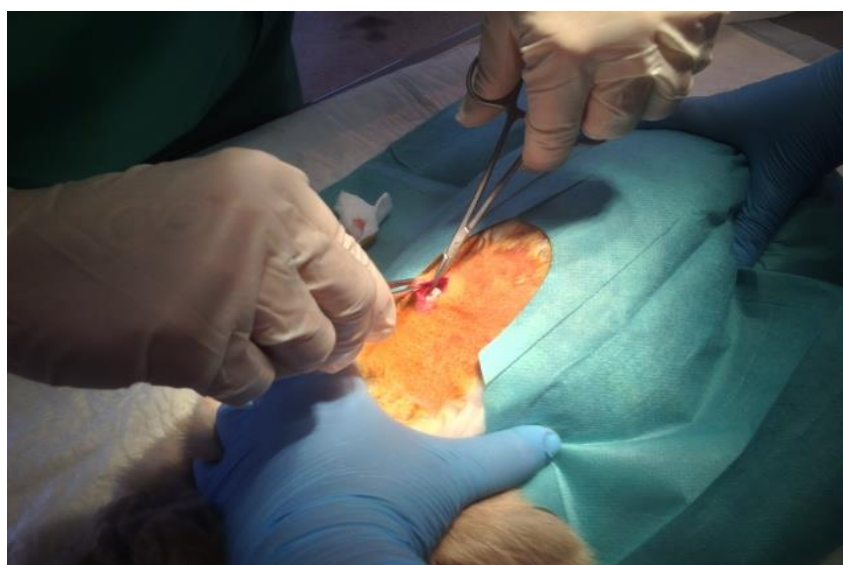
2.4.2. Operācijas gaita

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 (2.5. attēls).



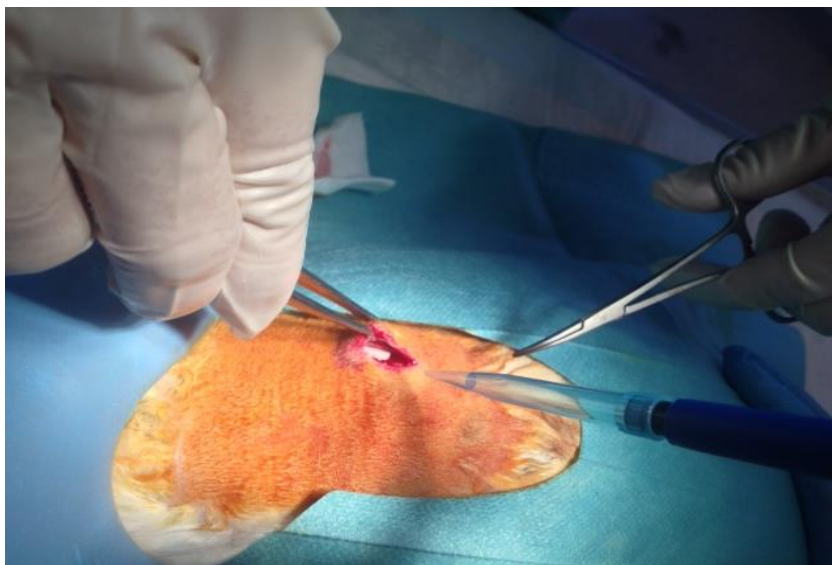
2.5. attēls. Truša sagatavošana pirms ādas incīzijas

Noskūtajā un ar antiseptiskajiem līdzekļiem apstrādātajā skausta rajonā veica lokālu atsāpināšanu ar 2% lidokaīna hidrohlorīda šķīdumu. Sterilos apstākļos, ar sterilu skalpeli veica ādas incīziju, izveidojot 2,5 cm lielu brūci. Pakāpeniski ar skalpeļa palīdzību izveidoja pietiekami lielu zemādas kabatu, kurā varētu implantēt biomateriāla tableti (2.6. attēls).



2.6. attēls. Zemādas kabata ar biomateriāla disku

Pēc biomateriāla ievietošanas zemādas kabatā brūce tika inficēta ar 0,1 ml baktēriju suspensiju (2.7. attēls).



2.7. attēls. **Brūces inficēšana ar baktēriju suspensiju**

Pēc brūces inficēšanas ar baktēriju suspensiju brūce tika aizšūta ar steriliem diegiem (2.8. attēls). Tika uzliktas 3 līdz 4 šuves, cieši noslēdzot brūci.



2.8. attēls. **Brūces aizšūšana**

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 pret 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* (2.1. tabula).

2.1. tabula

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

Paraugu grupa	HAp	PLLA	Ciprofloksacīns	Gentamicīns	<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

2.4.3. Izmeklējamais materiāls

Lai noteiktu IL-10, TNF- α 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).

2.5. 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).

2.6. Izmantotās literatūras meklēšana

Pētījumā izmantotā literatūra tika meklēta, izmantojot tiešsaistē pieejamās zinātniskās datubāzes:

- *Pubmed*
- *Scopus*
- *Science Direct*
- *ProQuest*
- *EBSCO*
- *Wiley Online*
- *Access Medicine*
- *ClinicalKey*
- *BMJ Journals*

Zinātniskajās tiešsaistes datubāzās zinātniskā literatūra tika meklēta, izmantojot atsevišķus atslēgvārdus un nepieciešamības gadījumos savienotājevārdus AND (un), OR (vai) un NOT (nē, noliegums).

Izmantotie atslēgvārdi:

- *Biomaterials*
- *Biomaterial associated infections*
- *S. epidermidis*
- *P. aeruginosa*
- *Bacteria*
- *Gentamicin*
- *Ciprofloxacin*
- *Antibiotics*
- *Polylactic acid*
- *Polycaprolactone*
- *Polymers*
- *Biodegradable*
- *Antimicrobial peptides*
- *IL-10*

- *Beta defensin*
- *Tumor necrosis factor alfa*
- *Inflammation*
- *Cytokines*
- *Hydroxyapatite*
- *In vivo*
- *In vitro*
- *Antibacterial*
- *Biofilms*

3. REZULTĀTI

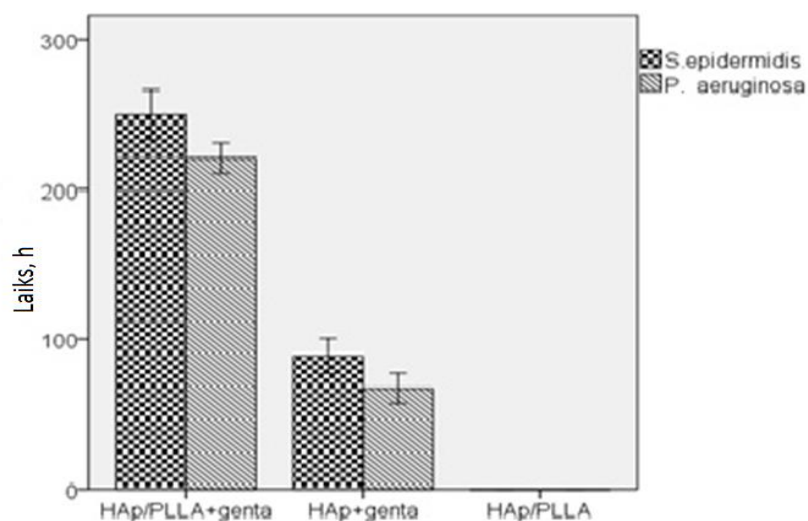
3.1. Antibiotisko vielu minimāli inhibējošā koncentrācija

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.

3.2. 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 $249,6 \pm 16,78$ h (3.1. attēls).

HAp/PLLA biomateriālam antibakteriālās īpašības netika novērotas ne pret vienu no baktēriju kultūrām.

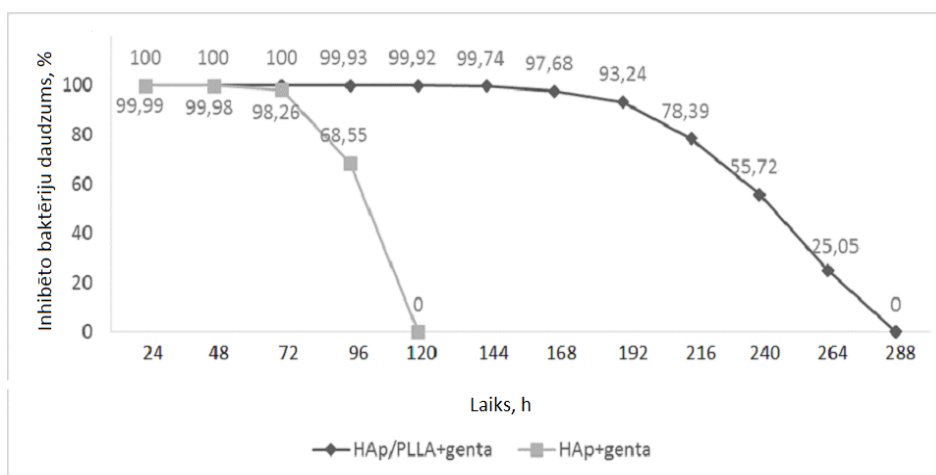


3.1. attēls. Vidējais antibakteriālais ilgums dažādiem kompozītmateriāliem ar gentamicīnu

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 ($p < 0,001$).

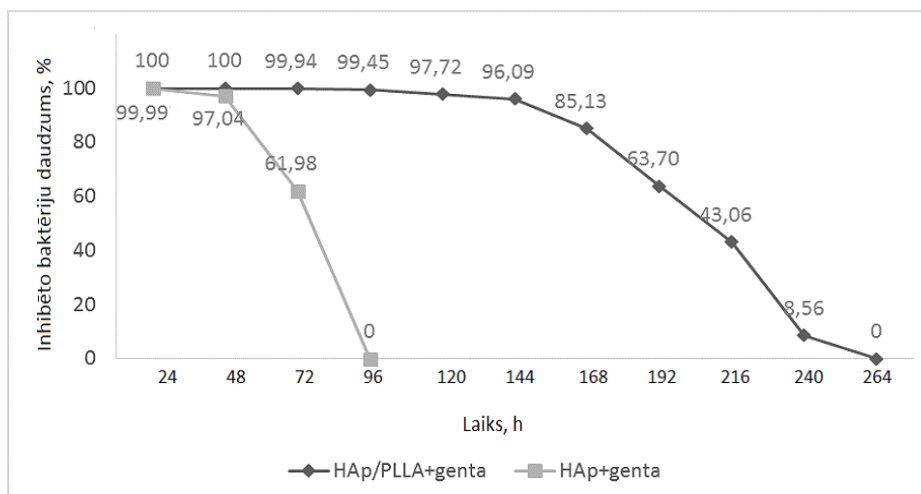
HAp/PLLA+genta un HAp+genta spēja inhibēt *S. epidermidis* augšanu *in vitro* kopumā ir atšķirīga (3.2.attēls), bet vienāda pirmajās trīs eksperimenta dienās, kad gandrīz visas *S. epidermidis* baktērijas tika inhibētas. Nākamajās eksperimenta dienās HAp/PLLA+genta saglabāja augstas *S. epidermidis* augšanas inhibīcijas spējas un zaudēja tās pakāpeniski, bet HAp+genta *S. epidermidis* augšanas inhibīcijas spējas zaudēja strauji.



3.2. attēls. *S. epidermidis* augšanas inhibīcijas dinamika

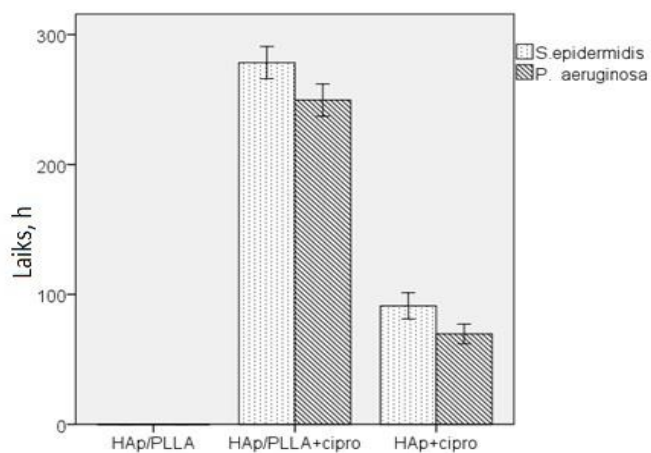
Manna–Vitnija tests parādīja, ka starp HAp/PLLA+genta un HAp+genta biomateriālu grupām pret *P. aeruginosa* ir statistiski ticama atšķirība ($p < 0,001$), un šo grupu maksimālais un vidējais antibakteriālais ilgums ir mazāks nekā pret *S. epidermidis*. Maksimālais HAp/PLLA+genta antibakteriālais ilgums 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 (3.3. attēls).



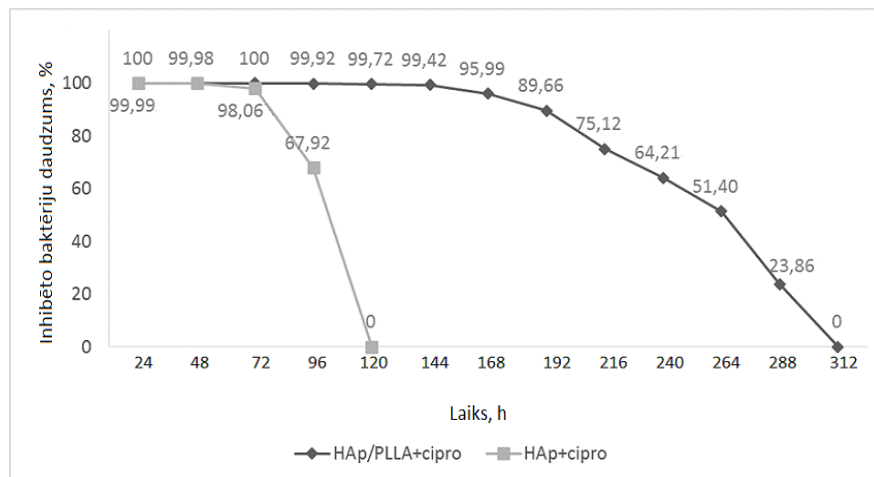
3.3. attēls. *P. aeruginosa* augšanas inhibīcijas dinamika

Līdzīgas tendences pret abām pētījumā izmantotajām baktēriju kultūrām ir gan HAp/PLLA+cipro un HAp+cipro biomateriāliem, ganr 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 (3.4. attēls).



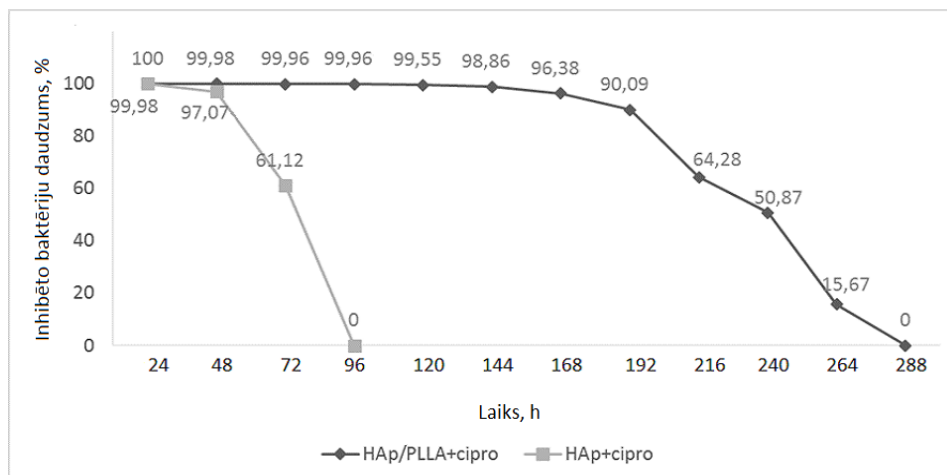
3.4. attēls. Vidējais antibakteriālais laiks dažādiem kompozītmateriāliem ar ciprofloksacīnu

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 ($p < 0,001$).



3.5. attēls. *S. epidermidis* augšanas inhibīcijas dinamika

HAp/PLLA+cipro un HAp+cipro pilnībā inhibē *S. epidermidis* augšanu (3.5.attēls.), 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 (3.6. attēls) novēroja statistiski ticamas atšķirības ($p < 0,05$) jau eksperimenta 72 h atzīmē.

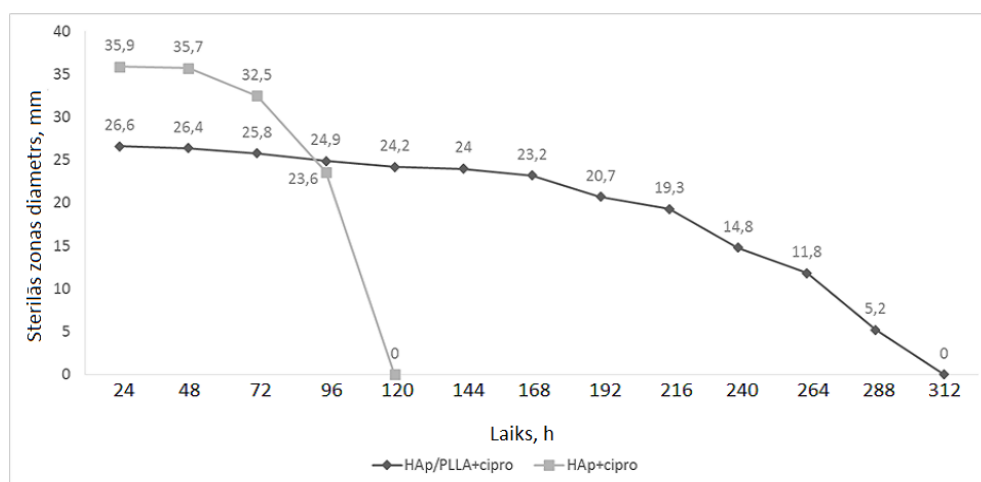


3.6. attēls. *P. aeruginosa* augšanas inhibīcijas dinamika

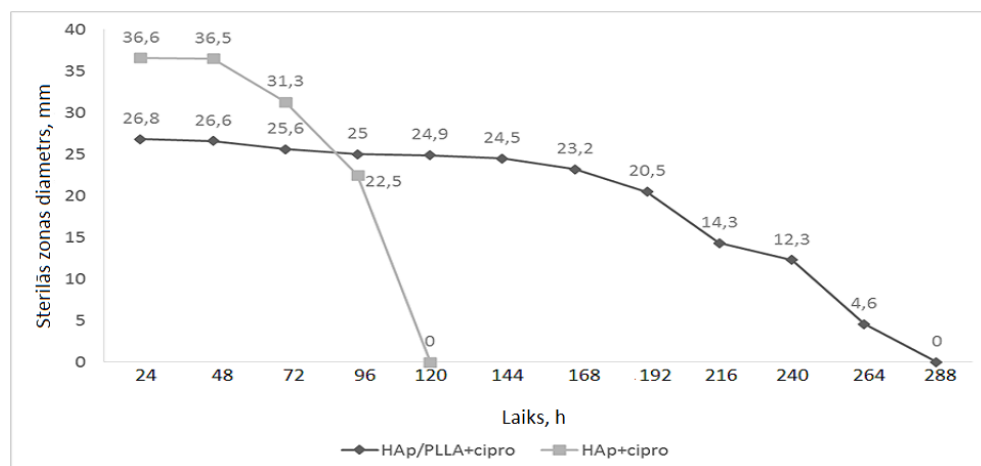
Izmantojot Manna–Vitnija testu, var secināt, ka biomateriāli – HAp/PLLA+genta, HAp+genta, HAp/PLLA+cipro un HAp+cipro – nevienai no baktēriju kultūrām statistiski ticami nemaina ($p > 0,05$) inhibēto baktēriju procentuālo daudzumu laika posmā no 24 h līdz 48 h.

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 (3.8. attēls).



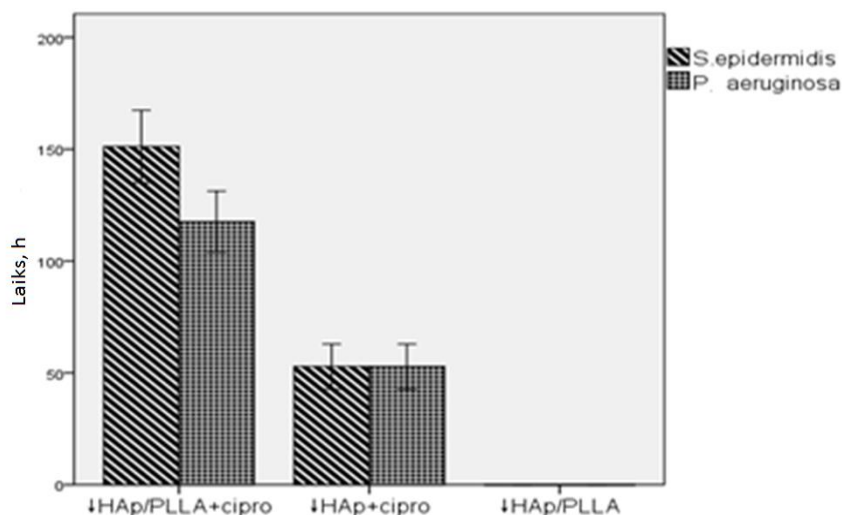
3.7. attēls. *S. epidermidis* augšanas inhibīcijas dinamika



3.8. attēls. *P. aeruginosa* augšanas inhibīcijas dinamika

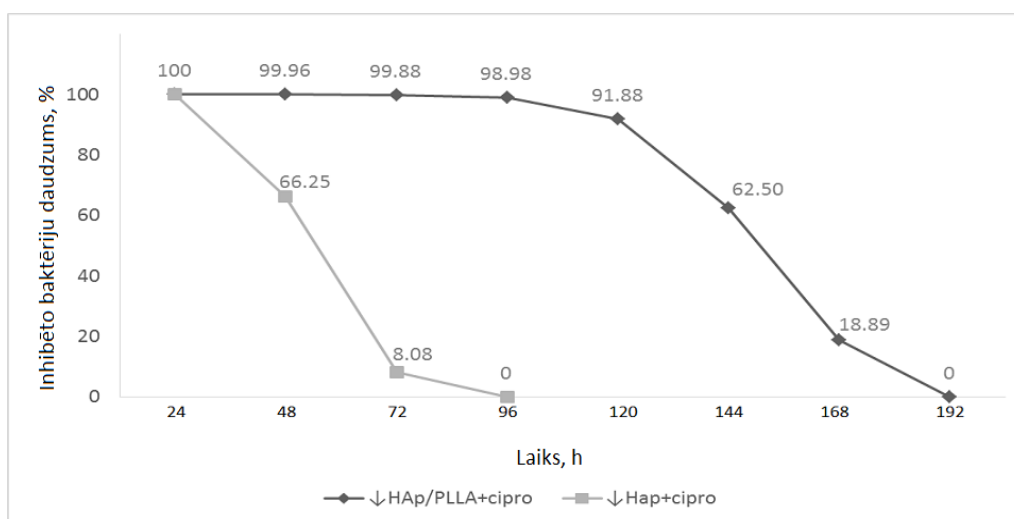
Taču HAp/PLLA+cipro kopējais antibakteriālais laiks pret *P. aeruginosa* ir ilgāks nekā HAp+cipro, un tā antibakteriālās īpašības tika zaudētas pakāpeniski visa *in vitro* pētījuma laikā.

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 (3.9. attēls).

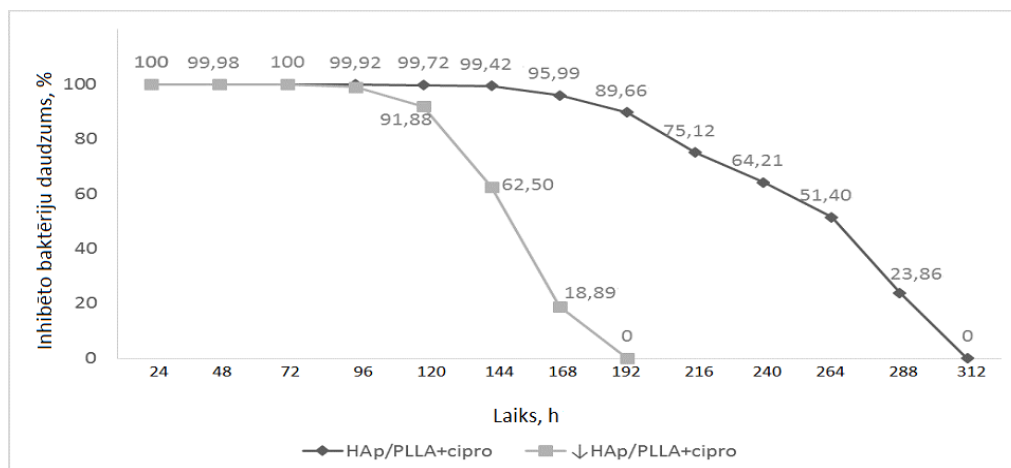


3.9. attēls. Vidējais antibakteriālais laiks kompozītmateriāliem ar samazinātu porainību un ciprofloksacīnu

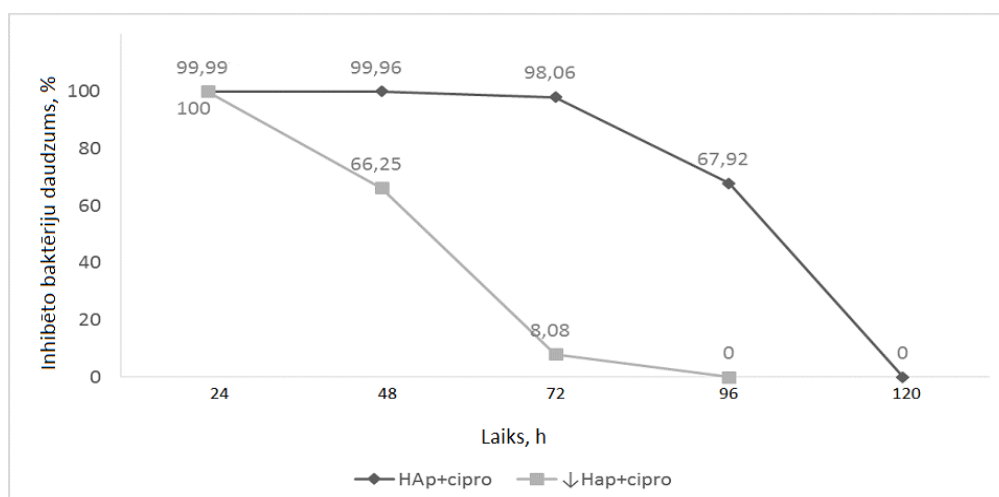
Zemākas porainības biomateriāliem novēroja *S. epidermidis* augšanas inhibīcijas dinamiku (3.10. attēls) izmaiņas, salīdzinot ar augstākas porainības līmeņa biomateriāliem (3.11. attēls un 3.12. attēls).



3.10. attēls. *S. epidermidis* augšanas inhibīcijas dinamika



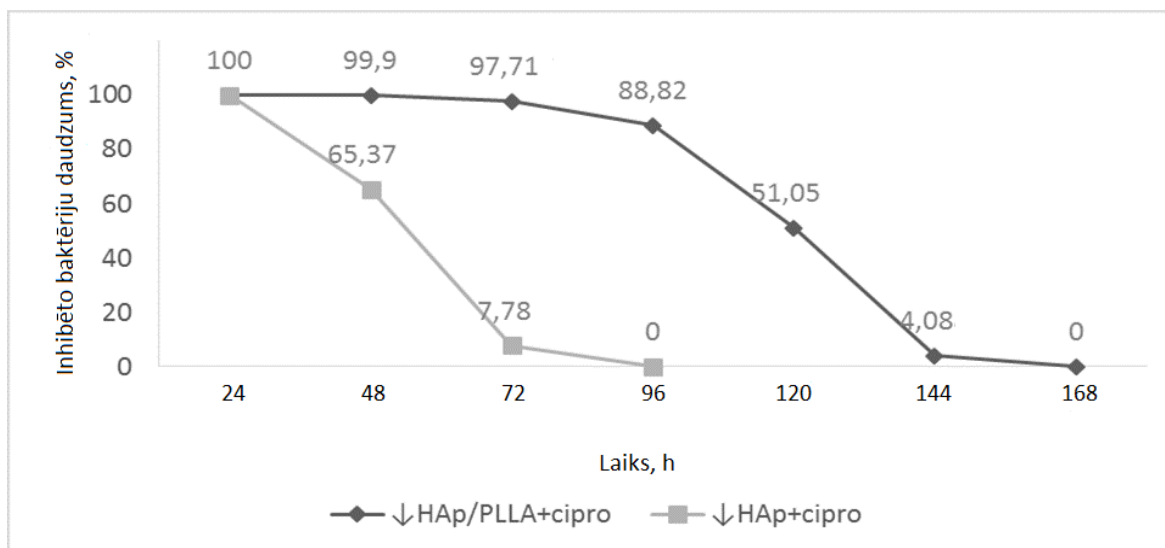
3.11. attēls. *S. epidermidis* augšanas inhibīcijas dinamika dažādas porainības biomateriāliem



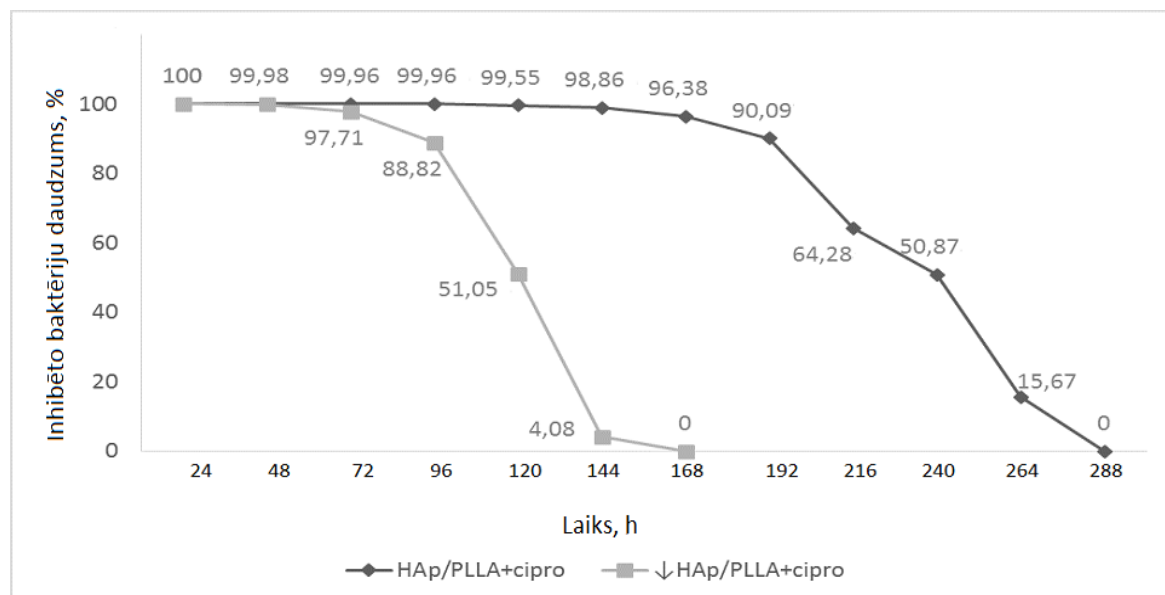
3.12. attēls. *S. epidermidis* augšanas inhibīcijas dinamika dažādas porainības biomateriāliem bez polimēra

↓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.

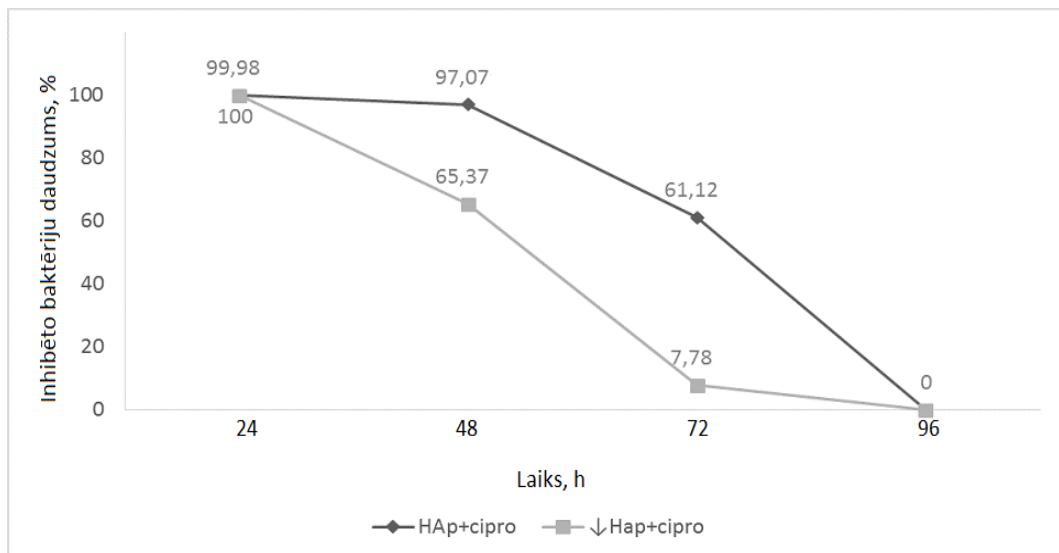
Porainības līmeņa ietekmi uz antibakteriālo laiku pierāda arī pētījums ar *P. aeruginosa* (3.13. attēls) baktēriju kultūru, kurā redzams, ka zemākas porainības biomateriāliem piemīt īslaicīga *P. aeruginosa* augšanas inhibīcijas dinamika, salīdzinot ar augstākas porainības biomateriāliem (3.14. attēls un 3.15. attēls).



3.13. attēls. *P. aeruginosa* augšanas inhibīcijas dinamika

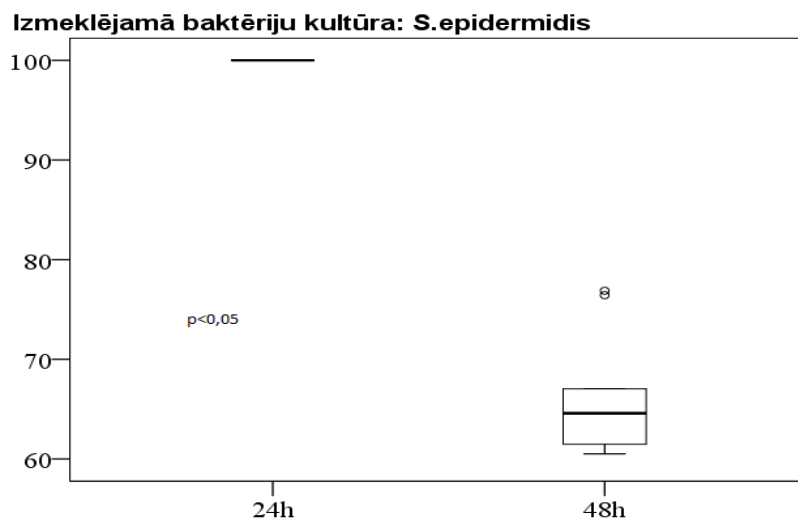


3.14. attēls. *P. aeruginosa* augšanas inhibīcijas dinamika dažādas porainības biomateriāliem

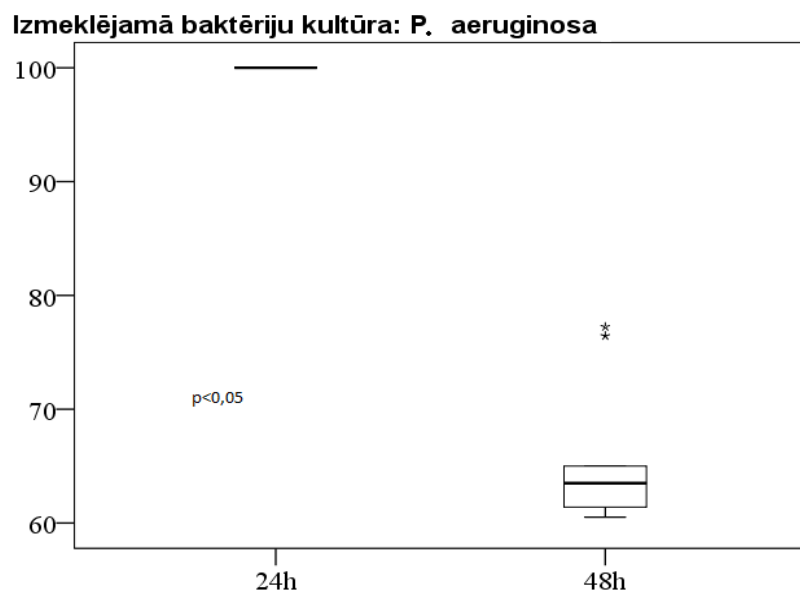


3.15. attēls. *P. aeruginosa* augšanas inhibīcijas dinamika dažādas porainības biomateriāliem bez polimēra

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 (3.16. attēls) (Manna–Vitnija tests, $p < 0,05$), tāpat arī statistiski ticami samazinājās pret *P. aeruginosa* kultūru (3.17. attēls) ($p < 0,05$).

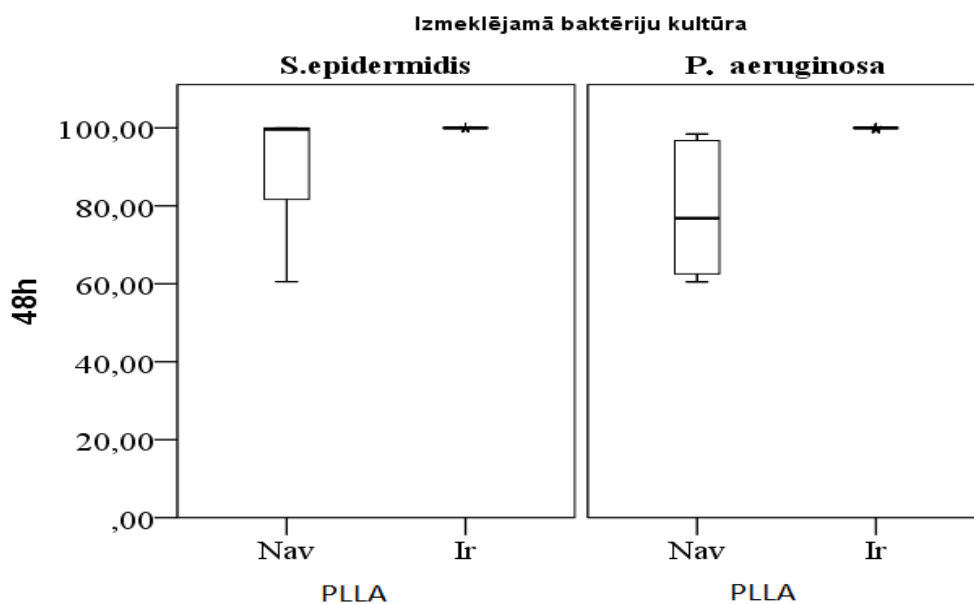


3.16. attēls. ↓HAp+cipro inhibēto baktēriju procentuālās izmaiņas laikā no 24 h līdz 48 h



3.17. attēls. ↓HAp+cipro inhibēto baktēriju procentuālās izmaiņas laikā no 24 h līdz 48 h

Pirmajās 24 h neatkarīgi no PLLA esamības zema porainības līmeņa biomateriāliem statistiski ticamas izmaiņas netika novērotas ($p < 0,05$), bet izmaiņas sāka notikt *in vitro* pētījuma 48 h atskaites posmā, un Manna–Vitnija tests parādīja, ka zema porainības līmeņa biomateriāliem bez PLLA inhibēto baktēriju procentuālās izmaiņas samazinājums pēc 48 h ir statistiski ticami lielāks nekā zema porainības līmeņa biomateriāliem ar PLLA ($p < 0,05$) neatkarīgi no baktēriju kultūras (3.18. attēls).

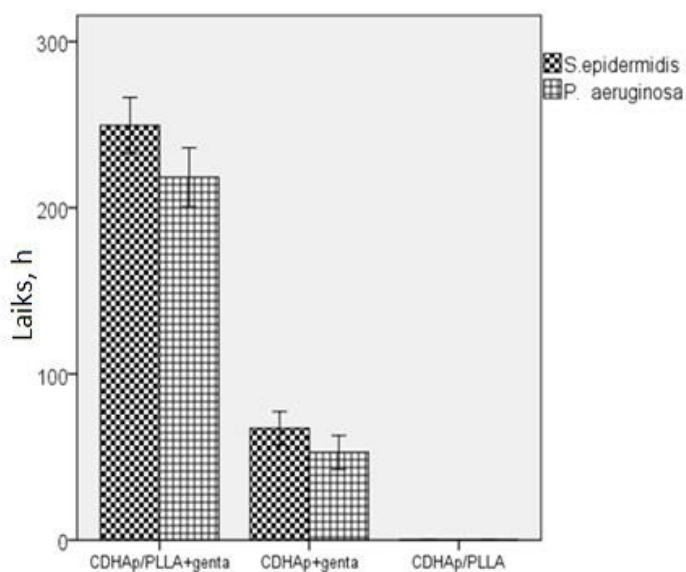


3.18. attēls. PLLA ietekme uz inhibēto baktēriju procentuālajām izmaiņām pēc 48 h

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

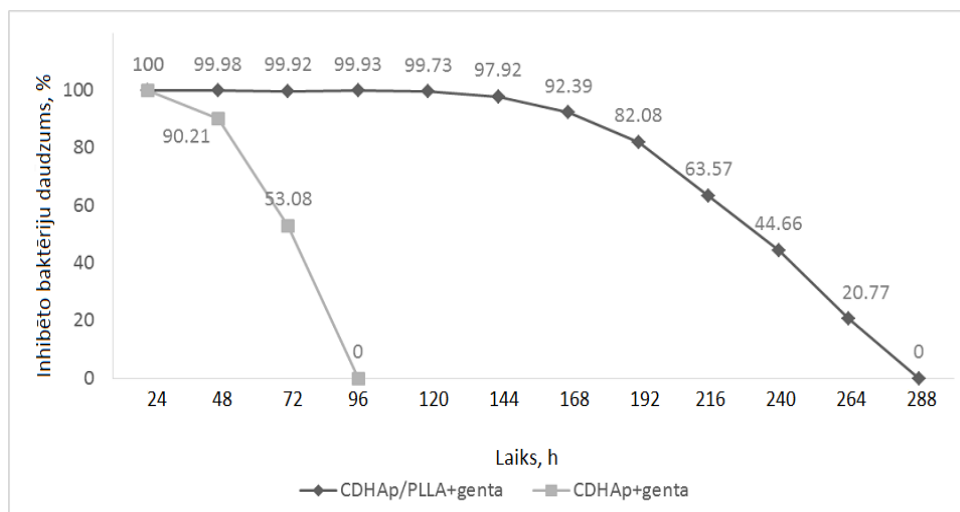
Izmantojot antibakteriālo īpašību noteikšanas metodi baktēriju suspensijā, tika noskaidrots, ka CDHAp/PLLA+genta maksimālais antibakteriālais laiks pret *S. epidermidis* ir 264 h, minimālais antibakteriālais laiks sasniedz 240 h, bet vidējais antibakteriālais laiks pret *S. epidermidis* ir $249,6 \pm 16,78$ h (3.19. attēls).

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



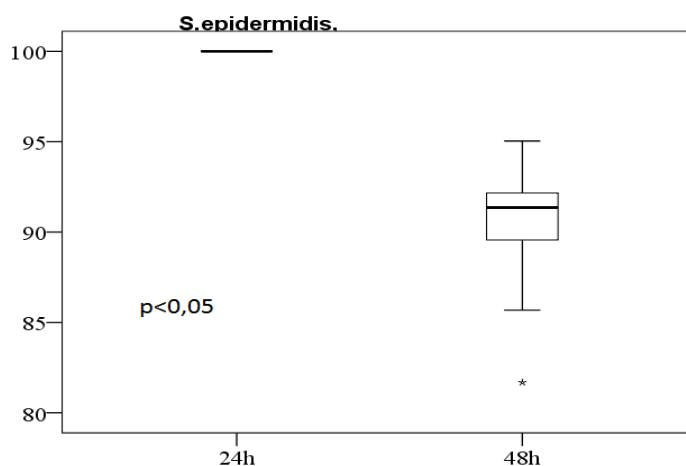
3.19. attēls. Vidējais antibakteriālais laiks kompozītmateriāliem ar gentamicīnu

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 (3.20. attēls) 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.



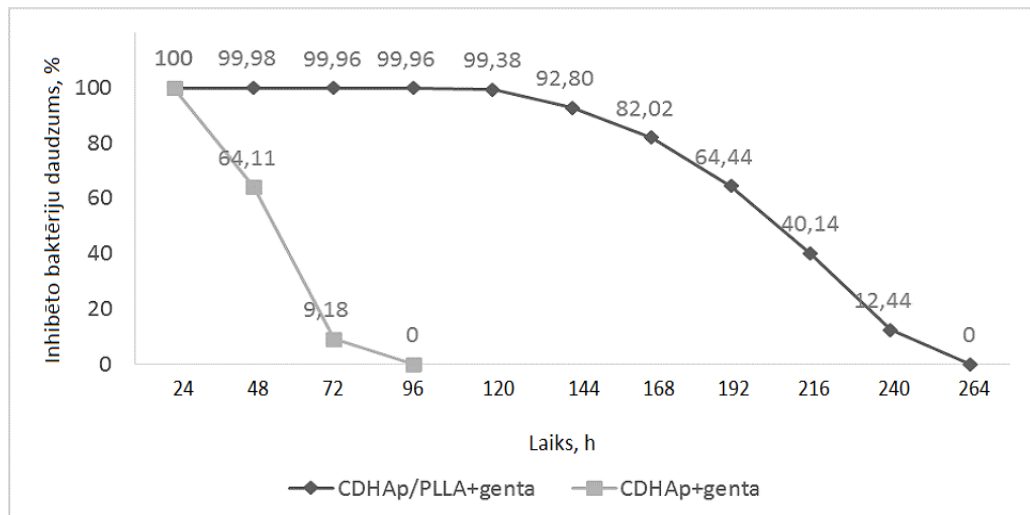
3.20. attēls. *S. epidermidis* augšanas inhibīcijas dinamika kompozītmateriāliem ar gentamicīnu

Statistiski ticamas izmaiņas no 24 h līdz 48 h tika novērotas CDHAp+genta pret *S. epidermidis* kultūrai (Manna–Vitnija tests, $p < 0,05$), (3.21. attēls).



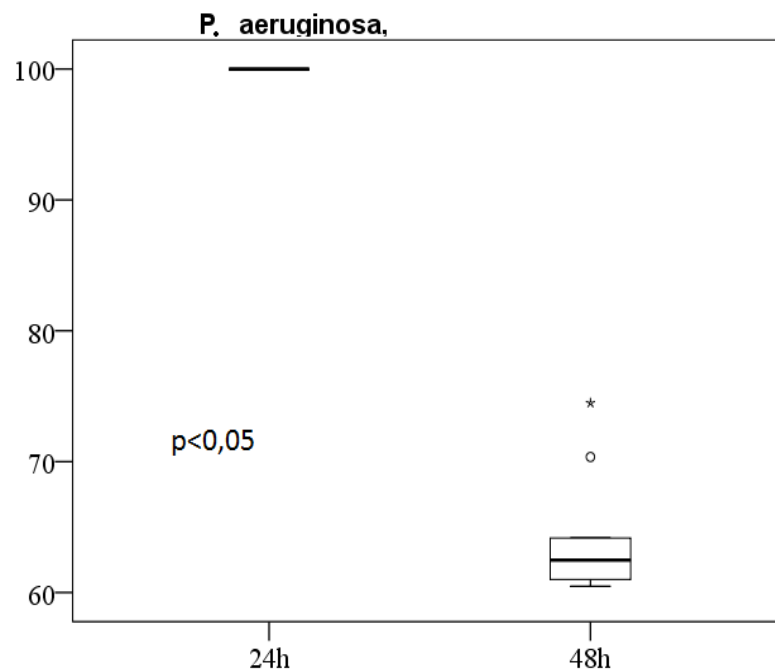
3.21. attēls. CDHAp+genta inhibēto baktēriju procentuālās izmaiņas laikā no 24 h līdz 48 h

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 (3.22. attēls) uzrāda ātrāku antibakteriālo īpašību zaudēšanu kopumā, kā arī maksimālais un minimālais antibakteriālais laiks ir atšķirīgs, un sasniedz attiecīgi, 240 h un 196 h.



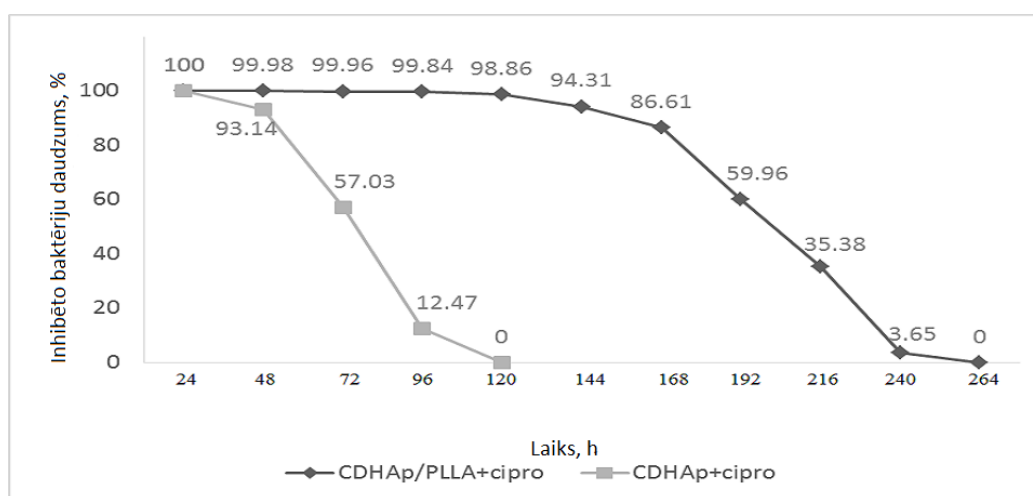
3.22. attēls. *P. aeruginosa* augšanas inhibīcijas dinamika kompozītmateriāliem ar gentamicīnu

Statistiski ticamas izmaiņas no 24 h uz 48 h tika novērotas CDHAp+genta pret *P. aeruginosa* baktēriju kultūru (3.23. attēls) (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, $p > 0,05$)



3.23.attēls. CDHAp+genta inhibēto baktēriju procentuālās izmaiņas laika dinamikā no 24 h uz 48 h

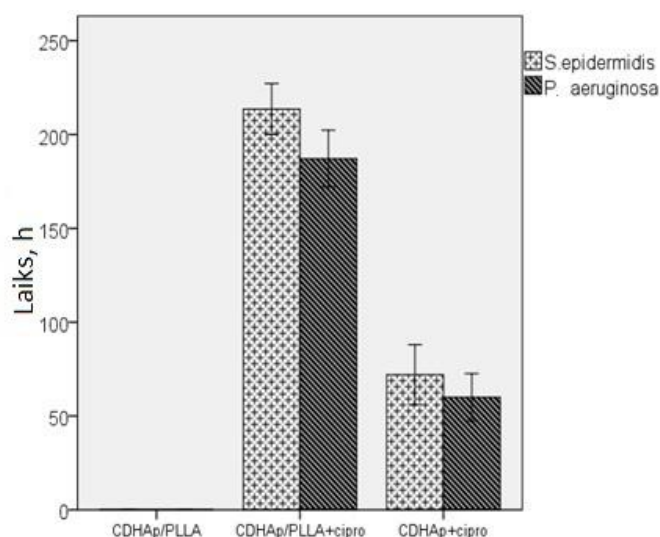
Šādas statistiski ticamas izmaiņas no 24 h uz 48 h arī nenovēroja CDHAp/PLLA+cipro un CDHAp+cipro ($p > 0,05$) pret *S. epidermidis* un *P. aeruginosa*. CDHAp+cipro statistiski ticamas izmaiņas ($p < 0,05$) novēroja pret abām in vitro pētījumā izmantotajām baktēriju grupām laika atskaites posmos no 48 h uz 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 (3.24. attēls), un salīdzinot ar tās pašas grupas biomateriāliem bez PLLA (CDHAp+cipro), antibakteriālais laiks ir statistiski ticami ($p < 0,001$) ilgāks pret *S. epidermidis*.



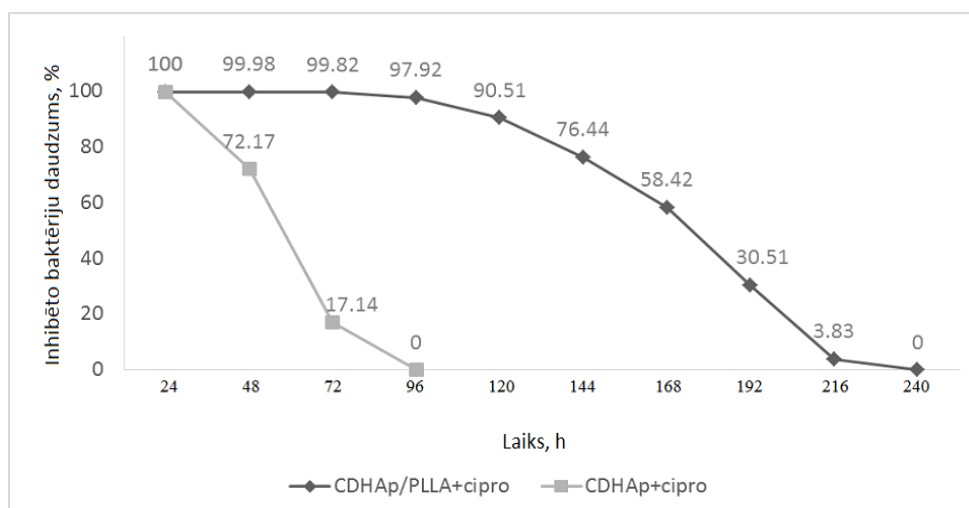
3.24. attēls. *S. epidermidis* augšanas inhibīcijas dinamika

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 (3.25. 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 ($p > 0,05$).

CDHAp/PLLA+cipro un CDHAp+cipro saglabājas kompozītmateriāliem raksturīgas inhibīcijas spējas pret *P. aeruginosa* (3.26. attēls), 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 raksturīgās straujās antibakteriālo īpašību kritumu ar strauju antibiotisko vielu izdali pirmajās pētījuma dienās.



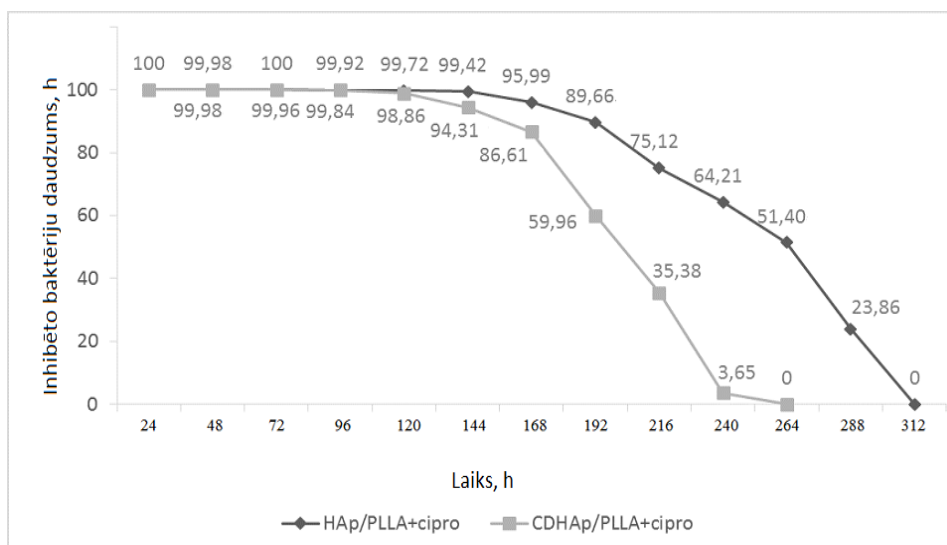
3.25. attēls. Vidējais antibakteriālais laiks kompozītmateriāliem ar kalcija deficītu, ciprofloksacīnu un PLLA



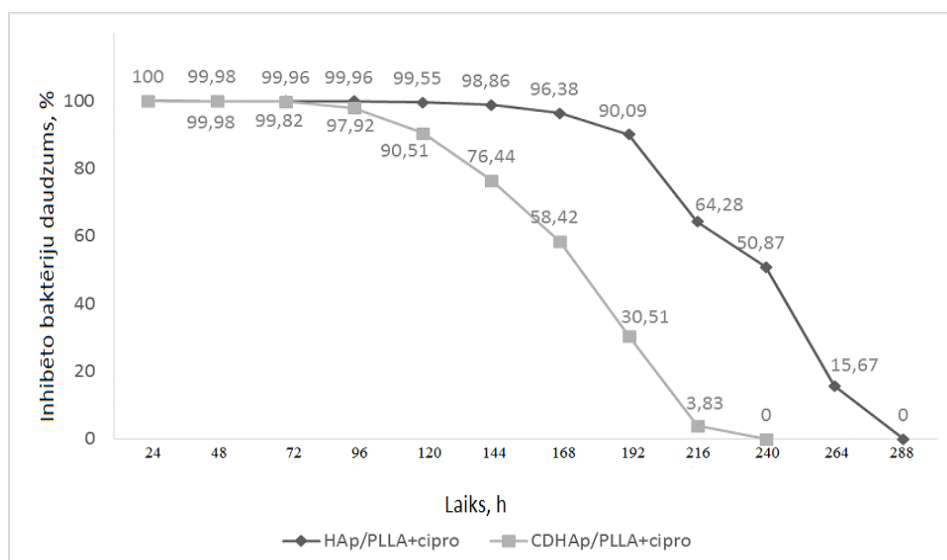
3.26. attēls. *P. aeruginosa* augšanas inhibīcijas dinamika

CDHAp+cipro biomateriālā statistiski ticamas inhibēto baktēriju procentuālās izmaiņas (Manna–Vitnija tests, $p < 0,05$) novēroja pētījuma atskaites laika posmos no 48 h uz 72 h pret *P. aeruginosa*. CDHAp+cipro maksimālais antibakteriālais laiks 72 h, un minimālais antibakteriālais laiks pret *P. aeruginosa* 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*. Ar Manna–Vitnija testu novēro statistiski ticamas atšķirības ($p < 0,001$) starp CDHAp/PLLA+cipro un CDHAp+cipro antibakteriālajiem laikiem pret *P. aeruginosa*. Salīdzinot dažādu kompozītmateriālu antibakteriālās īpašības, tad redzams, ka ir statistiski ticamas (Manna–Vitnija tests, $p < 0,001$) atšķirības starp Hap/PLLA+cipro un CDHAp/PLLA+cipro pret abām baktēriju kultūrām

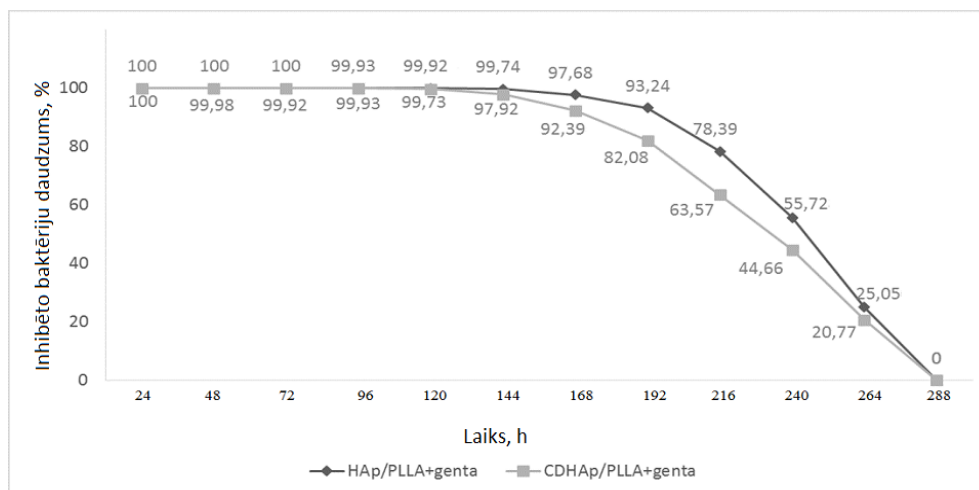
(3.27. attēls un 3.28. attēls), savukārt tiem pašiem kompozītmateriāliem ar gentamicīnu nenovēru statistiski ticamas (Manna–Vitnija tests, $p > 0,05$) atšķirības pret abām baktēriju kultūrām (3.29. attēls un 3.30. attēls).



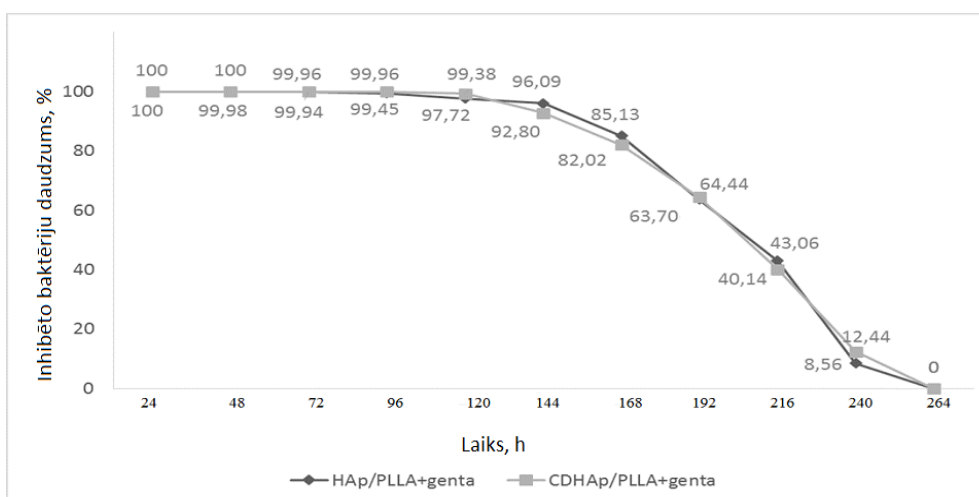
3.27. attēls. *S. epidermidis* augšanas inhibīcijas dinamika dažādiem kompozītmateriāliem



3.28.attēls. *P. aeruginosa* augšanas inhibīcijas dinamika dažādiem kompozītmateriāliem

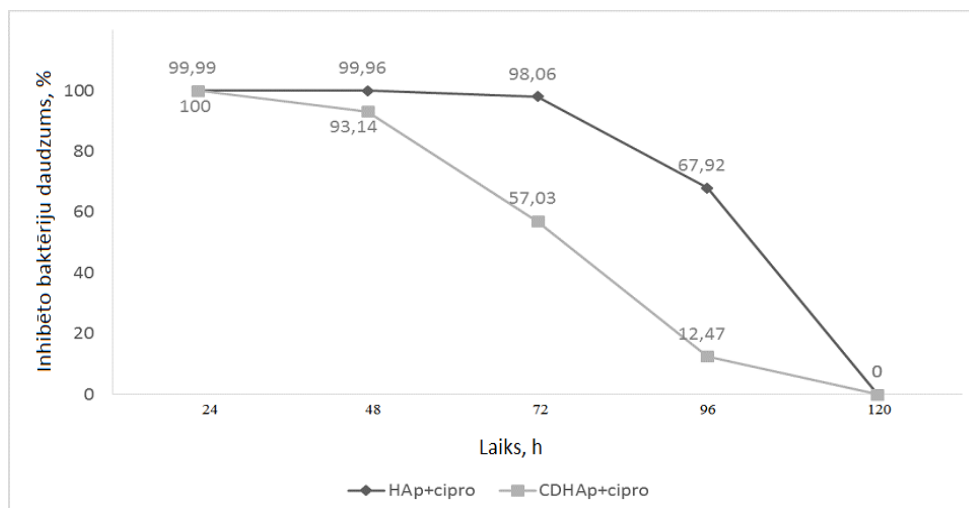


3.29. attēls. *S. epidermidis* augšanas inhibīcijas dinamika dažādiem kompozītmateriāliem ar gentamicīnu

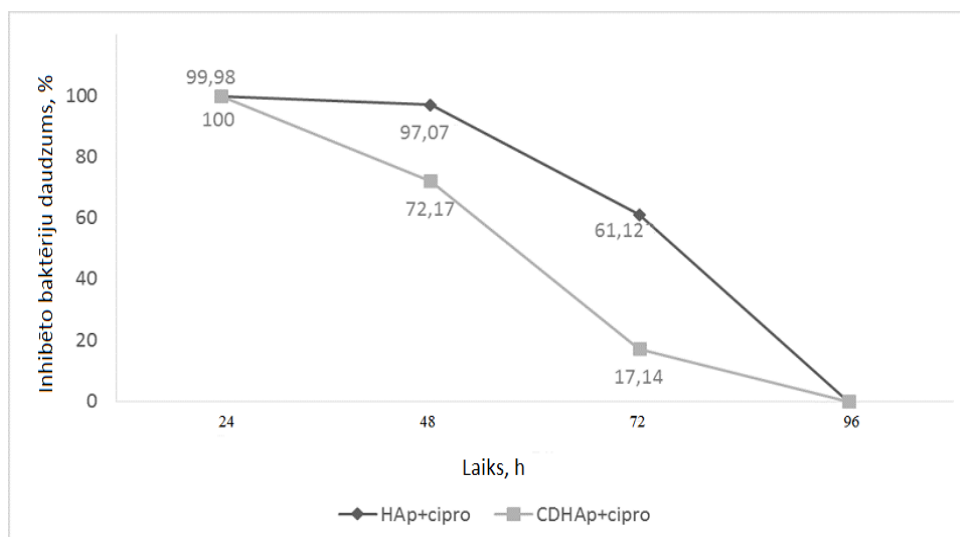


3.30. attēls. *P. aeruginosa* augšanas inhibīcijas dinamika dažādiem kompozītmateriāliem ar gentamicīnu

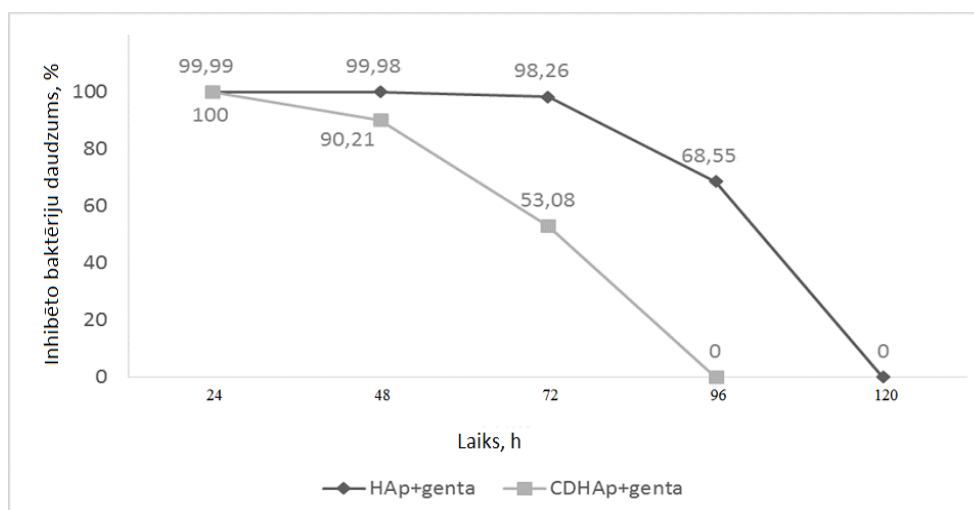
Starp dažādiem kompozītmateriāliem ar antibiotiskajām vielām bez polimēra novēro statistiski ticamas (Manna–Vitnija tests, $p < 0,001$) atšķirības antibakteriālajā laikā un baktēriju inhibīcijas dinamikā pret abām baktēriju kultūrām (3.31. attēls, 3.32. attēls, 3.33. attēls, 3.34. attēls).



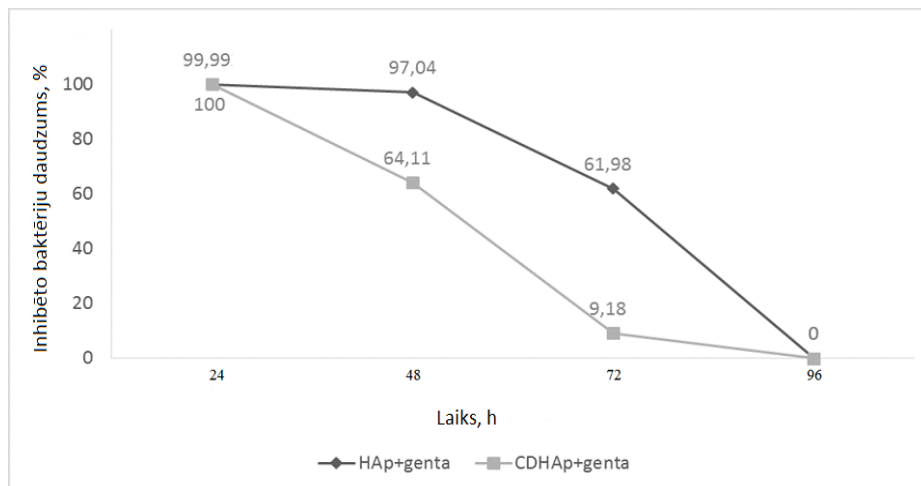
3.31. attēls. *S. epidermidis* augšanas inhibīcijas dinamika dažādiem kompozītmateriāliem ar ciprofloksacīnu bez polimēra



3.32. attēls. *P. aeruginosa* augšanas inhibīcijas dinamika dažādiem kompozītmateriāliem ar ciprofloksacīnu bez polimēra



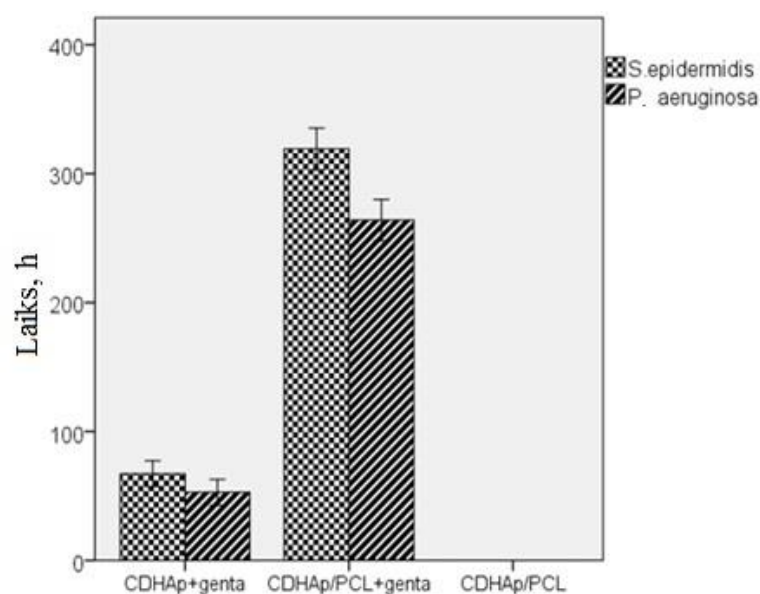
3.33. attēls. *S. epidermidis* augšanas inhibīcijas dinamika dažādiem kompozītmateriāliem ar gentamicīnu bez polimēra



3.34. attēls. *P. aeruginosa* augšanas inhibīcijas dinamika dažādiem kompozītmateriāliem ar gentamicīnu bez polimēra

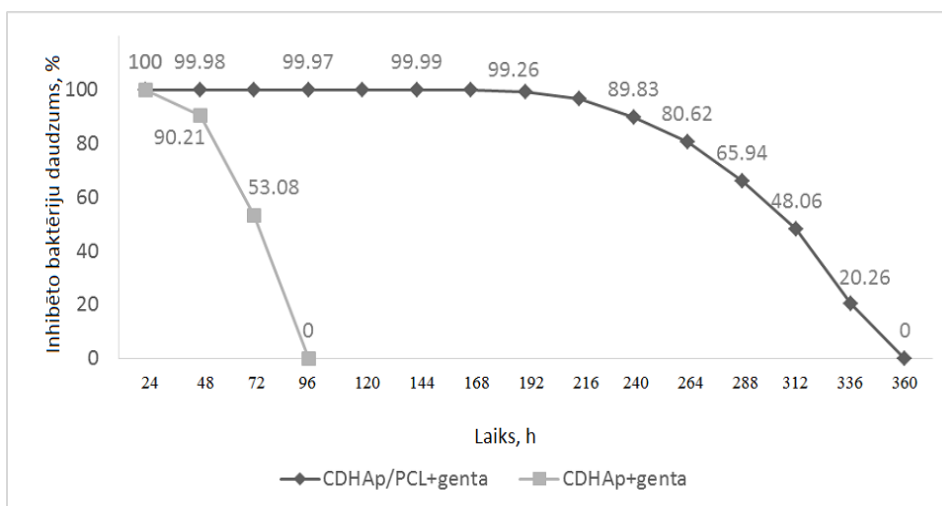
3.4. CDHAp/PCL+genta un CDHAp/PCL+cipro antibakteriālā efektivitāte *in vitro*

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 (3.35. attēls) pret *S. epidermidis*, sasniedzot antibakteriālo ilgumu $319,2 \pm 16,19$ h.



3.35. attēls. Vidējais antibakteriālais laiks kompozītmateriāliem ar kalcija deficītu, gentamicīnu un PCL

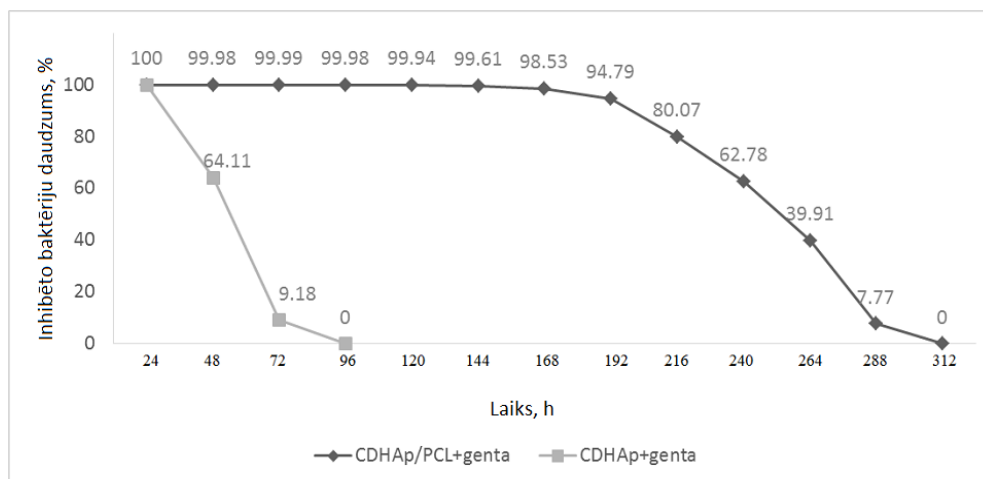
Ilgais CDHAp/PCL+genta antibakteriālais laiks ir saistīts ar atsevišķu paraugu ilgo maksimālo antibakteriālo laiku pret *S. epidermidis* – 336 h, un minimālo antibakteriālo laiku – 288 h. Pret *P. aeruginosa* CDHAp/PCL+genta maksimālais antibakteriālais laiks sasniedz 288h, un minimālais antibakteriālais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



3.36. attēls. *S. epidermidis* augšanas inhibīcijas dinamika

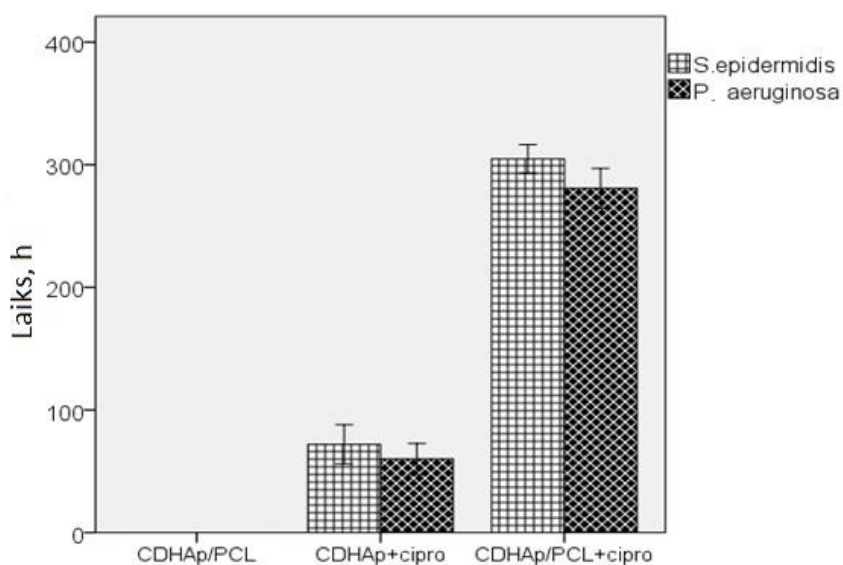
CDHAp/PCL+genta spēja inhibēt *S. epidermidis* augšanu pilnībā saglabājas ilgu laiku no 192 h līdz 216 h (3.24.attēls), un arī vēlāk, pilnībā *S. epidermidis* augšana netiek nomākta, antibakteriālās īpašības tiek zaudētas pakāpeniski. Biomateriālu paraugi bez PCL antibakteriālās spējas zaudē strauji, un *in vitro* pētījuma laika atzīmē no 24 h līdz 48 h novēro statistiski ticamas atšķirības inhibēto baktēriju procentuālā rādītājā ($p < 0,05$) izmantojot Manna-Vitnija testu.

Pilna *P. aeruginosa* augšanas inhibīcija (3.37. attēls) CDHAp/PCL+genta tika novērota līdz pētījuma 168 stundu atzīmei. Un pētījuma turpinājumā novēroja kopējo tendenci viesiem kompozītmateriāliem ar antibiotiskajām vielām un bionoārdāmu polimēru, ka antibakteriālās spējas tiek zaudētas pakāpeniski.



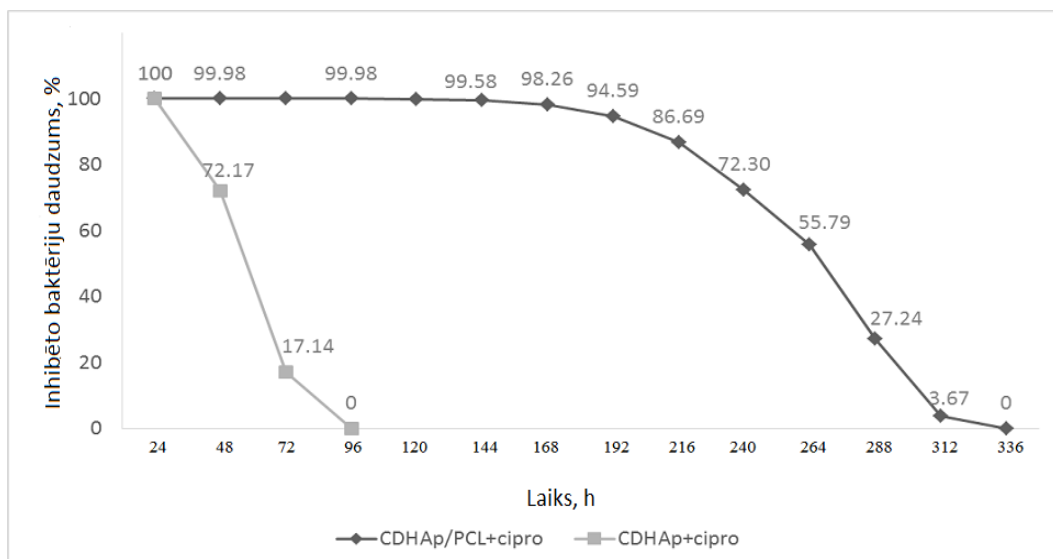
3.37. attēls. *P. aeruginosa* inhibīcijas dinamika

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



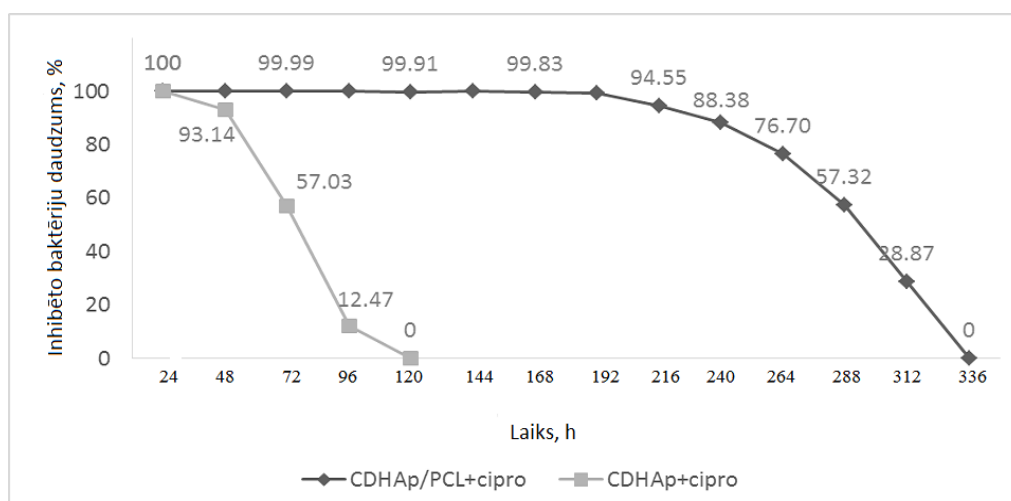
3.38. attēls. Vidējais antibakteriālais laiks kompozītmateriāliem ar kalcija deficītu, ciprofloksacīnu un PCL

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 (3.38. attēls). Manna–Vitnija tests uzrāda, ka starp CDHAp/PCL+cipro un CDHAp+cipro pret *P. aeruginosa* ir statistiski ticama atšķirība ($p < 0,001$).



3.39. attēls. *P. aeruginosa* augšanas inhibīcijas dinamika

Kā rāda *P. aeruginosa* augšanas inhibīcijas dinamika (3.39. attēls), 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, $p > 0,05$).

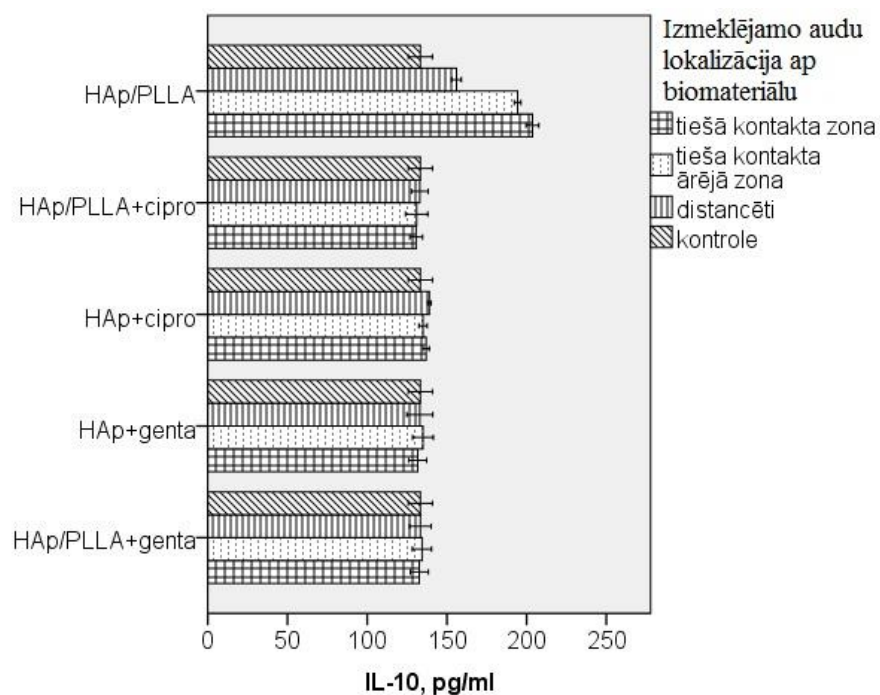


3.40. attēls. *S. epidermidis* augšanas inhibīcijas dinamika kompozītmateriāliem ar ciprofloksacīnu

Salīdzinot CDHAp/PCL+cipro spēju inhibēt *P. aeruginosa* ar *S. epidermidis* augšanu (3.40. attēls), 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.

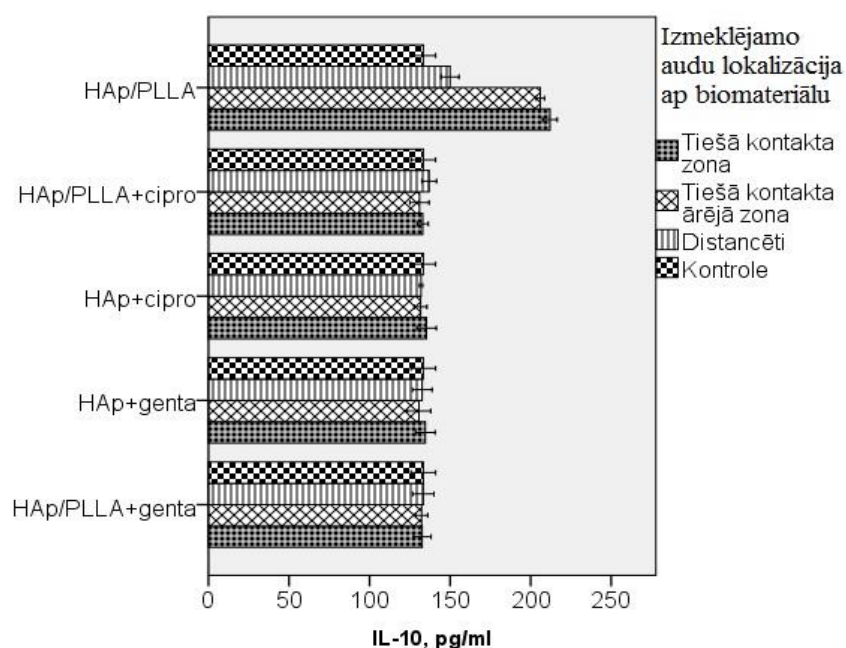
3.5. IL-10 ekspresijas intensitāte *in vivo*

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 (3.41. attēls). 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.



3.41. attēls. IL-10 ekspresijas intensitātes līmenis *S. epidermidis* kontaminācijas gadījumā

Kontaminējot HAp/PLLA+genta, HAp/PLLA+cipro, HAp+genta un HAp+cipro ar *P. aeruginosa* baktēriju kultūru, neatkarīgi no izmeklējamā audu novietojuma ap biomateriālu netika novērotas statistiski ticamas atšķirības ($p > 0,05$) IL-10 ekspresijā (3.42. attēls).



3.42. attēls. IL-10 ekspresijas intensitātes līmenis *P. aeruginosa* kontaminācijas gadījumā

Manna–Vitnija tests parādīja statistiski ticamas ($p < 0,05$) IL-10 līmeņa atšķirības starp kontroles grupas un pārējiem izmeklējamajiem 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).

3.1. 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

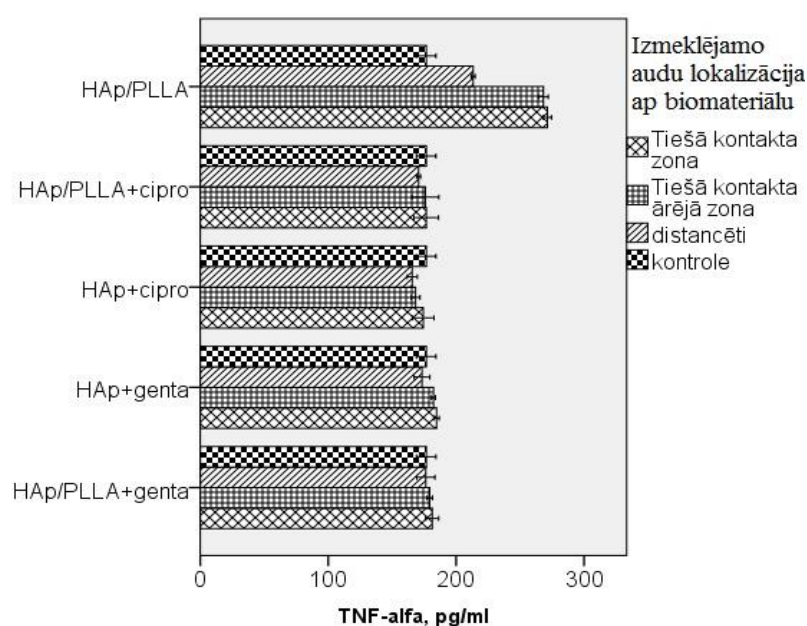
3.2. tabula

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

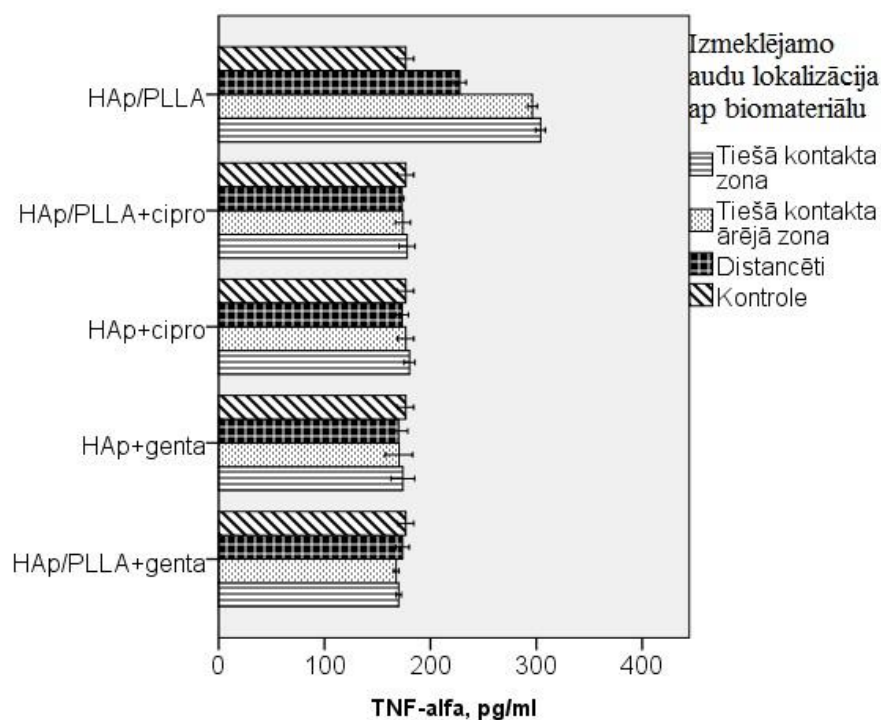
3.6. TNF-alfa ekspresijas intensitāte *in vivo*

TNF-alfa intensitātes līmenis izmeklējamajos audos gan *S. epidermidis* (3.43. attēls), gan *P. aeruginosa* (3.44. attēls) kontaminācijas gadījumā neizmainās un netiek novērotas statistiski ticamas ($p > 0,05$) atšķirības ar kontroles grupu, ja tiek implantēti kompozītmateriāli ar antibiotiskajām vielām.



3.43. attēls. TNF-alfa ekspresijas intensitātes līmenis *S. epidermidis* kontaminācijas gadījumā

Intensīvāko TNF-alfa ekspresiju novēro tiešā kontaktā esošos audos ap HAp/PLLA, kas kontaminēts ar *S. epidermidis* vai *P. aeruginosa* (3.3. un 3.4. tabula). 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.



3.44. attēls. TNF-alfa ekspresijas intensitātes līmenis *P. aeruginosa* kontaminācijas gadījumā

3.3. 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+gentā	181 ± 5,03	179 ± 2,08	176 ± 7,09	177 ± 7,63
HAp+gentā	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

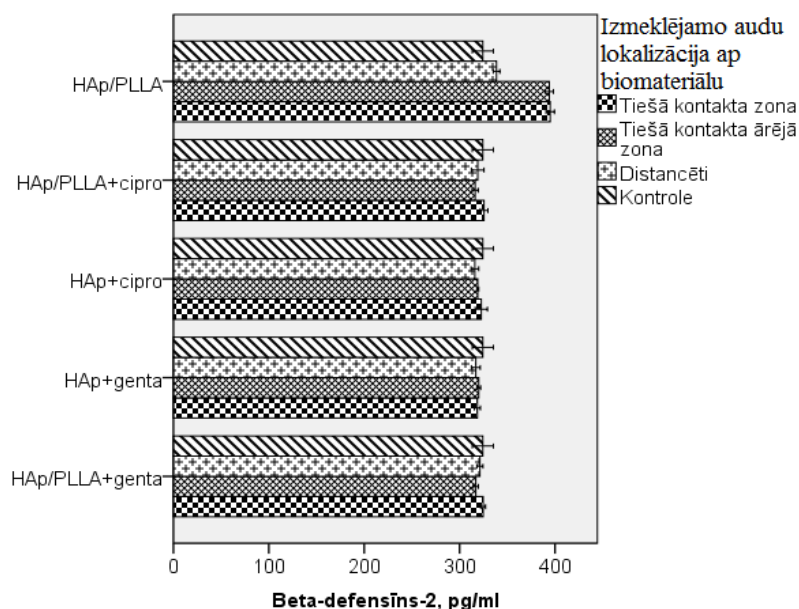
3.4. tabula

TNF-alfa 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	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+gentā	170 ± 2,65	168 ± 2,52	174 ± 6,43	177 ± 7,63
HAp+gentā	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

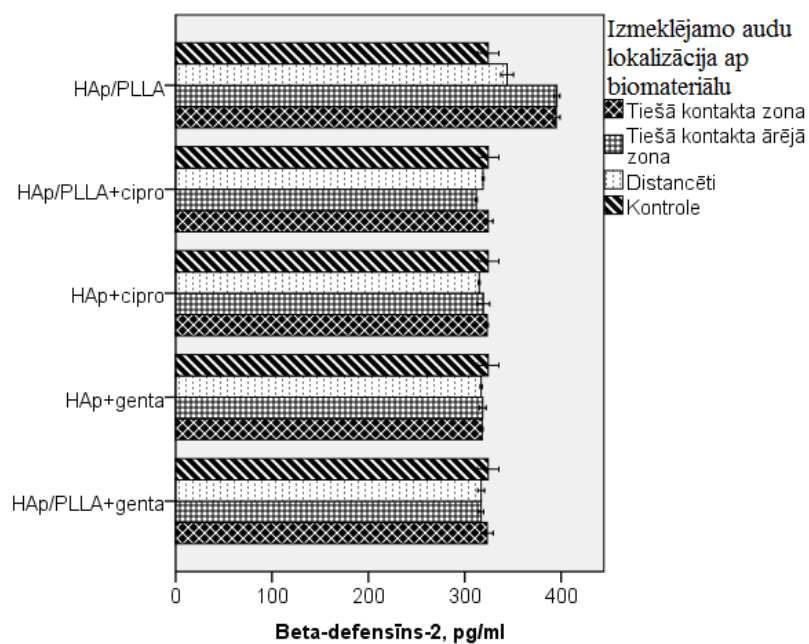
3.7. Beta-defensīna-2 ekspresijas intensitāte *in vivo*

Intensīvākā beta-defensīna-2 ekspresija notiek audos, kas ir visciešākajā kontaktā ar *S. epidermidis* kontaminētu HAp/PLLA (3.45. attēls); 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.



3.45. attēls. **Beta-defensīna-2 ekspresijas intensitātes līmenis *S. epidermidis* kontaminācijas gadījumā**

Kontaminējot HAp/PLLA+cipro, HAp+cipro, HAp/PLLA+gentā un HAp+gentā ar *P. aeruginosa*, pēc 4 nedēļu implantācijas nenovēroja beta-defensīna-2 līmeņa izmaiņas, salīdzinot ar kontroles grupu (3.46. attēls). 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.



3.46. attēls. **Beta-defensīna-2 ekspresijas intensitātes līmenis *P. aeruginosa* kontaminācijas gadījumā**

3.5. tabula

Beta-defensīna-2 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	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+gent	325 ± 2,52	317 ± 2,65	321 ± 3,21	324 ± 11,01
HAp+gent	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

3.6. tabula

Beta-defensīna-2 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	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+gent	323 ± 6,11	317 ± 2,65	317 ± 3,61	324 ± 11,01
HAp+gent	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

4. DISKUSIJA

4.1. 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 ierosinātājiem 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 implantāntu un mutes dobuma 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 oportūnisko

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, salīdzinot 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 hidroksiapatīta antibakteriālās īpašības *in vitro* un to biosaderību *in vivo* pētījumā pēc biomateriāla implantācijas un kontaminācijas ar baktēriju kultūrām, nosakot iekaisuma citokīnu IL-10, TNF- α un antibakteriālā peptīda β -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 pretsēnīšu 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 izdalei 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- α un

β -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 ± 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/ β -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 biofilmas 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 ierosinātais 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/β-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 ↓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 ↓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, hidroksiapatītam 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 ± 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 paildzina 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 °C un –80 °C temperatūrā bija samērā līdzīga. Gentamicīna šķīdumu pakļaujot 50 °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 tīkliņš *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).

4.2. Iekaisumu citokīnu ekspresija *in vivo*

Pētījuma *in vivo* sadaļā tika noteikta iekaisuma citokīnu (TNF- α un IL-10) un antibakteriālo peptīdu (β -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- α , IL-10 un β -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 izdalīšanu 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 nedēļas implantācijas apkārtējos audos ekspresējas palielināts TNF- α , IL-10 un β -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- α 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 veselīgiem audiem ap dentālo implantu (Ata-Ali *et al.*, 2015).

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

Intensīvāka TNF- α , β -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- α 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- α produkciju (Gul *et al.*, 2011).

5. 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*; tas 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 un kontaminētu 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 nesaturošu biomateriālu.

PUBLIKĀCIJAS 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 TiO₂ 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 (October 18–20, 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, March 26–28, 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, September 18–20, 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 – 8th 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 – 7th 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. // 24th 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 22nd 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 22nd 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. // 12th Baltic Congress of Laboratory Medicine (Latvia, Riga, September 18–20, 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. // 12th Baltic Congress of Laboratory Medicine (Latvia, Riga, September 18–20, 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. // 2nd 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 – 8th 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

1. **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.
2. **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.
3. **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.
4. **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.
5. **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.
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. Fizioloģiskās vides ietekme uz biomateriāliem ar biodegradējamu polipienskābes polimēru. RSU Zinātniskā konference: Tēzes (2015. gada 26.–27. marts). Rīga: RSU, 2015, 306. lpp.

IZMANTOTĀ LITERATŪRA

1. Agarwal A., Singh K. P., Jain A. Medical significance and management of staphylococcal biofilm // FEMS Immunol Med Microbiol, 2010; 58(2): 147–160.
2. Ahmed R. M., Hannigan I. P., MacDougall H. G., Chan R. C., Halmagyi G. M. Gentamicin ototoxicity: a 23-year selected case series of 103 patients // Med J Aust, 2012; 196 (11): 701–704.
3. 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.
4. Aires J. R., Köhler T., Nikaido H., Plésiat P. Involvement of an active efflux system in the natural resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to Aminoglycosides // Antimicrob Agents Chemother, 1999; 43(11): 2624–2628.
5. 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* iInfection among hospitalized patients // Am J Clin Pathol, 2015; 143(6): 895–900.
6. Alexander W. S., Hilton D. J. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation // Annu Rev Immunol, 2004; 22: 503–529.
7. American Thoracic Society; Infectious Diseases Society of America. Guidelines for the management of adults with hospital-acquired, ventilator-associated, and healthcare-associated pneumonia // Am J Respir Crit Care Med, 2005 Feb 15; 171(4): 388–416.
8. Aminov R. I. A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future // Front Microbiol, 2010; 1: 134.
9. Aminov R. I. The role of antibiotics and antibiotic resistance in nature // Environ. Microbiol, 2009; 11: 2970–2988.
10. 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.
11. Armentano I., Dottori M., Fortunati E., Mattioli S., Kenny J. M. Biodegradable polymer matrix nanocomposites for tissue engineering: a review // Polymer Degradation and Stability, 2010; 2126–2146.
12. Ball P. Quinolone generations: natural history or natural selection? // J Antimicrob Chemother, 2000; 46 Suppl T1: 17–24.
13. Banerjee I., Pangule R. C., Kane R. S. Antifouling coatings: recent developments in the design of surfaces that prevent fouling by proteins, bacteria, and marine organisms // Adv Mater, 2011; 23: 690–718.
14. Barken K. B., Pamp S. J., Yang L., Gjermansen M., Bertrand J. J., Klausen M., et al. Roles of type IV pili, flagellum-mediated motility and extracellular DNA in the formation of mature multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms // Environ Microbiol, 2008; 10(9): 2331–2343.
15. 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.
16. 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.

17. Biswal I., Arora B. S., Kasana D. Incidence of multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients and environment of teaching institution // J Clin Diagn Res, 2014; 8(5): DC26–DC29.
18. Busscher H. J., van der Mei H. C., Subbiahdoss G., Jutte P. C., van den Dungen J. J., Zaat S. A., et al. Biomaterial-associated infection: locating the finish line in the race for the surface // Sci Transl Med, 2012; 4(153): 153rv10.
19. Büttner H., Mack D., Rohde H. Structural basis of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation: mechanisms and molecular interactions // Front Cell Infect Microbiol, 2015; 5(14): 1–15.
20. 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.
21. Campoli-Richards D. M., Monk J. P., Price A., Benfield P., Todd P. A., Ward A. Ciprofloxacin. A review of its antibacterial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic use // Drugs, 1988 Apr; 35(4): 373–447.
22. Caron W. P., Mousa S. A. Prevention strategies for antimicrobial resistance: a systematic review of the literature // Infect Drug Resist, 2010; 3: 25–33.
23. 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.
24. Chain E., Florey H. W., Gardner A. D., Heatley N. G., Jennings M. A., Orr-Ewing J., et al. Penicillin as a chemotherapeutic agent // The Lancet, 1940; 236(6104): 226–228.
25. Chang H. I., Lau Y. C., Yan C., Coombes A. G. Controlled release of an antibiotic, gentamicin sulphate, from gravity spun polycaprolactone fibers // J Biomed Mater Res A, 2008; 84(1): 230–237.
26. 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.
27. Charo I. F., Ransohoff R. M. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation // N Engl J Med, 2006; 354(6): 610–621.
28. Chatzistavrou X., Velamakanni S., DiRenzo K., Lefkelidou A., Fenno J. C., Kasuga T., et al. Designing dental composites with bioactive and bactericidal properties // Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2015; 52: 267–272.
29. Chen Q., Thouas G. A. Metallic implant biomaterials // Materials Science and Engineering: R: Reports, 2015; 87: 1–57.
30. Chew B. H., Lange D. Ureteral stent symptoms and associated infections: a biomaterials perspective // Nature Reviews Urology, 2009; 6: 440–448.
31. Chikwendu C. I., Amadi E. S., Obi R. K. Relevance and antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from non-clinical urine samples // New York Science Journal, 2010; 3(11): 194–200.
32. Chopra I., Roberts M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance // Microbiol Mol Biol Rev, 2001; 65(2): 232–260.
33. Choy M. H., Stapleton F., Willcox M. D., Zhu H. Comparison of virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from contact lens- and non-contact lens-related keratitis // J Med Microbiol, 2008; 57(Pt 12): 1539–1546.
34. Clardy J., Fischbach M., Currie C. The natural history of antibiotics // Current Biology, 2009; 19: 437–441.

35. Cogen A. L., Nizet V., Gallo R. L. Skin microbiota: a source of disease or defence? // *Br J Dermatol*, 2008; 158(3): 442–455.
36. 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.
37. 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.
38. Costa F., Carvalho I. F., Montelaro R. C., Gomes P., Martins M. C. Covalent immobilization of antimicrobial peptides (AMPs) onto biomaterial surfaces // *Acta Biomater*, 2011; 7(4): 1431–1440.
39. Cunha B. A. Antibiotic side effects // *Med Clin North Am*, 2001; 85(1): 149–185.
40. Dalhoff A. Global fluoroquinolone resistance epidemiology and implications for clinical use // *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, 2012; 2012, Article ID 976273.
41. Dankert J., Hogt A. H., Feijen J., Biomedical polymers: Bacterial adhesion, colonization, and infection // *CRC Crit Rev Biocompat*, 1986; 2: 219–301.
42. Darouiche R. O. Device-associated infections: a macroproblem that starts with microadherence // *Clin Infect Dis*, 2001; 33(9): 1567–1572.
43. Das M., Badley A. D., Cockerill F. R., Steckelberg J. M., Wilson W. R. Infective endocarditis caused by HACEK microorganisms // *Annu Rev Med*, 1997; 48: 25–33.
44. Davies J. C. *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: pathogenesis and persistence // *Paediatr Respir Rev*, 2002; 3(2): 128–134.
45. Desai S. N., Kikani K. M., Mehta S. J. Microbiological surveillance of operation theaters & intensive care units of teaching hospital in Surendranagar, Gujarat // *Gujarat Medical Journal*, 2012; 67(2): 95–97.
46. Diekema D. J., Pfaller M. A., Schmitz F. J., Smayevsky J., Bell J., Jones R. N., et al. Survey of infections due to *Staphylococcus species*: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific region for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997–1999 // *Clin Infect Dis*, 2001; 32 Suppl 2: S114–132.
47. DiZerega G. S., Traylor M. M., Alphonso L. S., Falcone S. J. Use of temporary implantable biomaterials to reduce leg pain and back pain in patients with sciatica and lumbar disc herniation // *Materials*, 2010; 3(5): 3331–3368.
48. 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.
49. Eisenhart A. E., Disso N. M. Thermostability determination of antibiotics at high temperatures by liquid Chromatography-Mass Spectrometry // *Proceedings of the National Conference on Undergraduate Research (NCUR)*, Weber State University, 2012.
50. Espat N. J., Copeland E. M., Moldawer L. L. Tumor necrosis factor and cachexia: a current perspective // *Surg Oncol*, 1994; 3(5): 255–262.
51. Estahbanati H. K., Kashani P. P., Ghanaatpisheh F. Frequency of *Pseudomonas aeruginosa* serotypes in burn wound infections and their resistance to antibiotics // *Burns*, 2002; 28(4): 340–348.

52. Fantin B., Duval X., Massias L., Alavoine L., Chau F., Retout S., et al. Ciprofloxacin dosage and emergence of resistance in human commensal bacteria // *J Infect Dis*, 2009; 1; 200(3): 390–398.
53. 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.
54. Fey P. D., Olson M. E. Current concepts in biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis* // *Future Microbiol*, 2010; 5(6): 917–933.
55. Fleming A. On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae* // *British Journal of Experimental Pathology*, 1929; 10 (31): 226–236.
56. 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.
57. Gallo R. L., Nakatsuji T. Microbial symbiosis with the Innate Immune Defense System of the skin // *J Invest Dermatol*, 2011; 131(10): 1974–1980.
58. 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.
59. Goldmann D. A., Pier G. B. Pathogenesis of infections related to intravascular catheterization // *Clin Microbiol Rev*, 1993; 6(2): 176–192.
60. Gollwitzer H., Dombrowski Y., Prodinger 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.
61. Gomes M. E., Reis R. L. Biodegradable polymers and composites in biomedical applications: from catgut to tissue engineering. Part 1: Available systems and their properties // *International Materials Reviews*, 2004; 49(5): 261–273.
62. 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.
63. Gould F. K., Denning D. W., Elliott T.S.J., Fowleraker J., Perry D. J., Prendergast B. D., et al. Guidelines for the diagnosis and antibiotic treatment of endocarditis in adults: a report of the Working Party of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy // *J Antimicrob Chemother*, 2012; 67: 269–289.
64. Graham J. C., Gould F. K. Role of aminoglycosides in the treatment of bacterial endocarditis // *J Antimicrob Chemother*, 2002; 49 (3): 437–444.
65. 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.
66. Green K. D., Chen W, Garneau-Tsodikova S. Effects of altering aminoglycoside structures on bacterial resistance enzyme activities // *Antimicrob Agents Chemother*, 2011; 55(7): 3207–3213.
67. 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.
68. Gunatillake P. A., Adhikari R. Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering // *Eur Cell Mater*, 2003; 20(5): 1–16.

69. Haenle M., Skripitz C., Mittelmeier W., Skripitz R. Economic impact of infected total knee arthroplasty // *Scientific World Journal*, 2012; 2012: 196515.
70. Harmsen M., Yang L., Pamp S. J., Tolker-Nielsen T. An update on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation, tolerance, and dispersal // *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2010; 59(3): 253–268.
71. 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.
72. Higgins C. E., Kastner R. E. Nebramycin, a new broad-spectrum antibiotic complex. Description of *Streptomyces tenebrarius* // *Antimicrob Agents Chemother* 1967; 7: 324–331.
73. Höland W., Schweiger M., Watzke R., Peschke A., Kappert H. Ceramics as biomaterials for dental restoration // *Expert Rev Med Devices*. 2008; 5(6): 729–45.
74. Hooper D. C., Wolfson J. S., Ng E. Y., Swartz M. N. Mechanisms of action of and resistance to ciprofloxacin // *Am J Med*, 1987; 27;82(4A): 12–20.
75. Hooton T. M., Bradley S. F., Cardenas D. D., Colgan R., Geerlings S. E., Rice J. C., et al. Diagnosis, prevention and treatment of catheter-associated urinary tract infection in adults // *Clin Infect Dis*, 2010; 50(5): 625–563.
76. Huebsch N., Mooney D. J. Inspiration and application in the evolution of biomaterials // *Nature*, 2009; 462(7272): 426–432.
77. Huth M. E., Ricci A. J., Cheng A. G. Mechanisms of aminoglycoside ototoxicity and targets of hair cell protection // *Int J Otolaryngol*, 2011; Article ID 937861, 19 pages.
78. Isoherranen N., Lavy E., Soback S. Pharmacokinetics of Gentamicin C1, C1a, and C2 in Beagles after a Single Intravenous Dose // *Antimicrob Agents Chemother*, 2000; 44(6): 1443–1447.
79. 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.
80. Jacobsen S. M., Stickler D. J., Mobley H. L. T., Shirtliff M. E. Complicated Catheter-Associated Urinary Tract Infections Due to *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis* // *Microbiol Rev*, 2008; (1): 26–59.
81. Jacoby G. A. Mechanisms of Resistance to Quinolones // *Clin Infect Dis*. 2005; 15(41): Suppl 2: S120-S126.
82. Johnson J. R., Brian Johnston B., Kuskowski M.A. *In Vitro* Comparison of Nitrofurazone- and Silver Alloy-Coated Foley Catheters for Contact-Dependent and Diffusible Inhibition of Urinary Tract Infection-Associated Microorganisms // *Antimicrob Agents Chemother*, 2012; 56(9): 4969–4972.
83. 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.
84. 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.
85. Kim G. K. The Risk of Fluoroquinolone-induced Tendinopathy and Tendon Rupture // *J Clin Aesthet Dermatol*. 2010 Apr; 3(4): 49–54.
86. 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.

87. 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.
88. King D.E., Malone R., Lilley S. New Classification and Update on the Quinolone Antibiotics. *Am Fam Physician*. 2000; 61(9): 2741–2748.
89. Kloos W., Schleifer K. H. In:// *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore: Williams & Wilkins, 1986.
90. Kohane D. S., Langer R. Polymeric biomaterials in tissue engineering // *Pediatric Research*, 2008; 63: 487–491.
91. Kohanski M. A., Dwyer D. J., Collins J. J. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks // *Nat Rev Microbiol*, 2010; 8(6): 423–435.
92. 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.
93. Lambert T. Antibiotics that affect the ribosome // *Rev Sci Tech*, 2012; 31(1): 57–64.
94. Landersdorfer C. B., Kirkpatrick C. M. J., Kinzig M., Bulitta J. B., Holzgrabe U., Jaehde U., et al. Competitive inhibition of renal tubular secretion of ciprofloxacin and metabolite by probenecid // *Br J Clin Pharmacol*, 2010; 69(2): 167–178.
95. 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.
96. 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.
97. Lazebnik N., Noy S., Lazebnik R., Hezroni Y., Amoday I., Aviram A. Gentamicin serum half-life: a comparison between pregnant and non-pregnant women // *Postgrad Med J*, 1985; 61(721): 979–981.
98. LeBel M. Ciprofloxacin: chemistry, mechanism of action, resistance, antimicrobial spectrum, pharmacokinetics, clinical trials, and adverse reactions // *Pharmacotherapy*, 1988; 8(1): 3–33.
99. Lee H. S., Parka S. H., Lee J. H., Jeonga B. Y., Ahn S. K., Choi Y. M., et al. Antimicrobial and biodegradable PLGA medical sutures with natural grapefruit seed extracts // *Materials Letters*, 2013; 95: 40–43.
100. Leibovici L., Vidal L., Paul M. Aminoglycoside drugs in clinical practice: an evidence-based approach // *J Antimicrob Chemother*, 2009; 63(2): 246–251.
101. 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.
102. Leshner G. Y., Froelich E. J., Gruett M. D., Bailey J. H., Brundage R. P. 1, 8-naphthyridine derivatives: a new class of chemotherapeutic agents // *J Med Pharm Chem*, 1962; 91: 1063–1065.
103. 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.
104. 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.

105. Libby P. Inflammatory mechanisms: the molecular basis of inflammation and disease // *Nutr Rev*, 2007; 65(12 Pt 2): S140–146.
106. Ligon B. L. Penicillin: its discovery and early development // *Semin Pediatr Infect Dis*, 2004; 15(1): 52–57.
107. Lister P. D., Wolter D. J., Hanson N. D. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms // *Clin Microbiol Rev*, 2009; 22(4): 582–610.
108. 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.
109. 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.
110. 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.
111. Low D. E. Fluoroquinolone-resistant pneumococci: maybe resistance isn't futile? // *Clin Infect Dis*, 2005; 40(2): 236–238.
112. Lutz J. K., Lee J. Prevalence and antimicrobial-resistance of *Pseudomonas aeruginosa* in swimming pools and hot tubs // *Int J Environ Res Public Health*, 2011; 8(2): 554–564.
113. Ma L. Y., Jackson K., Landry R. M., Parsek M. R., Wozniak D. J. Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* conditional Psl variants reveals roles for the Psl polysaccharide in adhesion and maintaining biofilm structure postattachment // *J Bacteriol*, 2006; 188: 8213–8221.
114. Ma Z., Gao C., Gong Y., Shen J. Cartilage tissue engineering PLLA scaffold with surface immobilized collagen and basic fibroblast growth factor // *Biomaterials*, 2005; 26(11): 1253–1259.
115. MacGregor R. R., Graziani A. L., Esterhai J. L. Oral ciprofloxacin for osteomyelitis // *Orthopedics*, 1990; 13(1): 55–60.
116. Mack D., Becker P., Chatterjee I., Dobinsky S., Knobloch J. K., Peters G., et al. Mechanisms of biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*: functional molecules, regulatory circuits, and adaptive responses // *Int J Med Microbiol*, 2004; 294(2–3): 203–212.
117. Mandal J., Srinivas Acharya N., Buddhapriya D., Chandra Parija S. Antibiotic resistance pattern among common bacterial uropathogens with a special reference to ciprofloxacin resistant *Escherichia coli* // *Indian J Med Res*, 2012; 136: 842–849.
118. 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.
119. 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.
120. Micek S. T., Lloyd A. E., Ritchie D. J., Reichley R. M., Fraser V. J., Kollef M. H. *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infection: importance of appropriate initial antimicrobial treatment // *Antimicrob Agents Chemother*, 2005; 49(4): 1306–1311.
121. Minget-Leclercq M. P., Tulkens P. M. Aminoglycosides: nephrotoxicity // *Antimicrob Agents Chemother*, 1999; 43(5): 1003–1012.

122. Mingeot-Leclercq M. P., Glupczynski Y., Tulkens P. M. Aminoglycosides: activity and resistance // *Antimicrob Agents Chemother*, 1999; 43(4): 727–737.
123. Misawa Y., Muraoka A., Ohki S., Aizawa K., Kawahito K., Saito T., et al. Fifteen-year experience with the Bicarbon heart valve prosthesis in a single center // *J Cardiothorac Surg*, 2015; 10: 89.
124. Mondrinos M.J., Dembzyński R., Lu L., Byrapogu V.K.C., Wootton D. M., Lelkes P. I., et al. Porogen-based solid freeform fabrication of polycaprolactone–calcium phosphate scaffolds for tissue engineering // *Biomaterials*, 2006; 27: 4399–4408.
125. Moore K. W., de Waal Malefyt R., Coffman R. L., O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor // *Annu Rev Immunol*, 2001; 19: 683–765.
126. Moore R. D., Lietman P. S., Smith C. R. Clinical response to aminoglycoside therapy: importance of the ratio of peak concentration to minimal inhibitory concentration // *J. Infect. Dis*, 1987; 155: 93–99.
127. Morais M. J., Papadimitrakopoulos F., Burgess D. J. Biomaterials/tissue interactions: possible solutions to overcome foreign body response // *AAPS J*, 2010; 12(2): 188–196.
128. Murray J., Barbara J., Dunkley S., Lopez A., Van Ostade X., Condliffe I., et al. Regulation of Neutrophil apoptosis by Tumor Necrosis Factor-Alpha: requirements for TNF-R55 and TNF-R75 for induction of apoptosis *in vitro* // *Blood*, 1997; 90(7): 2772–2783.
129. Mylonakis E., Ryan E. T., Calderwood S. B. *Clostridium difficile*-associated diarrhea: a review // *Arch Intern Med*, 2001; 161(4): 525–533.
130. Nabera K. G., Buschb W., Focht J. Ciprofloxacin in the treatment of chronic bacterial prostatitis: a prospective, non-comparative multicentre clinical trial with long-term follow-up // *Int J Antimicrob Agents*, 2000; 14(2): 143–149.
131. Nair L. S., Laurencin C. T. Biodegradable polymers as biomaterials // *Prog Polym Sci*, 2007; 32: 762–798.
132. Navarro M., Michiardi A., Castano O., Planell J. A. Biomaterials in orthopaedics // *J R Soc Interface*, 2008; 5: 1137–1158.
133. 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.
134. Nicolle L. E. Catheter associated urinary tract infections // *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 2014; 3: 23.
135. Oliphant C. M., Green G. M. Quinolones: a comprehensive review // *Am Fam Physician*, 2002; 65(3): 455–464.
136. Otto M. *Staphylococcus epidermidis* – the “accidental” pathogen // *Nat Rev Microbiol*, 2009; 7(8): 555–567.
137. 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.
138. Patel N. R., Gohil P. P. A review on biomaterials: scope, applications & human anatomy significance // *International Journal of Emerging Technology and Advanced Engineering*, 2012; 2(4): 91–101.
139. Payen S., Serreau R., Munck A., Aujard Y., Aigrain Y., Bressolle F., et al. Population pharmacokinetics of Ciprofloxacin in pediatric and adolescent patients with acute infections // *Antimicrob Agents Chemother*, 2003; 47(10): 3170–3178.
140. 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.
141. Pittet D., Tarara D., Wenzel R. P. Nosocomial bloodstream infection in critically ill patients: excess length of stay, extra costs, and attributable mortality // *JAMA*, 1994; 271: 1598–1601.
 142. Poirel L., Rodriguez-Martinez J. M., Mammeri H., Liard A., Nordmann P. Origin of plasmid-mediated quinolone resistance determinant QnrA // *Antimicrob Agents Chemother*, 2005; 49: 3523–3525.
 143. Pollack, M. *Pseudomonas aeruginosa* // G. L. Mandell, R. Dolan, J. E. Bennett (ed.) Principles and practices of infectious diseases. New York, NY: Churchill Livingstone, 1995, p. 1820–2003.
 144. Poole K. Aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa* // *Antimicrob. Agents Chemother*, February 2005; 49(2): 479–487.
 145. 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.
 146. Pulido L., Ghanem E., Joshi A., Purtill J. J., Parvizi J. Periprosthetic joint infection: the incidence, timing, and predisposing factors // *Clin Orthop Relat Res*, 2008; 466(7): 1710–1715.
 147. Radek K., Gallo R. Antimicrobial peptides: natural effectors of the innate immune system // *Seminars in Immunopathology*, 2007; 29(1): 27–24.
 148. Ranjan K. P., Ranjan N., Bansal S. K., Arora D. R. Prevalence of *Pseudomonas aeruginosa* in post-operative wound infection in a referral hospital in Haryana, India // *J Lab Physicians*, 2010; 2(2): 74–77.
 149. Rasamiravaka T., Labtani Q., Duez P., El Jaziri M. The formation of biofilms by *Pseudomonas aeruginosa*: a review of the natural and synthetic compounds interfering with control mechanisms // *BioMed Research International*, 2015; 2015, Article ID 759348, 17 pages.
 150. 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- α , β -defensin-2 and IL-10 in tissues // *Medicina (Kaunas)*, 2011; 47(10): 560–565.
 151. Ribeiro M., Monteiro F. J., Ferraz M. P. Infection of orthopedic implants with emphasis on bacterial adhesion process and techniques used in studying bacterial-material interactions // *Biomater*, 2012; 2(4): 176–194.
 152. Rogers K. L., Fey P. D., Rupp M. E. Coagulase-negative staphylococcal infections // *Infect Dis Clin North Am*, 2009; 23(1): 73–98.
 153. Rousset F., Garcia E., Defrance T., Péronne C., Vezzio N., Hsu D. H., et al. Interleukin 10 is a potent growth and differentiation factor for activated human B lymphocytes // *Proc Natl Acad Sci*, 1992; 89(5): 1890–1893.
 154. Ryder C., Byrd M., Wozniak D. J. Role of polysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development // *Curr Opin Microbiol*, 2007; 10(6): 644–648.
 155. Sáenz A., Rivera-Muñoz E., Brostow W. Castañ V. M. Ceramic biomaterials: an introductory overview // *Journal of Materials Education*, 1999; 21(56): 297–306.
 156. Sauer K., Camper A. K., Ehrlich G. H., Costerton J. W., Davies D. G. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm // *J Bacteriol*, 2002; 184(4): 1140–1154.

157. 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.
158. Schnieders J., Gbureck U., Vorndran 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.
159. Schröder J. M., Harder J. Antimicrobial skin peptides and proteins // *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2006; 63(4): 469–486.
160. Schröder J. M., Harder J. Human beta-defensin-2 // *Int J Biochem Cell Biol*, 1999; 31(6): 645–651.
161. Schuttea R. J., Xiea L., Klitzmana B., Reichert W. M. *In vivo* cytokine-associated responses to biomaterials // *Biomaterials*, 2009; 30(2): 160–168.
162. Seala B. L., Oterob T. C., Panitch A. Polymeric biomaterials for tissue and organ regeneration // *Materials Science and Engineering: R: Reports*, 2001; 34(4): 147–230.
163. Seng P., Bayle S., Alliez A., Romain F., Casanova D., Stein A. The microbial epidemiology of breast implant infections in a regional referral centre for plastic and reconstructive surgery in the south of France // *Int J Infect Dis*, 2015; 35: 62–66.
164. Shikinami Y., Okuno M. Bioresorbable devices made of forged composites of Hydroxyapatite (HA) particles and Polyl-lactide (PLLA). Part II: Practical properties of miniscrews and miniplates // *Biomaterials*, 2001; 22(23): 3197–3211.
165. Smyth A. R., Bhatt J. Once-daily versus multiple-daily dosing with intravenous aminoglycosides for cystic fibrosis // *Cochrane Database Syst Rev*, 2010; 20(1): CD002009.
166. Sokolova M., Putniņš A., Kreicbergs I., Ločs J. Scale-up of wet precipitation calcium phosphate synthesis // *Key Engineering Materials*, 2014; 604: 216–219.
167. Solomkin J. S., Mazuski J. E., Bradley J. S., Rodvold K. A., Goldstein E. J., Baron E. J., et al. Diagnosis and management of complicated intra-abdominal infection in adults and children: guidelines by the Surgical Infection Society and the Infectious Diseases Society of America // *Clin. Infect. Dis.*, 2010; 50 (2): 133–164.
168. 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.
169. Stanley N. R., Lazazzera B. A. Environmental signals and regulatory pathways that influence biofilm formation // *Mol Microbiol*, 2004; 52(4): 917–924.
170. Stewart P. S., Costerton J. W. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms // *Lancet*, 2001; 358: 135–138.
171. Suming L., Vert M. Biodegradation of aliphatic polyesters // Springer, Netherlands, 2002, 71–131.
172. Sutter V. L., Kwok Y. Y., Bulkacz J. Comparative activity of ciprofloxacin against anaerobic bacteria // *Antimicrob Agents Chemother*, 1985; 27(3): 427–428.
173. Tam V. H., Kabbara S., Vo G., Schilling A. N., Coyle E. A. Comparative pharmacodynamics of Gentamicin against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* // *Antimicrob Agents Chemother*, 2006; 50(8): 2626–2631.
174. Tamai H., Igaki K., Kyo E., Kosuga K., Kawashima A., Matsui S., et al. Initial and 6-month results of biodegradable poly-l-lactic acid coronary stents in humans // *Circulation*, 2000; 102(4): 399–404.
175. 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 (sk. 04.02.2015.).
176. Tischer T. S., Hollstein A., Voss W., Wendig I., Lauschke J., Schneider R., et al. A historical perspective of pacemaker infections: 40-years single-centre experience // *Europace*, 2014; 16(2): 235–240.
 177. Tokiwa Y., Calabia B. P., Ugwu C. U., Aiba S. Biodegradability of plastics // *Int J Mol Sci*, 2009; 10(9): 3722–3742.
 178. Tracey K. J., Cerami A. Tumor necrosis factor: a pleiotropic cytokine and therapeutic target // *Annu Rev Med*, 1994; 45: 491–503.
 179. Trampuz A., Zimmerli W. Prosthetic joint infections: update in diagnosis and treatment // *Swiss Med Wkly*, 2005; 135(17–18): 243–251.
 180. Turnidge J. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of fluoroquinolones // *Drugs*, 1999; 58: 29–36.
 181. Ulery B. D., Nair L. S., Laurencin C. T. Biomedical applications of biodegradable polymers // *J Polym Sci B Polym Phys*, 2011; 49(12): 832–864.
 182. Umezawa H., Ueda M., Maeda K., Yagishita K., Kondo S., Okami Y., et al. Production and isolation of a new antibiotic: kanamycin // *J Antibiot* 1957; 10(5): 181–188.
 183. 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.
 184. Van Delden C., Iglewski B. H. Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections // *Emerg Infect Dis*, 1998; 4(4): 551–560.
 185. Vance-Bryan K., Guay D. R. P., Rotschafer J. C. Clinical pharmacokinetics of Ciprofloxacin // *Clinical Pharmacokinetics*, 1990; 19(6): 434–461.
 186. Vanhems P., Baratin D., Voirin N., Savey A., Caillat-Vallet E., Metzger M. H., et al. Reduction of urinary tract infections acquired in an intensive care unit during a 10-year surveillance program // *Eur J Epidemiol*, 2008; 23(9): 641–645.
 187. Venkatesh M. P., Placencia F., Weisman L. E. Coagulase-negative staphylococcal infections in the neonate and child: an update // *Semin Pediatr Infect Dis*, 2006; 17(3): 120–127.
 188. Vinh D. C., Embil J. M. Device-related infections: a review // *J Long Term Eff Med Implants*, 2005; 15(5): 467–488.
 189. von Eiff C., Jansen B., Kohnen W., Becker K. Infections associated with medical devices: pathogenesis, management and prophylaxis // *Drugs*, 2005; 65(2): 179–214.
 190. Vroman I., Tighzert L. Biodegradable polymers // *Materials*, 2009; 2: 307–344.
 191. Wajant H., Pfizenmaier K., Scheurich P. Tumor necrosis factor signaling // *Cell Death Differ*, 2003; 10(1): 45–65.
 192. Waksman S. A., Bugie E., Schatz A. Isolation of anti-biotic substances from soil microorganisms with special reference to streptothricin and streptomycin // *Proc Staff Meet Mayo Clin*, 1944; 19: 537.
 193. Waksman S. A., Lechevalier H. A. Neomycin, a new antibiotic active against Streptomycin-Resistant Bacteria, including tuberculosis organisms // *Science*, 1949; 109(2830): 305–307.
 194. Waksman, S.A., Tishler, M. The chemical nature of actinomycin, an anti-microbial substance produced by *Actinomyces antibioticus* // *J. Biol. Chem*, 1942; 142: 519–528.
 195. Wang A., Athan E., Pappas P. A., Fowler V. G. Jr., Olaison L., Paré C., et al. Contemporary clinical profile and outcome of prosthetic valve endocarditis // *JAMA*, 2007; 297(12): 1354–1361.

196. 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.
197. 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.
198. Wei Q., Ma L. Z. Biofilm matrix and its regulation in *Pseudomonas aeruginosa* // *Int J Mol Sci*, 2013; 14(10): 20983–21005.
199. Weinstein M. J., Luedemann G. M., Oden E. M., Wagman G. H., Rosselet J. P., Marquez J. A., et al. Gentamicin, a new antibiotic complex from micromonospora // *Med Chem*, 1963; 6: 463–464.
200. 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.
201. Wilton L. V., Pearce G. L., Mann R. D. A comparison of ciprofloxacin, nor-floxacin, ofloxacin, azithromycin and cefixime examined by observational cohort studies // *Br J Clin Pharmacol*, 1996; 41: 227–284.
202. Wolfson J. S., Hooper D. C. The fluoroquinolones: structures, mechanisms of action and resistance, and spectra of activity in vitro // *Antimicrob Agents Chemother*, 1985; 28(4): 581–586.
203. Woodruff A. M., Hutmacher D. W. The return of a forgotten polymer – Polycaprolactone in the 21st century // 2010; 35(10): 1217–1256.
204. Wright J., Paauw D. S. Complications of antibiotic therapy // *Med Clin North Am*, 2013, 97(4): 667–679.
205. Wu P., Grainger D. W. Drug/device combinations for local drug therapies and infection prophylaxis // *Biomaterials*, 2006; 27: 2450–2467.
206. Xiong M. H., Bao Y., Yang X. Z., Zhu Y. H., Wang J. Delivery of antibiotics with polymeric particles // *Adv Drug Deliv Rev*, 2014; 78: 63–76.
207. 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.
208. Yamagami A., Nagaoka N., Yoshihara K., Nakamura M., Shirai H., Matsumoto T., et al. Ultra-structural evaluation of an anodic oxidated titanium dental implant // *Dent Mater J*, 2014; 33(6): 828–834.
209. Yu C., Giuffre B. Achilles tendinopathy after treatment with fluoroquinolone // *Australas Radiol*, 2005; 49(5): 407–410.
210. Zhang J. M., An J. Cytokines, inflammation and pain // *Int Anesthesiol Clin*, 2007; 45(2): 27–37.

PATEICĪBAS

Vēlos izteikt vislielāko pateicību visiem cilvēkiem, kuri palīdzēja realizēt manu pētījumu, it sevišķi saviem darba vadītājiem, kuri katrs deva savu ieguldījumu, vērtīgus padomus un stimulu darba realizācijā. No saviem darba vadītājiem ne tikai ieguvu padomus, bet esmu iemācījies vairākas vērtīgas lietas.

Liels paldies profesorei Jutai Kroičai par sniegto atbalstu, dotajiem padomiem un uzticēšanos visa pētījuma laikā. Paldies, ka devāt jaunu un īsteno skatījumu uz pētniecību un darba darīšanu kā tādu.

Ļoti pateicos docentei Ilzei Šalmai par vērtīgajiem padomiem, palīdzību *in vivo* pētījumos un uzticēšanos manām darbaspējām. Paldies, ka devāt brīnišķo iespēju iesaistīties biomateriālu pētījumos.

Visdziļākā pateicība ir manai ģimenei, kas izrādīja lielu sapratni gan pētījuma laikā, gan pēdējos mēnešos, pētījumu pabeidzot.

Paldies visam Bioloģijas un mikrobioloģijas katedras kolektīvam par palīdzību, kad tā bija tik nepieciešama no Jums.

PIELIKUMI

E-testu fotoattēli



Ciprofloksacīna MIC pret *S. epidermidis*



Gentamicīna MIC pret *S. epidermidis*



Ciprofloksacīna MIC pret *Ps. aeruginosa*



Gentamicīna MIC pret *Ps. aerugino*

PVD atļauja



3. izdajanje
procedurali KR.10/P.068
verzija 02
kop. 1 no. 1

**PĀRTIKAS UN VETERINĀRĀ DIENESTA
IZMĒGINĀJUMA PROJEKTA ATĻAUJA Nr. 24
DZĪVNIEKA IZMANTOŠANAI PROCEDŪRĀ**

Atļaujas saņēmējs:

Rīgas Stradiņa universitāte

PVD reg.nr. 025479

Izmēģinājumu dzīvnieku lietotājs (nosaukums, PVD reģistra nr.)

„Kaulaudis aizvietojošo sintētisku kalcija fosfāta biokeramikas biomateriālu reaktogenitāte pēc implantācijas eksperimentālu dzīvnieku audos, biomateriālu minimālās inficējošās devas, mikrobiālās kontaminācijas riska un tā ietekmes uz kontaktējošo audu atbildes reakciju noteikšana”.

Izmēģinājuma projekta nosaukums

Izmēģinājuma norises vieta **Hipokrāta iela – 1, Rīga, LV - 1038**

Atļaujas darbības laiks no	02.07.2010.	līdz	30.11.2012.
	(dd. mm. gggg.)		dd. mm. gggg.)

Generāldirektora
pienākumu izpildītājs

J. Altenburgs



ED-2 Clinical Use and Side Effects